

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA
DIPARTIMENTO FARMACO-BIOLOGICO



Dottorato di Ricerca in
FARMACOLOGIA E BIOCHIMICA DELLA MORTE CELLULARE
XX CICLO S.S.D.: BIO/10-Farmacologia

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Giacinto BAGETTA

**Gli (endo)cannabinoidi modulano il rilascio di TNF- α
e l'esocitosi di glutammato dagli astrociti**

Relatore

Prof. Paola BEZZI

Candidata

Dott. Paola SPAGNUOLO

Anno Accademico 2007-2008

Verbale n° 32

In data 21 Ottobre, 2008, alle ore 9.00, nei locali della Facoltà di Farmacia dell'Università di Catanzaro "Magna Graecia", si è riunito il Collegio dei Docenti del Dottorato di Ricerca in "Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare" per discutere e deliberare sul seguente ordine del giorno:

- 1) Approvazione relazione attività anno 2008 e passaggio anni successivi Dottorandi di ricerca afferenti al XXI, XXII e XXIII ciclo (art. 46, comma I Regolamento Dottorato);
- 2) Valutazione e giudizio finale Dottorandi XIX e XX ciclo;
- 3) Proposta Commissione esame finale XIX e XX ciclo;
- 4) Varie ed eventuali.

Sono presenti il Coordinatore, Prof. G. Bagetta, i Proff. M.T. Corasaniti, P.L. Nicotera, D. Rotiroti, e per consultazione telematica, ai sensi del Regolamento didattico, i Proff. D. Borgese, G. Genchi, N. Mercuri, L.A. Morrone e R.G. Nisticò, i Dott.ri D. Amantea, L. Berliocchi, M.C. Caroleo, R. Curcio, G. Lauria, C. Nucci, L. Rombolà, R. Russo.

Risulta assente giustificata la Dott.ssa E. Cione.

Sono assenti i Proff. E. Clementi, G. Melino, V. Mollace.



Svolge le funzioni di Presidente il Prof. G. Bagetta e di Segretario il Prof. D. Rotiroti.

OMISSIS

2) Valutazione e giudizio finale dottorandi XX ciclo

Valutazione finale della candidata **Dott.ssa Paola Spagnuolo**

Tesi: **Gli (endo)cannabinoidi modulano il rilascio di TNF- α e l'esocitosi di glutammato dagli astrociti**

Il Collegio dei Docenti ha esaminato l'attività svolta dalla Candidata; questa è stata indirizzata alla definizione del ruolo del sistema endocannabinoide nei meccanismi alla base del rilascio esocitotico di neuromediatrici e mediatori dell'infiammazione da colture primarie di astrociti. Tale attività di ricerca ha richiesto lo sviluppo di competenze di laboratorio inerenti al mantenimento in coltura di cellule sia in linea che isolate da dal cervello di animali in via di sviluppo. In particolare, durante la prima fase del percorso formativo, la Candidata ha studiato il sistema endocannabinoide in linee cellulari di glioblastoma, sia normali che esposte a stimoli infiammatori, ed in cui ha identificato l'esistenza dei sistemi di sintesi, trasporto e degradazione degli endocannabinoidi. A tal fine ha impiegato tecniche biochimiche di dosaggio di radiomarcanti, dosaggio di prodotti genici mediante ELISA e tecniche analitiche in HPLC per la determinazione di molecole estremamente labili. Queste competenze sono state successivamente estese all'imaging dei movimenti



intracellulari di secondi messaggeri ed alla determinazione delle variazioni morfofunzionali di cellule astrocitarie in coltura. La natura multidisciplinare delle competenze sviluppate dalla Dottaranda le hanno consentito di definire il ruolo neuroprotettivo degli endocannabinoidi in settings sperimentali di neuro infiammazione ed il loro coinvolgimento nella comunicazione bidirezionale tra astrociti e neuroni. Infatti, durante il suo stage presso l'Università di Losanna ha documentato mediante esperimenti di immunocitochimica la presenza del recettore CB1 negli astrociti la cui stimolazione induce il rilascio di glutammato la cui cinetica è stata seguita mediante microscopia TIRF (Total internal reflection fluorescence).

Il Collegio dei Docenti valuta, nel complesso, estremamente positivo il lavoro svolto dalla candidata che, durante i quattro anni di corso, ha partecipato attivamente alle iniziative didattiche organizzate sotto forma di workshops e seminari.

Pertanto, il Collegio dei Docenti ritiene la candidata idonea a sostenere l'esame finale di Dottorato.

OMISSIS

Alle ore 19.00 la seduta è tolta.

Letto, approvato e sottoscritto

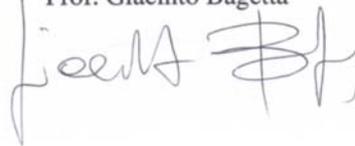
Il Segretario

Prof. Domenicantonio Rotiroti



Il Presidente

Prof. Giacinto Bagetta



INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Fisiopatologia della glia.....	1
1.1.1 Caratteristiche morfologiche degli astrociti.....	1
1.1.2 Ruolo degli astrociti nella fisiologia cerebrale.....	5
1.1.3 Rilascio di glutammato Ca^{2+} -dipendente dagli astrociti.....	7
1.1.4 Ruolo degli astrociti nelle patologie neurodegenerative.....	9
1.1.5 Il TNF- α astrogliale come mediatore della neuro degenerazione associata all'HAD.....	11
1.2 Il sistema endocannabinoide.....	15
1.2.1 Dalla “Cannabis” al sistema endocannabinoide.....	15
1.2.2 Gli endocannabinoidi.....	16
1.2.3 Biosintesi ed inattivazione di AEA e 2-AG.....	19
1.2.4 Recettori per gli endocannabinoidi.....	24
1.2.5 Ruolo fisiologico degli endocannabinoidi a livello del sistema nervoso centrale.....	26
1.2.6 Ruolo antinfiammatorio e neuroprotettivo degli (endo)cannabinoidi.....	28
1.3 Scopo della tesi.....	30
2. MATERIALI E METODI	31
2.1 Reagenti.....	31
2.2 Colture cellulari e trattamenti per gli esperimenti di biochimica.....	31
2.3 Saggio di vitalità cellulare MTT.....	32
2.4 Studi di binding.....	32
2.5 Ricaptazione degli endocannabinoidi.....	33
2.6 Saggi di attività enzimatica.....	34
2.7 Determinazione dei livelli endogeni da AEA e 2-AG.....	35
2.8 Determinazione della concentrazione di TNF- α tramite ELISA.....	36
2.9 Colture primarie di astrociti della corteccia cerebrale di ratti neonati.....	36
2.10 Immunocitochimica.....	37
2.11 Calcium imaging.....	38
2.12 Studio dell'esocitosi mediante microscopia “Total Internal Reflection”o TIRF.....	41

2.13 Analisi delle immagini.....	43
3. RISULTATI.....	47
3.1 Le cellule di astrocitoma umano U373MG possiedono un sistema endocannabinoide funzionale.....	47
3.2 L'esposizione alla gp120 non influenza la vitalità delle cellule di astrocitoma umano U373MG.....	51
3.3 L'esposizione alla gp120 altera il sistema endocannabinoide delle cellule di astrocitoma umano U373MG.....	53
3.4 L'inibitore della FAAH URB590 inibisce il rilascio di TNF- α indotto dalla gp120.....	59
3.5 Le colture primarie di astrociti corticali di ratto esprimono il recettore CB1 la cui attivazione determina aumento del $[Ca^{2+}]_i$	62
3.6 L'attivazione del recettore CB1 determina rilascio esocitotico di glutammato dagli astrociti.....	67
4. DISCUSSIONE.....	70
5. RINGRAZIAMENTI.....	76
6. BIBLIOGRAFIA.....	77
7. PRODUZIONE SCIENTIFICA.....	103

1. INTRODUZIONE

1.1 Fisiopatologia della glia

Il SNC è costituito da due principali tipi di cellule: i neuroni e le cellule gliali. Il termine glia deriva dal greco e significa “colla” in riferimento al ruolo di riempimento e di supporto neuronale che gli scienziati del XIX secolo hanno attribuito a questi tipi cellulari (Virchow, 1846). Le cellule gliali possono essere divise in base alla loro struttura e proprietà funzionali in: microglia e macroglia. Le cellule microgliali sono cellule immunocompetenti con proprietà fagocitotiche, considerati i macrofagi cerebrali residenti. La macroglia è a sua volta costituita da: (i) oligodendrociti, cellule responsabili della mielinizzazione assonale, che sono i corrispettivi a livello del SNC delle periferiche cellule di Schwann; (ii) cellule ependimali, cellule bipolari che contribuiscono alla movimentazione del liquido cefalo-rachidiano; (iii) astrociti, cellule dalla forma stellata (da cui deriva il loro nome) (Kettenmann *et al.*, 2005).

1.1.1 Caratteristiche morfologiche degli astrociti

Gli astrociti sono le cellule più numerose del SNC. Il numero relativo di astrociti, espresso sia in rapporto al numero totale di cellule cerebrali, sia in rapporto al numero di neuroni aumenta fortemente con la filogenesi e con la complessità cerebrale (Nedergaard *et al.*, 2003) Per esempio, nella sanguisuga un ganglio cellulare è costituito da 25-30 neuroni e un solo astrocita (Fig. 1.1). Nel nematode *Caenorhabditis elegans*, il rapporto astrociti–neuroni è di 1:6 (Sulston *et al.*, 1983), tale rapporto arriva ad 1:3 nella corteccia dei mammiferi minori come gatto e topo. Nella corteccia umana ci sono 1,4 astrociti per ogni neurone (Bass *et al.*, 1971). È probabile che l'aumento del numero degli astrociti con l'evoluzione sia in funzione della complessità del “network” neuronale: l'aumentata densità e complessità delle sinapsi richiede un maggiore grado di modulazione e controllo

locale. Inoltre, uno studio effettuato sul cervello di Einstein ha rivelato che il noto scienziato possedeva un numero di astrociti superiore rispetto ai soggetti controllo (Diamond *et al.*, 1985).

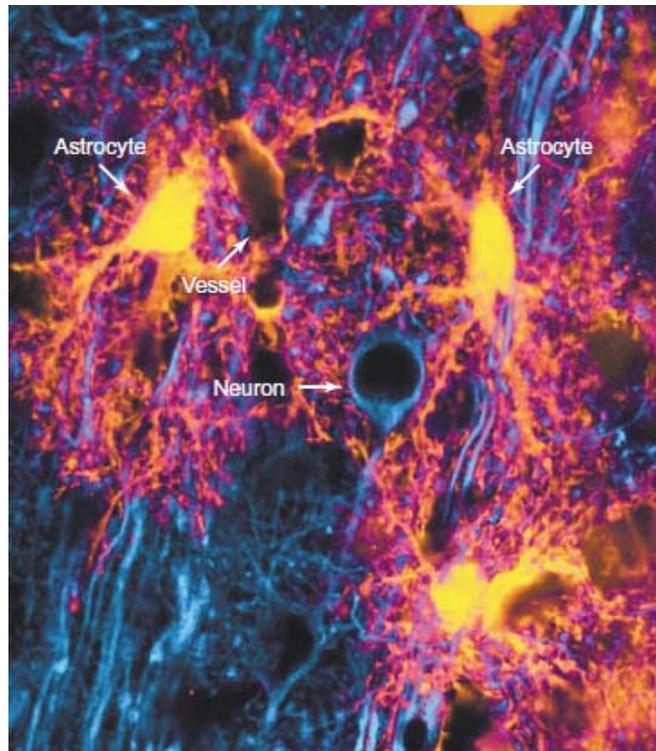
Gli astrociti sono cellule costituite da un corpo cellulare da cui dipartono numerosi processi. La morfologia degli astrociti è stata classicamente definita tramite l'uso di tecniche immunocitochimiche basate sull'utilizzo della GFAP (proteina glio-fibrillare acida), come marker degli astrociti. Tuttavia la GFAP mette in evidenza solo il citoscheletro del corpo cellulare e dei grandi processi e non quello dei processi più piccoli che quindi per molti anni non sono stati presi in considerazione. Recentemente la microiniezione di coloranti fluorescenti all'interno di singoli astrociti ippocampali (Bushong *et al.*, 2002), ha messo in evidenza anche i processi più piccoli fornendo numerose informazioni circa la vera struttura, l'organizzazione e la distribuzione degli astrociti. Tramite queste tecniche è stato dimostrato che gli astrociti hanno una disposizione molto ordinata con una minima sovrapposizione; ogni astrocita ricopre uno specifico territorio che si interfaccia con i vasi sanguigni e include centinaia di sinapsi (Bushong *et al.*, 2004; Bushong *et al.*, 2002). La superficie cellulare è interamente ricoperta da estensioni lamellari e protusioni filopoidali (Chao *et al.*, 2002), processi con la stessa composizione strutturale dotati di motilità, che conferiscono agli astrociti la capacità di avere delle interazioni dinamiche con le sinapsi circostanti. Inoltre, la maggior parte degli astrociti posseggono alcuni processi detti "end feet" tramite i quali contattano i vasi sanguigni e partecipano alla formazione della barriera emato-encefalica (Simard *et al.*, 2003).

Fino a qualche anno fa si pensava che gli astrociti fossero cellule di mero supporto con caratteristiche simili nelle varie aree cerebrali. Tuttavia, recenti scoperte hanno evidenziato come gli astrociti siano un tipo cellulare eterogeneo (Grass *et al.*, 2004; Matthias *et al.*, 2003). Studi condotti su topi che esprimono la proteina EGFP sotto il controllo del promotore della GFAP, hanno infatti dimostrato che esistono: (i) astrociti che esprimono la GFAP e sono costituiti da un corpo cellulare irregolare e processi ramificati; queste cellule presentano un potenziale di membrana molto negativo dovuto a correnti al K^+ voltaggio e tempo indipendenti, e prendono contatto l'una con l'altra attraverso le "gap

junction” formando sincizi funzionali (astrociti protoplasmatici); (ii) astrociti con bassa espressione della GFAP, potenziale di membrana meno elettronegativo dovuto alla presenza di correnti K^+ voltaggio-dipendenti e al Na^+ ; queste cellule non sono unite attraverso le gap junction (Wallraff *et al.*, 2004) (astrociti fibrillari). Inoltre, studi funzionali condotti nell’ippocampo hanno portato alla distinzione di popolazioni di astrociti con diverse tipi di correnti voltaggio-dipendenti (Steinhauser *et al.*, 1992) e diversi tipi di risposte al glutammato sui recettori AMPA (Zhou *et al.*, 2001)

Particolari tipi di astrociti sono le cellule della “Bergmann glia” anche conosciute come cellule epiteliali di Golgi. Questi sono astrociti radiali del cervelletto dotati di processi altamente ramificati attraverso i quali interagiscono con le terminazioni sinaptiche o i dendriti delle cellule del Purkinje (Iino *et al.*, 2001). Inoltre, le “Müller cells” che sono cellule specializzate della retina (Raff, 1989; Walz, 2000).

A.



B.

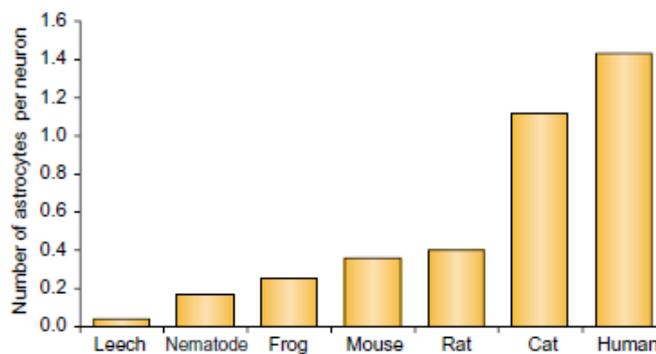


Fig. 1.1 Organizzazione spaziale di astrociti e neuroni nella corteccia. (A) I neuroni della corteccia di ratto sono marcati con un anticorpo per la proteina associata ai microtubuli 2 (MAP-2; blu), mentre gli astrociti esprimono la proteina EGFP sotto il controllo del promotore della GFAP (EGFP; giallo). Un piccolo vaso è delineato dagli “end-feet” degli astrociti EGFP-positivi. (B) L’analisi del rapporto tra astrociti e neuroni in diverse specie mostra un incremento del numero di astrociti per neurone con l’aumentare della complessità e delle dimensioni cerebrali. (Nedergaard *et al.*, 2003)

1.1.2 Ruolo degli astrociti nella fisiologia cerebrale

La distribuzione degli astrociti in territori definiti li colloca nella posizione giusta per le loro interazioni con i vasi sanguigni e con le terminazioni sinaptiche. L'idea che gli astrociti potessero connettere vasi sanguigni e neuroni risale alle osservazioni di Camillo Golgi alla fine del XIX secolo (Golgi, 1871). Tuttavia, solo recentemente alcuni studi hanno messo in evidenza i processi dinamici che complementano queste interazioni strutturali, come per esempio l'attivo dialogo tra gli astrociti e gli altri elementi cerebrali. In accordo con questa nuova prospettiva, gli astrociti sono cellule polivalenti coinvolti in quasi tutti i processi del sistema nervoso centrale (SNC), essi funzionano come unità di integrazione locale e ponti tra la comunicazione sinaptica e non sinaptica (Volterra *et al.*, 2005b).

È ormai ben stabilito che gli astrociti forniscano un supporto strutturale, metabolico e trofico alle cellule nervose. In particolare, gli astrociti: (i) provvedono al sequestro ed alla redistribuzione del K^+ durante l'attività neuronale (Karwoski *et al.*, 1989); (ii) controllano la concentrazione extracellulare dei neurotrasmettitori (come glutammato o GABA) rilasciati nello spazio sinaptico attraverso specifici trasportatori presenti sulla loro membrana (Coco *et al.*, 1997; Dehnes *et al.*, 1998); (iii) sono in grado di sintetizzare il GABA ed alcuni precursori del glutammato (Ransom *et al.*, 2003); (iv) forniscono i substrati energetici ai neuroni, come il lattato (Tsacopoulos *et al.*, 1996).

Negli ultimi 20 anni è emersa una serie di nuove evidenze che hanno rivoluzionato il ruolo classico degli astrociti, di supporto essenzialmente passivo della funzione neuronale, dimostrando invece che gli astrociti svolgono ruoli cruciali in processi come la sinaptogenesi (Hama *et al.*, 2004; Mauch *et al.*, 2001), la neurogenesi (Garcia *et al.*, 2004; Sanai *et al.*, 2004), e partecipano attivamente alla modulazione sinaptica (Volterra *et al.*, 2005b). Inoltre, recenti evidenze hanno dimostrato il ruolo degli astrociti nell'accoppiamento dell'attività neuronale con il flusso sanguigno cerebrale (Gordon *et al.*, 2008; Hirase, 2005). Studi effettuati sia *in vitro* che *in vivo* a livello corticale indicano che il rilascio sinaptico di glutammato attiva i recettori metabotropici del glutammato presenti sugli astrociti. La stimolazione di questi recettori determina l'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ a

livello degli “end-feet” astrocitari con conseguente rilascio di acido arachidonico e dei suoi metaboliti, che infine portano a dilatazione delle arteriole (Takano *et al.*, 2006).

L’innovativa scoperta negli anni ’80, che gli astrociti esprimono un ampio repertorio di recettori per i neurotrasmettitori, spesso rispecchianti quelli presenti sulle sinapsi circostanti ha segnato una nuova era nel campo della ricerca sulla glia. Successivamente è stato evidenziato che questi recettori possono essere attivati dalla diffusione dei neurotrasmettitori durante l’attività sinaptica e determinare un aumento della $[Ca^{2+}]_i$ negli astrociti. Questo evento può a sua volta provocare il rilascio da parte degli astrociti di trasmettitori chimici detti “gliotrasmettitori”, come glutammato, ATP, D-serina, e portare alla comunicazione intercellulare tra astrociti e neuroni (Araque *et al.*, 1999). I gliotrasmettitori rilasciati dagli astrociti sono capaci di attivare i recettori neuronali e quindi modificare l’eccitabilità elettrica neuronale e la trasmissione sinaptica (Fellin *et al.*, 2004; Jourdain *et al.*, 2007; Santello *et al.*, 2008b; Schipke *et al.*, 2004). Queste osservazioni hanno portato al concetto di “tripartite synapses”, secondo il quale gli astrociti sono considerati essere il terzo elemento dell’unità di integrazione del segnale (Araque *et al.*, 1999; Volterra *et al.*, 2002).

Negli ultimi anni sono stati effettuati numerosi studi sul meccanismo di rilascio dei trasmettitori chimici dagli astrociti; tra tutti i gliotrasmettitori il glutammato è senza dubbio quello che ha ricevuto maggiori attenzioni. Il glutammato può essere rilasciato dagli astrociti attraverso diverse vie che sono attivate sotto diverse condizioni, su diversi siti e/o con differenti modalità. È stato descritto che il rilascio di glutammato può avvenire tramite processi Ca^{2+} -dipendenti o Ca^{2+} -indipendenti. Tra meccanismi Ca^{2+} -indipendenti troviamo: (i) la reversione dei trasportatori del glutammato, che si manifesta tipicamente in condizioni ischemiche (Rossi *et al.*, 2000); (ii) lo scambio con la cisteina, il substrato fondamentale per la produzione di glutatione da parte degli astrociti, mediato da specifici trasportatori cisteina-glutammato (Warr *et al.*, 1999); (iii) la permeazione molecolare attraverso larghi pori canali come il recettore purinergico $P2X_7$ (Duan *et al.*, 2003), emicanali “gap junction” (Ye *et al.*, 2003), canali anionici sensibili all’osmolarità (Kimelberg *et al.*, 1990). Il meccanismo di rilascio dei gliotrasmettitori Ca^{2+} -dipendente è

stato ben caratterizzato negli ultimi anni e rappresenta probabilmente uno dei più coinvolti nei processi fisiologici.

1.1.3 Rilascio di glutammato Ca^{2+} -dipendente dagli astrociti

Le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$ rappresentano un sofisticato meccanismo di “signaling” alla base di numerosi processi cellulari. È stato ben stabilito che le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$ negli astrociti provocano il rilascio dei gliotrasmettitori, che agiscono così sugli adiacenti neuroni, cellule gliali e vasi sanguigni. Negli ultimi 15 anni il numero di sostanze riconosciute come gliotrasmettitori è aumentato; tra questi ricordiamo il glutammato, l’ATP e il suo metabolita adenosina, la D-serina, il TNF- α e le prostaglandine (Volterra *et al.*, 2005b). Il meccanismo attraverso il quale avviene il rilascio dei gliotrasmettitori meglio caratterizzato è l’esocitosi (Bezzi *et al.*, 2004; Marchaland *et al.*, 2008). L’esocitosi è una forma rapida di rilascio di trasmettitori tipica dei neuroni e delle cellule neurosecretorie. Questo processo consiste nella fusione di vescicole ancorate al citoscheletro con la membrana plasmatica a cui segue il rilascio quantale del loro contenuto. Sebbene siano state pubblicate numerose evidenze che supportano l’esistenza di processi di esocitosi regolata negli astrociti, l’ipotesi che tale meccanismo sia responsabile del rilascio di gliotrasmettitori è un argomento ancora oggetto di discussione tra gli neuroscienziati. Alle numerose evidenze indirette a favore di questo presupposto, tra cui, l’identificazione delle proteine che prendono parte al processo esocitotico e la dimostrazione che i meccanismi di rilascio Ca^{2+} -dipendente sono sensibili agli inibitori e agli attivatori dell’esocitosi neuronale (Evanko *et al.*, 2004; Volterra *et al.*, 2005a), si oppongono una serie di obiezioni riguardanti l’esistenza di un compartimento vescicolare necessario per un processo di esocitosi regolata (Nedergaard *et al.*, 2002) e le differenze strutturali e funzionali tra le proteine coinvolte nel processo esocitotico sinaptico e quelle presenti sugli astrociti (Fiacco *et al.*, 2008).

Tuttavia, recentemente e tramite degli esperimenti di microscopia elettronica, è stato evidenziato che nel giro dentato dell’ippocampo, gli astrociti posseggono dei compartimenti vescicolari che esprimono il trasportatore vescicolare del glutammato

(VGLUT) e quindi dotati delle proteine necessarie per la ricaptazione e lo stoccaggio di tale trasmettitore (Bezzi *et al.*, 2004; Jourdain *et al.*, 2007). Morfologicamente, le queste vescicole astrocitarie assomigliano alle vescicole sinaptiche nonostante abbiano una disposizione meno densa ed ordinata (Bezzi *et al.*, 2004). Queste vescicole esprimono le proteine che intervengono nel processo esocitotico, come il recettore R-SNARE (“soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein”), la proteina associata alla membrana vescicolare 3 (VAMP3, conosciuta anche come cellubrevina) ed i trasportatori vescicolari del glutammato (VGLUTs). Le tre isoforme note dei VGLUTs (VGLUT 1-3) (Fremeau *et al.*, 2004) sono tutte espresse dagli astrociti, sebbene non da tutti gli astrociti (Bezzi *et al.*, 2004; Montana *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004b). Inoltre, essendo piccole e non elettrone-dense sono state classificate come “synaptic-like microvesicle” (SLMVs) (Bezzi *et al.*, 2004). Le stesse vescicole sono state studiate in tempo reale nelle colture corticali di astrociti tramite la microscopia a riflessione interna totale (TIRF); tramite questo sistema di imaging è stato dimostrato che in seguito all’attivazione dei recettori metabotropi del glutammato (mGluRI) avviene la fusione esocitotica Ca^{2+} -dipendente di tali vescicole (Bezzi *et al.*, 2004; Cali *et al.*, 2008; Crippa *et al.*, 2006; Marchaland *et al.*, 2008). L’esocitosi regolata negli astrociti è stata successivamente studiata e confermata con l’ausilio di diverse tecniche: tramite misurazione della capacitance di membrana (Kreft *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004a) e tramite l’amperometria elettrochimica (Chen *et al.*, 2005).

Dal punto di vista funzionale, l’esocitosi astrocitaria ha delle caratteristiche peculiari. Rispetto alle sinapsi neuronali, gli eventi sono più lenti e le proteine coinvolte nel rilascio hanno una maggiore affinità per il Ca^{2+} (Kreft *et al.*, 2004; Marchaland *et al.*, 2008). Il rilascio dei gliotrasmettitori non è provocato dall’apertura di canali al Ca^{2+} che si verifica in seguito di un potenziale d’azione ma dall’attivazione di recettori accoppiati a proteine G (GPCRs), a cui segue l’aumento della concentrazione di 1,4,5-inositolo trifosfato (IP_3), che determina il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico (Bezzi *et al.*, 2004; Cali *et al.*, 2008; Domercq *et al.*, 2006; Marchaland *et al.*, 2008; Takano *et al.*, 2005). Le proteine coinvolte nel rilascio esocitotico dei gliotrasmettitori sono diverse da quelle dell’esocitosi neuronale. Studi di RT-PCR (“polymerase chain reaction after reverse

transcription”) e di immunocitochimica eseguiti *in situ* e su astrociti isolati hanno evidenziato l’espressione di quattro proteine esocitotiche: SNAP23, la complessina 2, Munc18a e la sinaptogamina IV. Al contrario non è stata rilevata la presenza di SNAP25 e delle proteine sinaptiche associate alle vescicole quali sinaptogamina I, sinaptofisina, e la glicoproteina delle vescicole sinaptiche 2 (SV2) (Wilhelm *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004a; Zhang *et al.*, 2004b). Da un punto di vista funzionale VAMP3 potrebbe sostituire VAMP2, di cui non è certa l’espressione sugli astrociti in tessuto (Bezzi *et al.*, 2004; Chilcote *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2004b). Inoltre, SNAP23 al posto di SNAP25 potrebbe essere il motivo dell’aumentata sensibilità al Ca^{2+} dell’esocitosi (Chierregatti *et al.*, 2004; Chierregatti *et al.*, 2005). Probabilmente il rilascio dei gliotrasmettitori non è la semplice conseguenza dell’aumento della $[Ca^{2+}]_i$, in molti casi infatti, il rilascio di glutammato indotto dall’attivazione dei recettori GPCR viene soppresso bloccando la sintesi di prostaglandine e/o di TNF- α (Bezzi *et al.*, 1998; Bezzi *et al.*, 2001a; Domercq *et al.*, 2006; Pasti *et al.*, 2001). Il ruolo di questi mediatori non è ancora chiarito, probabilmente essi potrebbero agire in maniera autocrina o paracrina in modo da aumentare il rilascio di Ca^{2+} tramite attivazione dei loro recettori (Bezzi *et al.*, 1998; Bezzi *et al.*, 2001a; Domercq *et al.*, 2006; Sanzgiri *et al.*, 1999). Inoltre, va sottolineato che il rilascio dei gliotrasmettitori può essere modificato dalla contemporanea attivazione di altri recettori che vanno a determinare una cooperazione positiva o negativa. Per esempio, l’attivazione dei recettori AMPA, che da sola non determina rilascio di glutammato, potenzia il rilascio di tale trasmettitore indotto dai recettori mGluRI (Bezzi *et al.*, 1998; Bezzi *et al.*, 2001a). Al contrario, l’attivazione degli mGluRs e dei recettori noradrenergici di tipo α_1 è un esempio di cooperatività negativa (Muyderman *et al.*, 2001).

1.1.4 Ruolo degli astrociti nelle patologie neurodegenerative

Diverse evidenze indicano che esiste una risposta infiammatoria alla base di numerosi disordini neurodegenerativi (Centonze *et al.*, 2007; Zipp *et al.*, 2006). Questa condizione è caratterizzata da specifici cambiamenti morfologici e funzionali di astrociti e

microglia generalmente definiti come “attivazione gliale” ed è associata al “upregulation” di diversi geni ed alla secrezione di fattori quali citochine, eicosanoisdi, speci reattive dell’ossigeno (ROS), anione nitrossido (NO^-) ed amminoacidi eccitatori (Perry *et al.*, 1995). In questo contesto va ricordato che, l’attivazione della glia può sia mediare effetti protettivi sia può contribuire ad esacerbare il danno neuronale (Maragakis *et al.*, 2006). Fino a qualche anno fa, tuttavia, non era stato individuato nessun ruolo specifico per gli astrociti nel corso delle patologie del SNC. Attualmente, invece, stanno emergendo sempre maggiori evidenze che attribuiscono alle alterazioni dell’interazione tra astrociti e neuroni il meccanismo alla base di diversi disordini neurologici (Miller, 2005). Infatti, quasi tutte le fasi della gliotrasmissione e dell’eccitazione astrocitaria risultano alterate in condizioni patologiche. Per esempio è stato visto che le oscillazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ attraverso le quali gli astrociti determinano il loro rilascio di glutammato e sincronizzano i neuroni circostanti (Fellin *et al.*, 2004) sono stimulate durante l’attività neuronale epilettiforme (Aguado *et al.*, 2002; Hirase *et al.*, 2004); inoltre esperimenti *in vivo* condotti con il microscopio a due fotoni hanno mostrato che diversi farmaci antiepilettici tra cui valproato, gabapentin e fenitoina, riducono i segnali di Ca^{2+} degli astrociti (Tian *et al.*, 2005). Nel caso dell’ischemia, è stato osservato che sugli astrociti ippocampali vengono espressi i recettori NMDA, che in condizioni fisiologiche sono assenti su queste cellule, e per settimane sono in grado di generare specifici segnali di Ca^{2+} . Questi cambiamenti possono compensare i recettori NMDA presenti sugli neuroni danneggiati e prevenire, almeno in parte, la degenerazione delle fibre afferenti (Krebs *et al.*, 2003). È dimostrato inoltre, che gli astrociti adulti sono in grado di legare, internalizzare e degradare la proteina β -amiloide che si accumula nelle placche che caratterizzano il morbo di Alzheimer (Wyss-Coray *et al.*, 2003); questa azione protettiva degli astrociti potrebbe essere diminuita nel morbo d’Alzheimer poiché gli astrociti che circondano le placche sembrano incapaci di rimuovere la β -amiloide (Wyss-Coray *et al.*, 2003).

Infine, alterazioni nel rilascio di glutammato Ca^{2+} -dipendente dagli astrociti si manifestano in patologie infiammatorie che portano ad diffuso danno neuronale come la “Human Immunodeficiency virus (HIV)-Associated Dementia” (HAD), una sindrome neurologica, caratterizzata da disordini cognitivi e motori, che si manifesta in un numero

rilevante di pazienti adulti ed in età pediatrica affetti da AIDS (Bezzi *et al.*, 2001a; Price *et al.*, 1988).

1.1.5 Il TNF- α astrogliale come mediatore della neurodegenerazione associata all'HAD

In vista del controllo esercitato da prostaglandine e TNF- α sul rilascio di glutammato Ca²⁺-dipendente dagli astrociti, l'eccessiva produzione di questi mediatori durante la neuroinfiammazione potrebbe determinare un eccessivo rilascio di glutammato dagli astrociti che può essere tossico per i neuroni. A supporto di questa ipotesi, è stato dimostrato che, accanto ai trasmettitori come glutammato ed ATP, anche la chemochina SDF-1 α (stromal-derived factor 1 α) determina rilascio di glutammato Ca²⁺-dipendente dagli astrociti (Bezzi *et al.*, 2001a; Cali *et al.*, 2008). L'SDF-1 α agisce attraverso la stimolazione del suo specifico recettore CXCR4 che è un recettore accoppiato a G proteine. Questo processo è accompagnato dalla produzione di TNF- α che, una volta rilasciato da dagli astrociti, agisce in maniera autocrina o paracrina sul suo recettore p55 (TNF receptor type-1, TNFR1). A sua volta, l'attivazione del recettore TNFR1 controlla una cascata di eventi segnale, comprendente la produzione di PGE₂, l'aumento del [Ca²⁺]_i ed il rilascio di glutammato. Quest'ultimo effetto è bloccato dagli inibitori dell'esocitosi Bafilomicina A1 e neurotossina tetanica (Fig. 1.2 A). Il recettore CXCR4 è espresso anche sulla microglia; la sua stimolazione determina un potente rilascio di TNF- α , che avviene, tuttavia, solo quando la microglia è in uno stato "reattivo". La stimolazione del CXCR4 presente sulla microglia non induce rilascio di glutammato. Al contrario, la contemporanea stimolazione del recettore CXCR4 su coculture di astrociti e microglia determina una drammatica amplificazione del rilascio di TNF- α da entrambi i tipi cellulari e, come conseguenza, in un forte aumento del rilascio di glutammato Ca²⁺-dipendente dagli astrociti. Infine, esperimenti eseguiti su colture ippocamali di neuroni, astrociti e microglia hanno evidenziato che l'eccessivo rilascio di glutammato dagli astrociti, indotto dalla microglia e quindi dal TNF- α , risulta essere eccitotossico e determinare l'apoptosi della popolazione neuronale (Fig. 1.2 B).

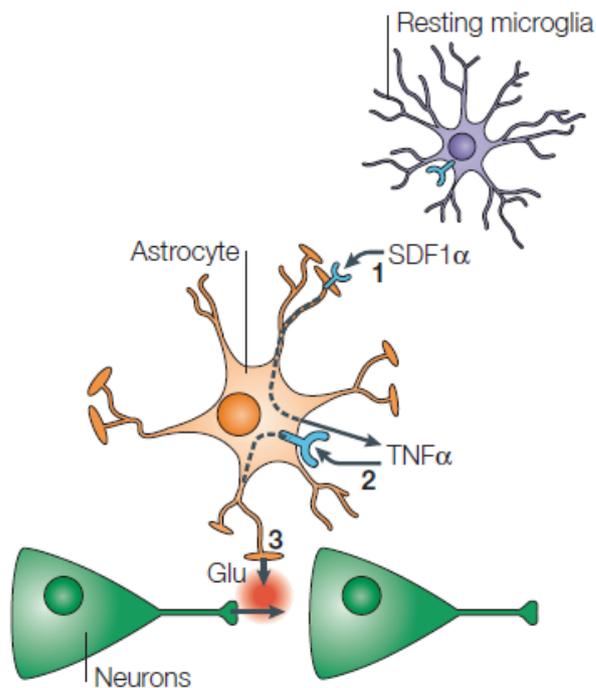
L'identificazione del signaling che segue all'attivazione del recettore CXCR4 descrive inanzitutto un nuovo ruolo per il TNF- α nella comunicazione rapida tra astrociti e neuroni, ma fornisce anche un ipotetico meccanismo (Bezzi *et al.*, 2001a) per spiegare i processi neurodegenerativi che caratterizzano la sindrome neurologica associata all'AIDS (Kaul *et al.*, 2001; Kaul *et al.*, 2005).

Precedenti evidenze suggeriscono che durante la progressione della malattia si verifica morte neuronale per apoptosi (Bagetta *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996) mediata probabilmente attraverso un meccanismo eccitotossico mediato dall'NMDA. È noto che le cellule della microglia, e non i neuroni, vengono infettate in seguito alla penetrazione del virus dell'HIV nel cervello, pertanto si suppone che la morte neuronale avvenga in maniera indiretta attraverso all'attivazione di microglia ed astrociti (Kaul *et al.*, 2001; Kaul *et al.*, 2005; Meucci *et al.*, 1996; Toggas *et al.*, 1996). In questo contesto, svolgono un ruolo cruciale le proteine virali, in particolare la proteina del capsido dell'HIV gp120, rilasciata dalle cellule infettate. Infatti in topi transgenici in cui è stata indotta l'espressione della gp120 si osservano danni cerebrali paragonabili, per tipologia ed entità, a quelli rilevabili in pazienti affetti da HAD (Toggas *et al.*, 1994). È stato scoperto che la gp120 agisce come agonista dei recettori CXCR4 sia negli astrociti che nella microglia e, analogamente al ligando endogeno SDF-1 α , determina un potente rilascio di glutammato dagli astrociti dipendente dal TNF- α (Bezzi *et al.*, 2001a). Visto che la produzione e il rilascio della proteina virale nel cervello dei soggetti infettati è un processo incontrollato, non è improbabile che in conseguenza dell'eccessiva stimolazione del recettore CXCR4 sulle cellule gliali da parte della gp120, si verifichi un eccessivo rilascio di glutammato che determina la morte eccitotossica dei neuroni (Fig. 1.4 B). Infatti, nel modello in vitro, è stata ottenuta neuroprotezione bloccando l'attivazione del recettore CXCR4, il rilascio di TNF- α , la formazione di prostaglandine, oppure eliminando il glutammato o bloccando i recettori NMDA (Bezzi *et al.*, 2001a).

La terapia antiretrovirale non controlla completamente le neuropatologia associata all'AIDS, ma prolunga significativamente le aspettative di vita dei soggetti affetti di AIDS. Pertanto sono necessari nuovi target terapeutici per limitare lo sviluppo dell'HAD ed

assicurare a questi pazienti una migliore qualità di vita. Studi clinici condotti con la memantina, un inibitore del recettore canale NMDA, hanno dimostrato che può essere di aiuto limitare l'eccitotossicità.

A Normal conditions



B AIDS-related neuropathology

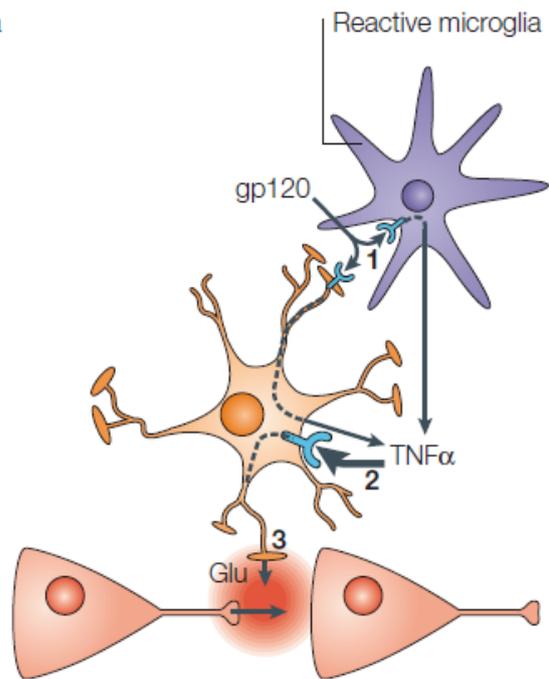


Fig. 1.2 Ruolo della microglia nella conversione del rilascio di glutammato indotto dalla stimolazione del CXCR4 nel pathway neurotossico del neuro-AIDS. (A) Negli astrociti, il legame della chemochina SDF-1 α ("stromal-derived factor-1 α ") al suo specifico recettore CXCR4 (1), determina una serie di eventi che provocano il rilascio di TNF- α (tumour necrosis factor- α) nello spazio extracellulare. L'interazione del TNF- α con il suo recettore (2) attiva una seconda sequenza di eventi intracellulari che portano al rilascio di glutammato Ca²⁺-dipendente (3), che modula l'attività sinaptica. La microglia è coinvolta in questo processo. (B) Nel neuro-AIDS le cellule microgliali infettate dall'HIV divengono reattive, si avvicinano agli astrociti e rilasciano proteine virali tra cui la gp120. La gp120 stimola il recettore CXCR4 sia negli astrociti che nella microglia (1). Entrambi i tipi cellulari contribuiscono sinergicamente al rilascio di elevati livelli di TNF- α con un aumento dell'attivazione dei suoi recettori astrocitari (2), e il conseguente rilascio di elevate quantità di glutammato (3). Ciò causa danno e morte neuronale. (Volterra *et al.*, 2005b).

1.2 Il sistema endocannabinoide

1.2.1 Dalla “*Cannabis*” al sistema endocannabinoide

La marijuana (*Cannabis sativa*) rappresenta una delle più diffuse sostanze di abuso della società occidentale grazie alla sua capacità di alterare la percezione sensoriale e indurre euforia (Iversen, 2000). Tuttavia, accanto alle proprietà psicoattive fin dal terzo millennio a.C. sono note le proprietà medicinali degli estratti di *Cannabis*, che veniva utilizzata per la sua efficacia antiemetica, analgesica e anticonvulsiva. (Mechoulam, 1986). Fino alla prima metà del secolo scorso, era diffusa l'idea che, data la natura altamente lipofila dei componenti della *Cannabis*, la marijuana determinasse i suoi effetti in maniera aspecifica tramite la perturbazione della membrana lipidica (Lawrence *et al.*, 1975). La prima importante scoperta che ha messo fine a questa ipotesi è stata l'identificazione della struttura chimica del principale componente psicoattivo della marijuana, il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) (Mechoulam *et al.*, 1965) e la conseguente dimostrazione che gli effetti biologici siano da attribuire allo stereoisomero *l* del composto (Mechoulam *et al.*, 1967) che è uno dei 60 cannabinoidi presenti nella pianta (Dewey, 1986) (Fig. 1.3). Questa scoperta portò all'intensificarsi delle ricerche in questo campo fino all'identificazione dei recettori su cui agisce il Δ^9 -THC, detti recettori cannabici di tipo 1 (CB1R) espressi in abbondanza a livello del sistema nervoso centrale (Egertova *et al.*, 2003), e di tipo 2 (CB2R) espressi prevalentemente a livello periferico (Howlett *et al.*, 2004). Analogamente a quanto accaduto negli anni 70 quando la scoperta dei recettori che venivano attivati dai componenti del *Papaver somniferum* (oppio) portò all'identificazione di encefaline, β -endorfine e dinorfine (Minami *et al.*, 1995), la scoperta dei recettori cannabici spinse alla ricerca dei ligandi endogeni in grado di attivarli, e alla fine degli anni 90 furono isolati e caratterizzati l'*N*-arachidonoiletanolamina, detta anandamide (AEA) (dal sanscrito “ananda” che significa estasi) (Devane *et al.*, 1992) ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995) entrambi

derivati dell'acido arachidonico che rappresentano i prototipi meglio conosciuti dei cosiddetti "endocannabinoidi" (Fig. 1.3).

Gli endocannabinoidi, il Δ^9 -THC e gli agonisti sintetici dei recettori cannabinici attivano diverse vie di trasduzione del segnale attraverso la stimolazione dei recettori CB1 e CB2 (Mackie, 2006). È noto che AEA e 2-AG non sono conservate all'interno di vescicole secretorie ma vengono biosintetizzati "on demand" a partire da uno stimolo recettoriale e attraverso il clivaggio di precursori lipidici tramite attività enzimatiche Ca^{2+} -dipendenti (Di Marzo *et al.*, 2004). Gli endocannabinoidi vengono quindi rilasciati dalla cellula immediatamente dopo la loro sintesi, attivano i loro target molecolari e successivamente vengono rimossi dallo spazio extracellulare attraverso un rapido meccanismo di "uptake" a cui segue l'idrolisi intracellulare (Fezza *et al.*, 2008). Gli endocannabinoidi, i recettori su cui agiscono, e le proteine coinvolte nella loro sintesi, rilascio, trasporto e degradazione, costituiscono il sistema endocannabinoide (Bari *et al.*, 2006) (Fig 1.4).

Attualmente, il sistema endocannabinoide rappresenta un sistema di "signaling" intracellulare molto promettente da un punto di vista terapeutico, in quanto coinvolto in numerosi processi fisiopatologici (Pacher *et al.*, 2006).

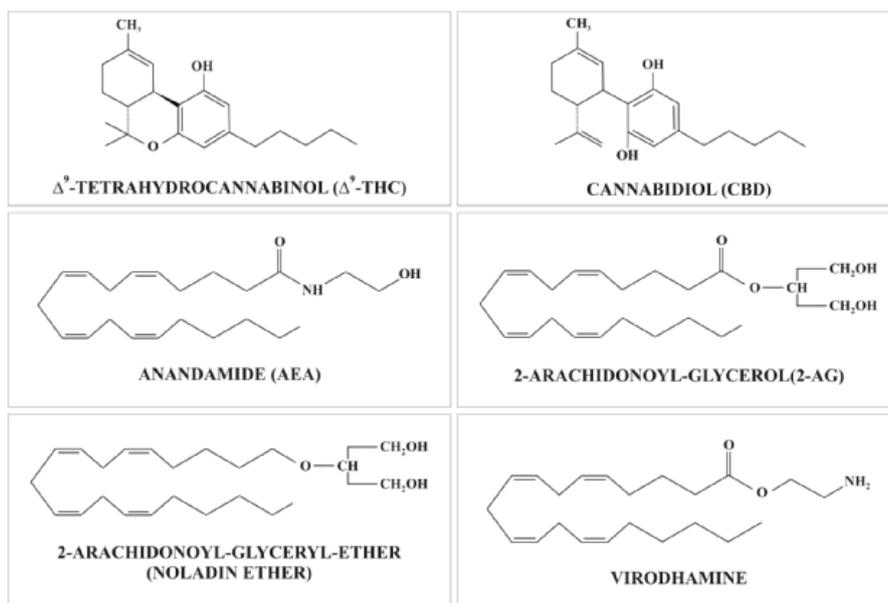
1.2.2 Gli endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi sono un gruppo di amidi, esteri, ed eteri di acidi grassi a lunga catena polinsaturi, presenti in diversi tessuti umani ed in grado di mimare gli effetti farmacologici del Δ^9 -THC. L'anandamide (AEA) e il 2-AG sono i composti più studiati e meglio conosciuti di questa classe di mediatori lipidici (Piomelli, 2003). Altri endocannabinoidi sono il noladin etere (2-arachidonil gliceride etere) (Mechoulam, 2002), l'*N*-arachidonoil dopamina (NADA) (Huang *et al.*, 2001) e la virodamina (Walker *et al.*, 2002), di cui sono poco noti il loro significato biologico e le caratteristiche biochimiche.

L'AEA agisce come agonista parziale del recettore CB1, ed ha bassa affinità per il recettore CB2, su cui può agire anche come antagonista (Gonsiorek *et al.*, 2000), inoltre attiva anche il recettore vanilloide di tipo 1 (transient receptor potential vanilloid 1,

TRPV1). Il 2-AG agisce come agonista pieno sia del recettore CB1 che del recettore CB2. I suoi livelli basali nel cervello sono di due ordini di grandezza superiori rispetto a quelli dell'anandamide (Sugiura *et al.*, 2006). Il noladin etere mostra più affinità per i recettori CB1 che per i CB2 (Hanus *et al.*, 2001). La virodamina o anandamide inversa, agisce come antagonista del recettore CB1 e parziale agonista del CB2 (Porter *et al.*, 2002), anche se la sua rilevanza biologica non è ancora chiara (Richardson *et al.*, 2007). Inoltre, la NADA attiva il recettore CB1 con più affinità che il CB2, ed è agonista del recettore vanilloide (Huang *et al.*, 2002). Sono stati identificati altri derivati di acidi grassi chiamati "endocannabinoid like" poiché non attivano i recettori cannabici, ma potenziano l'azione di AEA e 2-AG attraverso un meccanismo definito "entourage effect" (De Petrocellis *et al.*, 2004). Tra questi ci sono la palmitoiletanolamina (PEA), la stearoiletanolamina (SEA), l'oleoiletanolamina (OEA). Dai dati di letteratura emerge che la PEA è in grado di indurre effetti antiinfiammatori, analgesici (Calignano *et al.*, 1998), ed anticonvulsivanti (Terrazzino *et al.*, 2004); la SEA è un immunomodulatore (Murillo-Rodriguez *et al.*, 2006); l'OEA si comporta come soppressore dell'appetito (Richardson *et al.*, 2007; Schreiber *et al.*, 2007).

A.



B.

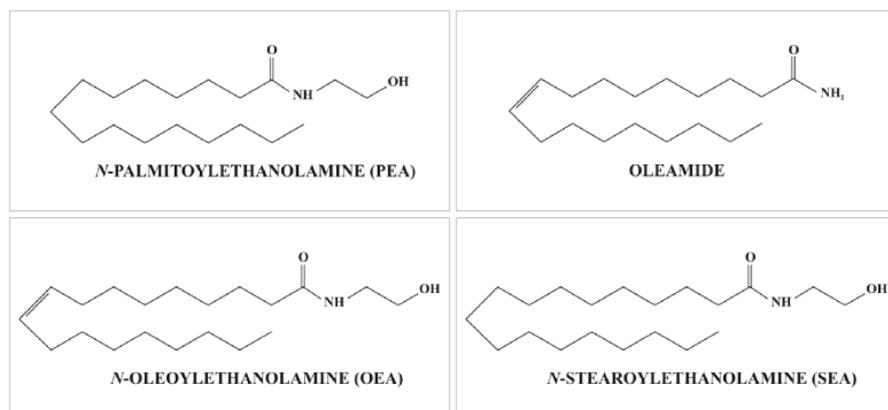


Fig. 1.3 (Endo)cannabinoidi. (A) Strutture chimiche dei principali cannabinoidi ed endocannabinoidi e (B) dei composti “endocannabinoid-like” con maggiore rilevanza biologica.

1.2.3 Biosintesi ed inattivazione di AEA e 2-AG

Nel corso degli ultimi anni sono state identificate diverse vie metaboliche per la sintesi ed il catabolismo di AEA e 2-AG (Di Marzo *et al.*, 2007).

L'AEA ed il 2-AG vengono sintetizzati e rilasciati "on demand" in seguito ad uno stimolo recettoriale sia dai neuroni (Di Marzo *et al.*, 1994) che da astrociti (Walter *et al.*, 2002) e microglia (Carrier *et al.*, 2004). È stato dimostrato inoltre che cellule microgliali di topo in coltura sono in grado di produrre una quantità di endocannabinoidi 20 volte maggiore rispetto ai neuroni ed agli astrociti (Walter *et al.*, 2003).

Le AEA viene sintetizzata a partire dai glicerofosfolipidi di membrana tramite un processo costituito da due passaggi. Il primo step è il trasferimento del gruppo *sn*-acilico di fosfolipidi sull'ammina primaria della fosfatidiletanolamina per formare il precursore N-arachidonoilfosfatidiletanolamina (NArPE). Questa reazione è catalizzata da una *trans*-acilasi Ca^{2+} dipendente (*N*-aciltransferasi, NAT) (Sugiura *et al.*, 2002), tuttavia di recente è stata individuata una fosfatidiletanolamina *N*-aciltransferasi Ca^{2+} indipendente capace ugualmente di sintetizzare il precursore dell'AEA (Jin *et al.*, 2007). Il secondo step è l'idrolisi del NArPE che porta alla formazione di AEA e acido fosfatidico, catalizzata da una specifica *N*-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) fosfolipasi D (NAPE-PLD) (Okamoto *et al.*, 2004). Attraverso questa via biosintetica si formano anche altre *N*-aciletanolammine (NAEs) (Alexander *et al.*, 2007). Inoltre, un'altra via attraverso la quale può essere generata l'AEA consiste nel clivaggio del NArPE catalizzato da una fosfolipasi C che porta alla formazione di fosfo-AEA, che viene defosforilata tramite l'azione di una fosfatasi ad AEA (Liu *et al.*, 2006). Una terza via di biosintesi dell'AEA consiste in una doppia deacilazione della NAPE che porta alla formazione di lyso-NAPE e di seguito glicerofosfo-NAE, che viene rapidamente clivato alla NAE corrispondente (Simon *et al.*, 2008).

Il 2-AG è un agonista pieno sia dei recettori CB1 che dei recettori CB2, mentre l'AEA è un agonista parziale del recettore CB1 ed ha bassa affinità per il recettore CB2 (Sugiura *et al.*, 2006). La via biosintetica del 2-AG parte dalla formazione del suo precursore diacilglicerolo (DAG) che si forma dall'idrolisi dei fosfolipidi di membrana per

opera della PLC o della fosfolipasi dell'acido fosfatidico. Il DAG è a sua volta convertito in 2-AG dalla *sn*-1-DAG lipasi (DAGL) (Bisogno *et al.*, 2003). In alternativa, il fosfatidilinositolo (PI) viene convertito a *lyso*-PI dalla fosfolipasi-A₁ (PLA₁), e così la PLC rilascia 2-AG (Sugiura *et al.*, 2006).

L'attività biologica di AEA e 2-AG termina attraverso due processi: la ricaptazione all'interno della cellula e la successiva degradazione intracellulare.

L'esistenza di una proteina responsabile del trasporto dell'AEA attraverso la membrana plasmatica è un argomento ancora dibattuto (Glaser *et al.*, 2005) in quanto gli endocannabinoidi data la loro natura lipidica sono in grado di attraversare la membrana plasmatica per diffusione passiva o attraverso un processo di endocitosi (Mechoulam *et al.*, 2005; Oddi *et al.*, 2008). Infatti, nonostante esistano delle numerose evidenze a favore della presenza di un selettivo trasportatore di membrana (Beltramo *et al.*, 1997; Hillard *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2005), non è stata ancora effettuata l'identificazione molecolare e genetica di questa proteina. Anche l'uptake del 2-AG sembra essere mediato dallo stesso trasportatore dell'AEA (Beltramo *et al.*, 2000; Bisogno *et al.*, 2001), così chiamato trasportatore di membrana degli endocannabinoidi (EMT).

In ogni caso, una volta all'interno della cellula l'AEA viene degradata in acido arachidonico (AA) ed etanolamina (McKinney *et al.*, 2005) dall'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (fatty acid amide hydrolase, FAAH). È stato riportato che questo enzima è espresso a livello dei neuroni e degli astrociti corticali e dei gangli della base del cervello umano, sovrapponendosi con il recettore CB1 (Romero *et al.*, 2002). Tuttavia, studi effettuati sul cervello ratto non confermano l'espressione della FAAH nelle cellule gliali (Tsou *et al.*, 1998).

La FAAH è una serina idrolasi, di ~63 KDa, che mostra la sua massima attività a pH 9 (Cravatt *et al.*, 1996). Attraverso studi di cristallizzazione molecolare è stato dimostrato i) la FAAH è un omodimero legato alle membrane intracellulari attraverso le C-liche 18 e 19 (Patricelli *et al.*, 1999) ii) la FAAH presenta un insolita triade catalitica serina-serina-lisina (Ser241-Ser217-Lys142) lungo una serie di canali che formano una "porta citosolica" e una "porta catalitica" (Bracey *et al.*, 2002). Questa particolare

caratteristica della struttura garantisce l'accesso simultaneo dei substrati alla proteina dalla membrana e dal lato citosolico della cellula (Fezza *et al.*, 2008). La FAAH è in grado di idrolizzare diverse ammidi degli acidi grassi *in vitro*, e controllare il tono endogeno dell'AEA *in vivo* (Cravatt *et al.*, 2001). Inoltre la FAAH è in grado di idrolizzare diverse monocilgliceridi *in vitro* (Goparaju *et al.*, 1998) partecipando al loro processo di degradazione. Recentemente è stata caratterizzata una nuova FAAH-2 che mostra una minore selettività per l'AEA ed una maggiore attività idrolitica per le catene aciliche monosaturate (Wei *et al.*, 2006). È stato osservato, che il dominio catalitico C-terminale della FAAH e della FAAH-2 sono posti rispettivamente nei compartimenti citoplasmatico e luminare della cellula, suggerendo che questi due enzimi possano contribuire in maniera diversa al catabolismo delle FAAs *in vivo* (Wei *et al.*, 2006). Infine, va ricordato che l'AEA costituisce un buon substrato per l'amidasi acida delle N-acil-etanil-amine (NAAA) (Tsuboi *et al.*, 2005).

La degradazione del 2-AG è dovuta principalmente all'azione della monoacilglicerolo lipasi (MAGL) una proteina citosolica di 33 KDa che converte il 2-AG in AA e glicerolo. La MAGL è stata isolata per la prima volta nel cervello di maiale (Goparaju *et al.*, 1999), e successivamente clonata e caratterizzata nel cervello di ratto (Dinh *et al.*, 2002) e in cellule di origine umana (Ho *et al.*, 2002). Inoltre, è stata identificata anche, una MAGL aspecifica espressa dalle cellule della microglia (Muccioli *et al.*, 2007). Il 2-AG viene metabolizzato anche da altre lipasi identificate di recente, l' $\alpha\beta$ -idrolasi6 (ABH6) e $\alpha\beta$ -idrolasi12 (ABH12), come pure dalla FAAH (Blankman *et al.*, 2007).

Sia l'AEA che il 2-AG, nelle condizioni in cui l'attività della FAAH e della MAGL sono sopresse, possono diventare substrato della ciclossigenasi 2 (COX2) e determinare quindi, un aumento dei corrispondenti derivati idroperossidi. Questi derivati possono allora essere convertiti in etanolamidi delle prostaglandine (prostamidi) o in esteri del glicerolo delle prostaglandine per opera di diverse prostaglandine sintasi (Rouzer *et al.*, 2008). Questi metaboliti sono inattivi sui recettori cannabici, ma sembrano agire su altri target

molecolari di cui si hanno evidenze farmacologiche ma non molecolari (Rouzer *et al.*, 2008; Woodward *et al.*, 2008).

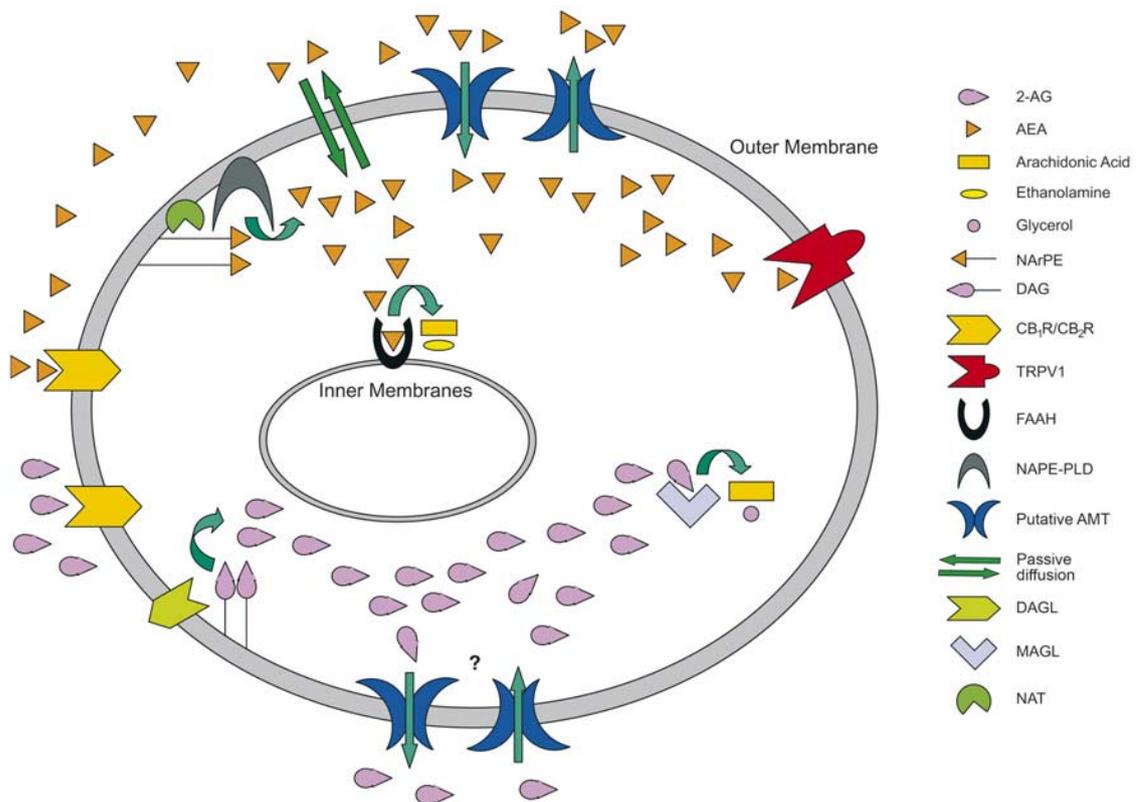


Fig. 1.4 Il sistema endocannabinoide. Gli endocannabinoidi più studiati sono due derivati dall'acido arachidonico, l'anandamide (N-arachidonoiletanolamina, AEA) e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG). L'AEA si forma attraverso il taglio di un precursore fosfolipidico l'N-arachidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) catalizzato da una specifica fosfolipasi D (NAPE-PLD). Il NAPE, a sua volta, è sintetizzato dall'enzima N-aciltransferasi (NAT), Ca^{2+} -dipendente, che catalizza il trasferimento dell'acido arachidonico dalla fosfatidilcolina al gruppo finale della fosfatidiletanolamina. L'attività biologica dell'AEA è terminata dalla sua rimozione dallo spazio extracellulare operata da un putativo trasportatore di membrana ad alta affinità (AMT). Una volta all'interno della cellula, l'AEA viene idrolizzata dalla FAAH (idrolasi delle ammidi degli acidi grassi) che scinde il legame ammidico e rilascia acido arachidonico (AA) ed etanolamina. Analogamente all'AEA, il 2-AG si forma attraverso il clivaggio di un precursore lipidico mediante l'azione di una specifica diacilglicerololipasi (DAGL). In seguito il 2AG subisce un rapido trasporto all'interno della cellula, dove viene degradato da una specifica monoacilglicerolo lipasi (MAGL). Sia l'AEA che il 2-AG attivano i recettori CB₁ e CB₂. L'AEA ma non il 2-AG, è un ligando del recettore vanilloide di tipo 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) (Centonze *et al.*, 2007).

1.2.4 Recettori per gli endocannabinoidi

Una volta rilasciati dalle cellule gli endocannabinoidi agiscono su specifici recettori esercitando così i loro effetti. Gli endocannabinoidi interagiscono con: (i) recettori cannabici di tipo 1 (CBR1) e di tipo 2 (CBR2); (ii) recettori di tipo non CB1/non-CB2; (iii) recettori non cannabinoidei (Howlett, 2002; Khanolkar *et al.*, 2000; Mackie, 2006; Pertwee, 2000; Pertwee, 1997; Reggio *et al.*, 2000).

I recettori CB1 sono presenti preferenzialmente nel cervello e nel midollo spinale, anche se in piccola quantità si trovano anche nei tessuti periferici (Devane *et al.*, 1988; Herkenham *et al.*, 1990). I recettori CB2 sono localizzati preferenzialmente a livello del sistema immunitario (milza e tonsille) (Cabral *et al.*, 1998; Howlett, 2002), sebbene recentemente siano stati individuati nel cervello sia sui neuroni (Van Sickle *et al.*, 2005) che sulla microglia (Benito *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2006). Il recettore CB1 è ampiamente distribuito a livello di: gangli della base (*substantia nigra* e *pallidum*), cervelletto, ippocampo e corteccia limbica; inoltre la sua presenza è stata riscontrata anche nel midollo e nelle terminazioni nervose sensoriali (Begg *et al.*, 2005; Howlett *et al.*, 2002). Tale distribuzione anatomica suggerisce che gli endocannabinoidi siano coinvolti in circuiti neuronali legati alla coordinazione e la regolazione dei movimenti; a processi cognitivi superiori come i meccanismi di memoria e di ricompensa; alla risposta allo stress e al dolore; alla regolazione del sonno, della temperatura corporea, dell'appetito, della nausea e del vomito (Di Marzo *et al.*, 2004; Freund *et al.*, 2003; Howlett, 2002; Lange *et al.*, 2005; Mechoulam *et al.*, 2003). Infine, recenti evidenze mostrano che il recettore CB1 è presente anche su astrociti e microglia (Howlett, 2002; Massi *et al.*, 2008; Pazos *et al.*, 2005; Stella, 2004).

I recettori CB1 e CB2 sono stati clonati e caratterizzati (rispettivamente da Matsuda *et al.*, 1990; e da Munro *et al.*, 1993). Entrambi appartengono alla super famiglia dei recettori a 7 domini transmembrana e sono accoppiati prevalentemente a proteine G di tipo inibitorio. Esiste un'omologia del 44% tra le sequenze dei 2 recettori a livello proteico, questa omologia arriva al 68% a livello transmembranario (Lutz, 2002). L'attivazione del recettore CB1 determina un complesso meccanismo di trasduzione del segnale che si

esplica attraverso (i) l'inibizione dell'adenilato ciclasi che determina aumento della concentrazione di cAMP (Childers, 2006; Rhee *et al.*, 1998); (ii) la regolazione di correnti ioniche (inibizione dei canali al Ca^{2+} voltaggio dipendenti di tipo L, N e P/Q; attivazione di canali al K^+) mediata dalla subunità $\beta\gamma$ della proteina G (Twitchell *et al.*, 1997); (iii) l'attivazione della via delle MAP Kinasi (p44/42 MAP kinasi, p38 kinasi, JUN-terminale Kinasi) (Bouaboula *et al.*, 1995b; Galve-Roperh *et al.*, 2002). Tuttavia, recentemente sono stati evidenziati altri meccanismi di signaling associati all'attivazione del recettore CB1, tra i quali l'accoppiamento alla proteina $G_{q/11}$ (Lauckner *et al.*, 2005) suggerendo una vasta eterogeneità di trasduzione del segnale. Analogamente al recettore CB1, l'attivazione del recettore CB2 determina l'inibizione dell'adenilato ciclasi e l'attivazione della via delle MAP kinasi, tuttavia non è in grado di modulare le correnti ioniche (Fernandez-Ruiz *et al.*, 2007). Inoltre recenti evidenze mostrano che la stimolazione del recettore CB2 determina l'attivazione della via delle ceramidi (Carracedo *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2001). In generale, in seguito alla loro attivazione i recettori CB1 vengono fosforilati (Garcia *et al.*, 1998) ed internalizzati (Hsieh *et al.*, 1999), inoltre è noto che se lo stimolo di attivazione è breve essi possono essere riciclati all'interno della membrana plasmatica (Hsieh *et al.*, 1999). Al contrario, i recettori CB2, sembrano essere costitutivamente attivi nella forma fosforilata (Bouaboula *et al.*, 1999), non è chiaro se in seguito alla stimolazione del recettore avvenga la defosforilazione e quale potrebbe essere la natura di questo segnale endogeno (Bouaboula *et al.*, 1999).

Numerose evidenze suggeriscono l'esistenza di altri tipi di recettori cannabinici non completamente caratterizzati quali: (i) il recettore GPR55, un recettore orfano accoppiato a proteine G (Ryberg *et al.*, 2007; Sawzdargo *et al.*, 1999); (ii) l'"abnormal cannabidiol receptor" che viene attivato preferenzialmente dal "abnormal cannabidiol" ma anche dall'AEA, e determina effetti vasodilatatori attraverso la depolarizzazione delle cellule muscolari lisce (Begg *et al.*, 2005; Jarai *et al.*, 1999).

Infine è noto che l'AEA, ma non il 2-AG, è in grado di attivare il recettore vanilloide di tipo 1 ("transient receptor potential vanilloid 1", TRPV1), una proteina di 838 aminoacidi costituita da sei domini transmembrana, che genera un poro nella regione situata tra il 5 ed il 6 segmento (Caterina *et al.*, 1997). Questo canale cationico non selettivo, permeabile

prevalentemente al Ca^{2+} , viene attivato dalla capsaicina, il principio attivo del peperoncino rosso, dalla resiniferatossina e da stimoli nocivi come calore e diminuzione del pH (Szallasi *et al.*, 2007). Il TRPV1 è stato inizialmente descritto come mediatore della risposte indotte da stimoli nocicettivi poiché abbondante sui neuroni bipolari dei gangli delle corna dorsali midollari (DRG) (Zygmunt *et al.*, 1999); tuttavia di recente è stato evidenziato che i recettori vanilloidi sono localizzati in diverse strutture cerebrali (Marinelli *et al.*, 2003; Mezey *et al.*, 2000) pertanto l'attività endovanilloide dell'AEA può svolgere un controllo fisiologico delle funzioni cerebrali.

Recenti evidenze mostrano anche che gli endocannabinoidi sono in grado di attivare i membri della famiglia dei recettori nucleari "peroxisome-proliferator-activating receptors" (PPARs, con tre isoforme α , β (δ) e γ) che mediano la differenziazione cellulare ed il metabolismo lipidico (O'Sullivan, 2007). Anandamide e 2-AG determinano effetti antiinfiammatori attraverso l'interazione con il PPAR- γ . (Rockwell *et al.*, 2004; Rockwell *et al.*, 2006).

1.2.5 Ruolo fisiologico degli endocannabinoidi a livello del sistema nervoso centrale

Gli endocannabinoidi agiscono come messaggeri retrogradi a livello del SNC (Wilson *et al.*, 2002), modulando la trasmissione sinaptica e prendendo parte a diversi processi della fisiologia cerebrale. In particolare, è noto che l'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nel neurone postsinaptico che si verifica in seguito ad un impulso nervoso, attiva gli enzimi responsabili della sintesi degli endocannabinoidi, che una volta rilasciati legano il recettore CB1 che ha una localizzazione presinaptica (Wilson *et al.*, 2001a). L'attivazione del recettore CB1 presinaptico determina la chiusura dei canali al Ca^{2+} con conseguente inibizione del rilascio di neurotrasmettitore (Freund *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2002). Quando il neurotrasmettitore rilasciato è inibitorio, come il GABA, questo fenomeno viene chiamato Soppressione dell'Inibizione indotta dalla Depolarizzazione (SDI) (Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001b) e causa l'attivazione del neurone postsinaptico (Chevalere *et al.*, 2006). Al contrario, se il neurotrasmettitore rilasciato è eccitatorio, come il glutammato, il fenomeno viene definito Soppressione dell'Eccitazione indotta

dalla Depolarizzazione (SDE) (Kreitzer *et al.*, 2001a; Kreitzer *et al.*, 2001b), e determina l'inibizione del neurone postsinaptico. Questo indica che il ruolo di un dato endocannabinoide può essere eccitatorio o inibitorio in base alle caratteristiche del circuito neuronale su cui agisce, inoltre tale ruolo è influenzato anche dall'attività basale dei canali al Ca^{2+} (Freund *et al.*, 2003). Recentemente è stato visto che l'attività degli endocannabinoidei come messaggeri retrogradi si manifesta anche in seguito all'attivazione sinaptica dei recettori metabotropici del glutammato di tipo I (mGluRI) (Jung *et al.*, 2005; Varma *et al.*, 2001) ed ai recettori dopaminergici di tipo D2 (Melis *et al.*, 2004). SDI e SDE sono considerati processi con un ruolo chiave anche a livello della plasticità sinaptica (Chevalerey *et al.*, 2006). È stato dimostrato che l'AEA è capace di inibire la formazione di nuove sinapsi, ciò porta a considerare l'interessante possibilità che il sistema endocannabinoide possa regolare il numero delle sinapsi funzionali (Abel, 1970; Tart, 1970). I fenomeni di "long-term potentiation" (LTP) e "long-term potentiation" (LTD) a livello delle zone CA3-CA1 rappresentano il correlato elettrofisiologico dei meccanismi di apprendimento e memoria. È stato dimostrato che l'attivazione dei recettori CB1 inibisce l'induzione sia dell'LTP che dell'LTD nell'ippocampo (Stella *et al.*, 1997; Sullivan, 2000); inoltre è stato mostrato che a livello striatale e del *nucleus accumbens* (NAc) l'LTD è assente in topi "knockout" per il recettore CB1, e viene ridotta o eliminata dal trattamento con il rimonabant (antagonista selettivo del recettore CB1), e potenziata dal trattamento con l'HU-210 (un cannabinoide sintetico), suggerendo che l'LTD a livello striatale e del NAc possa essere mediata dagli endocannabinoidei rilasciati come messaggeri retrogradi (Gerdeman *et al.*, 2002; Robbe *et al.*, 2002). Infine gli endocannabinoidei sono in grado di controllare l'eccitabilità neuronale, infatti l'attivazione dei recettori CB1 presenti a livello dei terminali glutammatergici a livello della corteccia prefrontale, abolisce le EPSCs nel V strato di fettine corticali di ratto (Auclair *et al.*, 2000).

Recentemente, inoltre, è stato evidenziato un interessante coinvolgimento degli endocannabinoidei nella comunicazione bidirezionale tra astrociti e neuroni (Navarrete *et al.*, 2008). In particolare, è stato dimostrato che gli astrociti ippocampali posseggono il recettore CB1 la cui attivazione, tramite gli endocannabinoidei rilasciati in seguito alla depolarizzazione dei neuroni piramidali della zona CA1, determina mobilitazione di Ca^{2+}

dai depositi intracellulari. L'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ determina quindi la stimolazione del rilascio di glutammato, che a sua volta va ad attivare i recettori extrasinaptici del tipo NMDA, presenti sui neuroni a livello dendritico, tramite un meccanismo di feedback. In queste condizioni vengono evocate lente correnti depolarizzanti (slow inward current, SIC) nei neuroni piramidali (Navarrete *et al.*, 2008), che probabilmente sono coinvolte nei processi di sincronizzazione neuronale (Fellin *et al.*, 2004). Questi dati suggeriscono quindi che esiste una modulazione fisiologica da parte degli endocannabinoidi di origine neuronale sul rilascio di glutammato da parte degli astrociti, che a loro volta modulano la trasmissione sinaptica (Jourdain *et al.*, 2007).

1.2.6 Ruolo antinfiammatorio e neuroprotettivo degli (endo)cannabinoidi

Esistono numerose evidenze che supportano l'idea che gli endocannabinoidi abbiano effetti neuroprotettivi ed antinfiammatori in diverse neuropatologie correlate al danno cerebrale acuto, alla neurodegenerazione e all'infiammazione (Centonze *et al.*, 2007; Maccarrone, 2008). In questo contesto è stato ipotizzato che il rilascio di endocannabinoidi durante i processi di danno neuronale potrebbe rappresentare una risposta protettiva (Marsicano *et al.*, 2003). Infatti, è stato dimostrato come i cannabinoidi esogeni o endogeni siano in grado di determinare neuroprotezione in diversi modelli sperimentali di danno neuronale sia *in vitro* che *in vivo* (Sarne *et al.*, 2005; van der Stelt *et al.*, 2005).

Per esempio, la somministrazione del Δ^9 -tetraidrocannabinolo riduce la perdita neuronale ed il danno cerebrale che si verificano in modelli di eccitotossicità ed ischemia (van der Stelt *et al.*, 2001). Analogamente, l'AEA e il 2-AG endogeni determinano un'azione neuroprotettiva nei confronti dell'eccitotossicità indotta dal danno cerebrale acuto (Panikashvili *et al.*, 2001; Veldhuis *et al.*, 2003). Inoltre, la somministrazione del cannabinoide sintetico WIN-55,212-2 conferisce neuroprotezione in modelli di ischemia cerebrale *in vivo* ed *in vitro* (Nagayama *et al.*, 1999) e in un modello di encefalopatia ischemica-ipossica neonatale (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006). È stato suggerito, inoltre, che i cannabinoidi possano limitare i processi neuro infiammatori nella sindrome

neuropatologica associata all'AIDS (HAD), data la loro capacità di modulare l'attivazione della microglia (Ehrhart *et al.*, 2005). Inoltre, recentemente è stato dimostrato che l'inibitore della FAAH, metil-arachidonil-fluotrofosfato (MAFP) riduce l'apoptosi dei neuroni corticali indotta dalla glicoproteina del capsido dell'HIV, gp120 (Maccarrone *et al.*, 2004).

Questa attività neuroprotettiva avviene attraverso differenti meccanismi tra i quali: (i) la prevenzione dell'eccitossicità mediante l'inibizione del rilascio di glutammato grazie all'attivazione del recettore CB1, presente sui terminali glutammatergici che determina la chiusura dei canali al Ca^{2+} (Monory *et al.*, 2006); (ii) la riduzione dell'influsso di Ca^{2+} sia a livello pre- che postsinaptico, seguito dall'inibizione della cascata di eventi dannosi dovuta all'eccesso di Ca^{2+} ; (iii) l'attività antiossidante dovuta principalmente ai gruppi fenolici di vari cannabinoidi simili al resorcinolo; (iv) l'attivazione della via di sopravvivenza della fosfatidilinositolo 3-kinasi e protein chinasi B; (v) induzione della fosforilazione di chinasi extracellulari finemente regolate; (vi) induzione dell'espressione di fattori di trascrizione e neurotrofine. Inoltre, è interessante notare che gli (endo)cannabinoidi migliorano i sintomi che caratterizzano diverse neuropatologie anche attraverso la modulazione della biologia cellulare delle cellule gliali (Galve-Roperh *et al.*, 2008). Infatti, gli endocannabinoidi interagiscono con i recettori presenti sugli astrociti ed aumentano la velocità di chetogenesi e di ossidazione del glucosio (Stella, 2004), un effetto importante considerando che queste cellule svolgono ruoli chiave a livello della sopravvivenza neuronale in condizioni di ischemia. Inoltre, gli endocannabinoidi sono capaci di modulare la produzione di nitrossido e citochine da parte di astrociti e cellule microgliali (Eljaschewitsch *et al.*, 2006; Ortega-Gutierrez *et al.*, 2005).

Queste osservazioni sottolineano il potenziale terapeutico dei cannabinoidi, e dei composti che agiscono sugli elementi del sistema endocannabinoide, come agenti efficaci nella cura di varie neuropatologie (Fowler, 2005). Tuttavia, nonostante i potenziali benefici di tali composti il loro uso clinico è limitato a causa dei loro effetti psicotropici (Mechoulam *et al.*, 2007).

1.3 Scopo della tesi

Sulla base delle evidenze sperimentali riportate l'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare il coinvolgimento degli (endo)cannabinoidi nei processi infiammazione cerebrale e di comunicazione sinaptica mediati dagli astrociti. Nello studio è stato pertanto voluto:

- a) determinare il ruolo del sistema endocannabinoide in un modello sperimentale di neuro-AIDS indotto dal trattamento delle cellule di astrocitoma umano U373MG con la proteina del capsido dell'HIV, gp120. In particolare è stato testato se l'azione della gp120 fosse in grado di modificare l'attività degli enzimi responsabili del metabolismo di AEA e 2-AG;
- b) valutare l'effetto della gp120 sul rilascio di TNF- α ; e determinare se la modulazione farmacologica di tale rilascio attraverso i target coinvolti nella sintesi e degradazione degli endocannabinoidi fosse in grado di indurre effetti neuroprotettivi;
- c) indagare sulla capacità degli astrociti in coltura di indurre il rilascio di glutammato in seguito alla stimolazione del recettore CB1, ed in particolare individuare attraverso quali meccanismi cellulari questo possa avvenire. Lo studio del rilascio di glutammato dagli astrociti è stato effettuato mediante microscopia TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) che costituisce lo stato dell'arte tra i microscopi a fluorescenza per lo studio delle cinetiche di esocitosi e riciclaggio degli organelli intracellulari (Almers & Streirs 2001).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Reagenti

I reagenti utilizzati hanno il massimo grado di purezza analitica. L' $[^3\text{H}]$ AEA (205 Ci/mmol), il $[^3\text{H}]$ CP55.940 (126 Ci/mmol), l'*sn*-1-stearoil-2- $[^{14}\text{C}]$ arachidonoil-glicerolo ($[^{14}\text{C}]$ DAG; 56 mCi/mmol) e la $[^3\text{H}]$ Resiniferatossina ($[^3\text{H}]$ RTX; 43 Ci/mmol) sono stati acquistati dalla Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA). L'*N*- $[^3\text{H}]$ arachidonoylphosphatidylethanolamine ($[^3\text{H}]$ NArPE; 200 Ci/mmol) e il 2-oleoyl- $[^3\text{H}]$ glycerol ($[^3\text{H}]$ 2-OG; 20 Ci/mmol) sono stati acquistati presso l'ARC (St. Louis, MO). Il NArPE non radioattivo è stato sintetizzato a partire dall'acido arachidonico e dalla fosfatidiletanolammina come riportato in precedenza (Schmid *et al.*, 1983). L'URB597 è della Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). La Iodo-Resiniferatossina (IRTX) è della Tocris-Cookson (Bristol, UK). La metanandamide (MetAEA) è dell'Alexis Biochemical. L'SR141716A e l'SR144528 sono stati una gentile donazione della Sanofi-Aventis Recherche (Montpellier, France). La glicoproteina ricombinante, del virus dell'HIV, gp120IIIB (espressa dal baculovirus; > 90% purezza ottenuta tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide-sodio dodecil sulfato) è stata acquistata dalla Fitzgerald Industries Intl, (Concord, MA, USA). Tutti gli altri reagenti usati sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

2.2 Colture cellulari e trattamenti per gli esperimenti di biochimica

Le cellule di astrocitoma umano U373MG gentilmente fornite dalla Prof.ssa Daniela Parolaro (Università di Insubria, Italia), sono state cresciute a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. Le cellule sono state piastrate in fiasche da coltura da 75cm² in terreno DMEM completato con siero bovino fetale inattivato (10% v/v), sodio piruvato (1% v/v), L-glutammina (2mM), Aminoacidi non essenziali (1% v/v) penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 microg/ml).

Dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno senza siero (cellule controllo) o con terreno senza siero addizionato con la gp120IIIIB (1-200 pM) o lipopolisaccaride (LPS) (1µg/ml) per 1 ora. Il tempo di incubazione e le concentrazioni di gp120 usate in questi esperimenti sono state selezionate, in seguito all'analisi di diverse condizioni (1-24 ore, 10-200 pM). L'inibitore selettivo della FAAH, URB597 (1µM), è stato applicato alle cellule 15 minuti prima dell'aggiunta della proteina virale, e negli studi di antagonismo recettoriale, l'SR141716A (1 µM), la I-RTX (1µM), il GW9662 (5 µM) sono stati addizionati al medium cellulare 15 minuti prima della somministrazione dell'URB597. Dopo ogni trattamento, la vitalità delle cellule è stata determinata tramite la colorazione delle cellule con Trypan Blue (0.4 % peso/volume).

2.3 Saggio di vitalità cellulare MTT

La vitalità delle cellule U373MG trattate con la gp120 è stata misurata tramite il saggio colorimetrico dell'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (giallo) viene ridotto a formazano (viola) nei mitocondri delle cellule viventi (Mosmann, 1983). In queste condizioni è possibile valutare l'attività mitocondriale, misurando la quantità di formazano che si forma tramite spettrometria. Pertanto, alla fine di ogni trattamento, le cellule sono state lavate con PBS, e sono stati aggiunti 50 µL di una soluzione alla concentrazione di 5 mg/mL di MTT in PBS. Dopo 2 h di incubazione a 37°C, la soluzione di MTT è stata rimossa, ed i cristalli di formazano insolubili che si sono formati sono stati dissolti in 70 µL dimetilsofossido. L'assorbanza emessa dal formazano è stata misurata a 590 nm tramite uno spettrofotometro per piastre da 96 pozzetti (BS1000 Spectra Count, Packard Bell).

2.4 Studi di Binding

Per effettuare gli studi di binding ai recettori cannabinici ed al recettore vanilloide sono state preparati estratti di membrana dalle cellule U373MG (Maccarrone *et al.*, 2005). Le cellule (10×10^6) sono state pellettate e risospese in 4 ml di buffer A (Tris-EDTA 2 mM,

saccarosio 320 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7.4), omogeneizzate tramite potter e centrifugate a 1000 x g a 4°C per 10 minuti. Il surnatante ottenuto è stato prelevato ed unito ai surnatanti ottenuti da altre due successive centrifugazioni a 1000 x g del pellet. Il surnatante complessivo è stato poi centrifugato a 40000 x g a 4°C per 30 minuti ed il pellet risultante è stato risospeso in buffer B (Tris-HCl 50 mM, Tris-EDTA 2 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 7.4) alla concentrazione proteica di 1 mg/ml. L'estratto di membrana è stato diviso in aliquote, rapidamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C per non più di una settimana. La concentrazione delle proteine è stata determinata con il metodo Bradford, usando come standard l'albumina di siero bovino (BSA) (Bradford, 1976).

Gli estratti di membrana ottenuti (50 µg di proteine/punto) sono stati incubati con l'agonista dei recettori cannabici [³H]CP 55.940 (400pM) in un volume finale di 0.5 ml di buffer C (Tris-HCl 50 mM, Tris-EDTA 2 mM, MgCl₂ 3 mM, BSA 2,5 mg/ml, PMFS 50 µM, pH 7.4) per 1 h a 30 °C, e sottoposti a un rapido processo di filtrazione (van der Stelt *et al.*, 1997). I filtri dopo essere stati lavati, sono stati trasferiti in vials contenenti 0.5 ml di Triton X-100 (0.1% v/v) e 3.5 ml di liquido di scintillazione (LSC, Optic Fluor, Canberra Packard). Gli studi di binding del recettore vanilloide sono stati condotti con la stessa procedura descritta sopra utilizzando l'agonista del TRPV1 [³H]RTX (55 pM)

In tutti gli esperimenti il legame non specifico è stato determinato in presenza dell'agonista freddo alla concentrazione di 1 µM.

2.5 Ricaptazione degli endocannabinoidi

L'uptake dell' [³H]AEA e del [³H]2-AG attraverso il trasportatore di membrana (EMT) è stato determinato in cellule U373MG integre seguendo la procedura precedentemente descritta (Maccarrone *et al.*, 2000b). In breve, le cellule sono state lavate in PBS, staccate con tripsina-EDTA e risospese in PBS alla densità di 1x10⁶ cellule/ml. La sospensione cellulare (2 ml/punto) è stata incubata per 15 minuti, a 37 °C con [³H]AEA 1µM. o [³H]2-AG 1µM. Al fine dell'incubazione le cellule sono state lavate 3 volte con 2 ml di terreno di coltura contenente BSA (1%), ed infine risospese in 0.5 ml di metanolo e addizionate a 3.5 ml di liquido di scintillazione. Esperimenti controllo sono stati effettuati

a 4°C, per discriminare il trasporto dell'AEA o del 2-AG carrier-mediato da quello che avviene per diffusione attraverso la membrana cellulare.

2.6 Saggi di attività enzimatica

L'attività della NAPE-PLD delle cellule U373MG è stata valutata tramite un rapido e sensibile saggio enzimatico basato su HPLC a fase inversa in linea con un rivelatore β -counter (Fezza *et al.*, 2005). Le cellule, staccate e pellettate, sono state risospese in Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) e sonicate in ghiaccio. L'omogenato cellulare (100 μ g di proteine/punto) è stato incubato con una miscela di [3 H]NArPE and NArPE (attività specifica finale 6.8 nCi/nmol) in 0.2 ml di Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) contenente Triton X-100 allo 0.1%. La reazione è stata bloccata aggiungendo 0.6 ml di una soluzione di cloroformio/metanolo (2:1, v/v). In seguito, da ogni campione è stata estratta la fase organica e l'estratto lipidico, dissolto in metanolo è stato sottoposto ad analisi cromatografica. L'attività della NAPE-PLD viene espressa come pmol di [3 H]AEA rilasciate per minuto per mg di proteine.

L'attività della FAAH delle cellule U373MG è stata determinata tramite un saggio radiocromatografico (Maccarrone *et al.*, 2005). Le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA, risospese in PBS alla densità di 1×10^6 cellule/ml e centrifugate a $1000 \times g$ per 10 min. I pellet ottenuti sono stati risospesi in buffer A (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM, pH 7.4) e sonicati in ghiaccio utilizzando un sonicatore Vibracell (Sonics & Materials Inc.). L'omogenato è stato quindi diluito in buffer A alla concentrazione proteica di 1 mg/ml. In seguito 20 μ l di campione sono stati incubati in 0,2 ml di buffer B (Tris-HCl 50 mM, pH 9.0) con [3 H]AEA (10 μ M concentrazione finale) per 15 minuti a 37°C. La reazione è stata bloccata aggiungendo 0.8 ml di una soluzione di metanolo/cloroformio (2:1, v/v) freddo. Il substrato radioattivo e il prodotto sono stati estratti dalla miscela con acqua e cloroformio, successiva rimozione del surnatante ed essiccazione con Speed Vac (30°C, 180 mBar) per 30 minuti. L'estratto lipidico è stato dissolto in metanolo ed analizzato mediante HPLC a fase inversa con una colonna C18 e come eluente una miscela di metanolo/acqua/acido

acetico (85/15/0.1, v/v). L'attività dell'enzima viene espressa come picomoli di [³H]Acido Arachidonico rilasciato per minuto per milligrammo di proteine.

Per determinare l'attività della DAGL aliquote di omogenato di cellule (200 µg di proteine/test), preparate come riportato (Bisogno *et al.*, 2003), sono state incubate a 37°C per 15 min con [¹⁴C]DAG 10 µM. Successivamente una miscela di cloroformio/metanolo (2:1, v/v) viene aggiunta per bloccare la reazione e la fase organica estratta viene frazionata tramite cromatografia su strato sottile (TLC) di silice, usando piastre di polipropilene con cloroformio/metanolo/NH₄OH (85:15:0.1, v/v/v) come eluente. La quantità di [¹⁴C]2-AG rilasciato viene misurata tagliando le corrispondenti bande sulla TLC e leggendo la radioattività al β-counter.

L'attività della MGL è stata valutata nel supernatante di omogenato cellulare (200 µg di proteine/test), ottenuto a 100,000 g e incubato con [³H]2-OG 10 µM a 37°C per 30 min (Dinh *et al.*, 2002). La reazione viene interrotta con una miscela di cloroformio/metanolo (2:1, v/v), e la quantità di [³H]glicerolo prodotto, presente nella fase acquosa, viene misurato tramite conta in un LKB1214 Rackbeta "scintillation counter" (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

2.7 Determinazione dei livelli endogeni di AEA e 2-AG

I livelli endogeni di AEA e di 2-AG sono stati analizzati mediante un sistema di cromatografia liquida accoppiato a spettrometria di massa (HPLC-ESI-MS). Le cellule U373MG, trattate o meno con la gp120, sono state immediatamente congelate e conservate a -80 °C fino ad analisi. I campioni sono stati risospesi in 1 ml di metanolo contenente gli standard interni: d⁸-AEA, d⁸-2-AG, e successivamente sonicati in ghiaccio. Ad ogni campione sono stati aggiunti 2 ml di cloroformio ed 1 ml di acqua bidistillata. I campioni sono stati vortexati energicamente e centrifugati a 2000 rpm per 10 minuti a 4°C. La fase organica (600 µl) è stata prelevata ed essiccata sotto flusso di azoto. I campioni sono stati risospesi in 100 µl di metanolo e sottoposti ad analisi gas cromatografica. L'AEA e il 2-AG nella loro forma protonata (M⁺) sono stati identificati e quantificati attraverso

diluizione isotopica. I livelli endogeni sono stati espressi come picomoli per milligrammo di proteine.

2.8 Determinazione della concentrazione di TNF- α tramite tecnica ELISA

La concentrazione di TNF- α nel surnatante di cellule controllo o trattate con la gp120, è stata determinata seguendo il protocollo del Kit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) della Biosource International, Camarillo, CA. Tale metodo permette di determinare con elevata sensibilità la concentrazione di TNF- α del surnatante cellulare nel range tra 0.5-32 pg/mL.

2.9 Colture primarie di astrociti della corteccia cerebrale di ratti neonati

Le colture primarie di astrociti corticali sono state ottenute mediante dissociazione meccanica della corteccia cerebrale di ratti neonati (1 giorno postnatale, ceppo Sprague-Dawley), secondo la procedura precedentemente descritta (Bezzi *et al.*, 2001a). L'utilizzo di ratti neonati in combinazione con il medium di coltura usato sfavoriscono la crescita di cellule neuronali in questo tipo di colture. Brevemente, i ratti sono stati sacrificati, è stato espantato il cervello ed è stata isolata la porzione corticale. Successivamente il tessuto cerebrale è stato omogenato e centrifugato a 1000 g per 10 min. Il pellet ottenuto è stato poi risospeso in DMEM al 20% di fetal calf serum (FCS), piastrato su fiasche da 75 cm², ed incubate, per, 10-12 giorni, a 37°C in atmosfera umidificata costituita da il 95% di aria e dal 5% di CO₂. Una volta raggiunta la confluenza, dalle colture è stata rimossa la microglia tramite agitazione meccanica. In seguito le cellule sono state ripiastrate alla concentrazione di 10⁵ cellule/ml in dischi Petri dal diametro di 35 mm, su coverslips di vetro, per essere utilizzate negli esperimenti di imaging.

2.10 Immunocitochimica

Sulle colture di astrociti corticali è stata valutata l'espressione del recettore CB1 tramite una doppia marcatura immunocitochimica.

Le tecniche immunocitochimiche sfruttano reazioni antigene-anticorpo. L'anticorpo diretto contro una determinata proteina è individuato mediante il legame ad un anticorpo secondario coniugato ad una molecola che ne permette la visualizzazione, come i fluorocromi. Quando viene eseguita una doppia marcatura, vengono utilizzati anticorpi primari provenienti da specie animali diverse per evitare reazioni crociate.

Nel caso specifico, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4%, permeabilizzate con Triton-X-100 allo 0.1% , per 5 min, e successivamente incubate, overnight, a 4°C, con anticorpi diretti contro il recettore CB1 (1:250, ABR) e contro la proteina gliofibrillare acida GFAP (1:500, Chemicon) componente del citoscheletro degli astrociti. Gli anticorpi primari, anti-CB1 e anti-GFAP, sono stati visualizzati rispettivamente, con l'anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con il fluorocromo Alexa 488 (1:200), e con l'anticorpo secondario anti-mouse coniugato con il fluorocromo Alexa 555 (1:200). L'acquisizione delle immagini è stata effettuata con un microscopio confocale Leica SP5 (Leica Microsystem, Germany).

In questi ultimi anni, la microscopia confocale a scansione laser si è affermata come una potente tecnologia in grado di migliorare la qualità delle osservazioni in microscopia ottica. Un microscopio confocale si differenzia strutturalmente da un tradizionale microscopio a fluorescenza per l'utilizzo di una sorgente luminosa laser (che consente di migliorare drasticamente la qualità delle immagini grazie all'intensità e alla coerenza della luce emessa) e per la presenza di un sistema ottico ed elettronico che permette di effettuare la scansione di una sezione del campione osservato (sezione ottica), ricostruendo poi sullo schermo di un computer l'immagine risultante.

La lunghezze d'onda di emissione dei laser utilizzati per gli esperimenti sono 488 nm e 561nm Tutte le immagini sono state ottenute utilizzando il software LAS AF 6000 (Leica Microsystem, Germany). Esperimenti di controllo sono stati eseguiti in assenza

degli anticorpi primari diretti contro il CB1R e la GFAP, ed in queste condizioni sperimentali non è stata visualizzata alcuna fluorescenza.

2.11 Calcium imaging

I livelli di Ca^{2+} intracellulare ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) negli astrociti corticali sono stati monitorati in tempo reale usando l'indicatore fluorescente FLUO-4-AM (Molecular Probes) che in seguito al legame con il calcio va incontro ad un aumento della fluorescenza di emissione a 525 nm. Il FLUO-4-AM fa parte di una classe di composti fluorescenti acetossi metil derivati. Questi composti nella forma di estere sono molecole non polari insensibili al Ca^{2+} e sono quindi in grado di attraversare la membrana plasmatica. Una volta all'interno della cellula, questi composti sono soggetti all'azione idrolitica delle esterasi citosoliche che li rendono composti polari in grado di legare il Ca^{2+} . Un limite all'utilizzo di questa sonda è legato al fatto che non è una sonda raziometrica. Le sonde raziometriche (come il FURA-2) sono in grado di emettere luce fluorescente a 2 diverse lunghezze d'onda a seconda che siano o meno legate al Ca^{2+} , per cui è possibile ottenere un rapporto numerico risultante dal rapporto dell'intensità luminosa emessa dalla sonda quando non è legata al calcio e quella emessa quando la stessa interagisce con questo ione bivalente. Questo valore risulta essere molto importante nelle valutazioni di caricamento della cellula con la sonda in esame.

Gli astrociti corticali sono stati incubati con FLUO-4-AM per 15 min a 37°C al buio alla concentrazione finale di 200 nM nel buffer HEPES-KRH (NaCl 120 mM, KCl 3.1 mM, MgCl_2 2 mM, CaCl_2 1.8 mM, NaH_2PO_4 1.25 mM, HEPES-Na 25 mM, glucose 4 mM; pH 7.4). Alla fine dell'incubazione le cellule sono state lavate due volte con HEPES-KRH per eliminare gli eccessi di colorante e disposte in un microscopio a fluorescenza invertito, Zeiss Axiovert 200, modificato in modo da alternare l'illuminazione ad epifluorescenza (EPI) e l'illuminazione a fluorescenza dovuta alla riflessione totale interna (TIRF, vedere prossimo paragrafo) (Fig.2.1).

L'illuminazione EPI è capace di illuminare l'intero volume cellulare ed è stata utilizzata per determinare i livelli di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in singola cellula in seguito a stimolazione

locale, tramite microcapillare, con MetAEA (300 μ M, 5s), un agonista non selettivo dei recettori cannabici (Pertwee, 1997). Le cellule sono state esposte ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm generata da un policromatore (Visichrome, Visitron, Germany). L'emissione del FLUO-4-AM in seguito a stimolazione dei recettori cannabici, è stata raccolta attraverso un obiettivo 63X (Zeiss, Plan Apochromat) e diretta attraverso un filtro 515-565 band pass (Zeiss, set 10) ad una SNAP-HQ CCD camera (Roper Scientific) per l'acquisizione delle immagini. Durante gli esperimenti le cellule sono state selezionate visivamente seguendo i seguenti criteri: (i) cellule poligonali presenti in gruppi di due o tre e di grandezza non superiore a \sim 100 μ m; (ii) cellule con bassa fluorescenza basale di FLUO-4-AM. Le cellule particolarmente ramificate o allungate o con fluorescenza basale molto alta non sono state selezionate. Gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente ed al buio e le immagini sono state acquisite a 5Hz (con un tempo di esposizione di 200 ms per immagine).

A.



B.

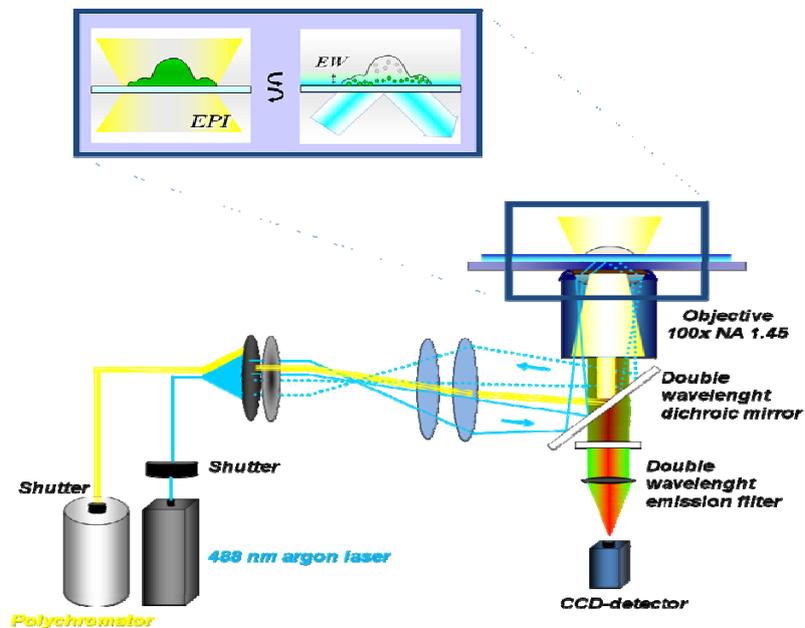


Fig. 2.1 (A) Immagine del setup “Dual Shutter” EPI/TIRF imaging e (B) sua rappresentazione schematica. Il setup ha la configurazione di un microscopio invertito modificato. La luce del laser, o del policromatore viene fatta passare attraverso uno shutter, controllato da un software, che è aperto solo durante l’esposizione alla camera. Prima di entrare nel microscopio la luce passa attraverso un sistema di lenti allineati con la porta del microscopio. Uno specchio dichroico riflette la luce di eccitazione nella lente dell’obiettivo e trasmette la luce di fluorescenza emessa dalla camera. In questo modo l’eccitazione e la raccolta di fluorescenza vengono effettuate tramite lo stesso obiettivo ad alta apertura numerica.

2.12 Studio dell'esocitosi mediante microscopia "Total Internal Reflection" o TIRF

Il rilascio esocitotico di glutammato dagli astrociti in seguito all'attivazione dei recettori cannabici è stato valutato mediante microscopia TIRF seguendo la procedura precedentemente descritta (Bezzi *et al.*, 2004).

La microscopia TIRF o ad onda evanescente consente di visualizzare con un'alta risoluzione spaziale e temporale i processi dinamici che si verificano nei pressi della membrana plasmatica quali secrezione dai granuli (Lang *et al.*, 1997; Steyer *et al.*, 1997), il riciclaggio di organelli intracellulari (Muallem *et al.*, 1995), gli eventi di trasduzione del segnale (Haugh *et al.*, 2000; Sako *et al.*, 2000) ed in particolare i meccanismi di eso-endocitosi (Albillos *et al.*, 1997; Ales *et al.*, 1999; Bezzi *et al.*, 2004; Cali *et al.*, 2008; Domercq *et al.*, 2006; Marchaland *et al.*, 2008). Infatti, sebbene la microscopia a fluorescenza permette di visualizzare specificatamente singole strutture tramite l'uso di proteine fluorescenti, non ha tuttavia la risoluzione sufficiente per studiare i processi che si verificano nei pressi della membrana plasmatica dove gli organelli in esame vengono reclutati in maniera transitoria ed in piccola quantità. Il microscopio TIRF potrebbe essere paragonato al microscopio confocale; entrambi sono capaci di visualizzare solo una porzione della cellula, ma solo il TIRF è adatto allo studio dei processi di eso-endocitosi per i seguenti motivi: (i) il microscopio confocale divide la cellula in porzioni che hanno uno spessore minimo di circa 0,5 μm mentre il TIRF può illuminare porzioni di cellula di soli circa 0.08-0.1 μm , pertanto il microscopio TIRF ha un minore background di fluorescenza; (ii) il microscopio confocale effettua una scansione puntiforme o lineare che rallenta notevolmente la formazione di un'immagine mentre il microscopio TIRF illumina istantaneamente l'intera porzione cellulare; come risultato il TIRF può acquisire immagini anche a 20-40 Hz (un'immagine ogni 25-50 ms).

Il sistema di illuminazione del microscopio TIRF si basa sulla formazione dell'onda evanescente che avviene quando un raggio di luce (solitamente proveniente da un laser) attraversa un mezzo ad alto indice di rifrazione (n_1), come il vetro, che si interfaccia con uno a più basso indice di rifrazione (n_2), come il buffer extracellulare o quello intracellulare delle cellule adese. Quando l'angolo di incidenza α è piccolo, la luce viene in

parte rifratta ed in parte riflessa propagandosi attraverso l'interfaccia; ma quando l'angolo dell'illuminazione α supera il cosiddetto "angolo critico" il raggio di luce viene riflesso totalmente nel mezzo a più alto indice di rifrazione (vetro) dando luogo alla riflessione totale interna ("total internal reflection"). Durante la riflessione totale del raggio luminoso, tuttavia, una parte di energia del raggio illuminante penetra nel mezzo meno denso (medium extracellulare) sottoforma di energia elettromagnetica e forma la cosiddetta "onda evanescente" (Fig. 2.2). Una proprietà importante dell'onda evanescente è che la sua energia diminuisce esponenzialmente allontanandosi dell'interfaccia; essa raggiunge un valore minimo dopo poche centinaia di nanometri (circa 100 nm). Pertanto, un'onda evanescente illumina selettivamente le molecole o gli organelli fluorescenti che si trovano nei pressi dell'interfaccia (e quindi della membrana plasmatica) lasciando in ombra le restanti strutture (Steyer *et al.*, 2001) (Fig. 2.2).

Come si può vedere dalla Fig. 2.1, per ottenere l'illuminazione TIRF un raggio espanso (laser argon 488 nm, 20 mw; Laserphysics), sincronizzato con una telecamera SNAP-HQ CCD (Roper Scientific), controllata dal software MetaFluor (Universal Imaging), viene fatto passare attraverso un obiettivo ad alta apertura numerica (Zeiss α -plan FLUAR 100X, 1.45 NA). La luce attraversa la coverslip con un angolo di 72,3-73,8° e viene totalmente riflessa a livello dell'interfaccia vetro-cellule. Nelle condizioni sperimentali usate, la profondità di penetrazione d dell'illuminazione TIRF è di 92 nm, calcolata considerando l'indice di rifrazione del vetro ($n=1.52$ a 488nm) e delle cellule ($n=1.38$) (Bezzi *et al.*, 2004; Cali *et al.*, 2008; Marchaland *et al.*, 2008).

Le vescicole glutammatergiche degli astrociti sono state visualizzate tramite trasfezione transiente del plasmide per la proteina chimerica fluorescente, formata dal trasportatore vescicolare per il glutammato di tipo 2 (VGLUT2) e da EGFP. Il VGLUT2-EGFP (1 μ g) è stato transfettato negli astrociti primari con il reagente di trasfezione Fugene6 (Roche). È stato scelto questo plasmide, piuttosto che il plasmide VGLUT1-EGFP, poiché ha una maggiore efficienza di trasfezione (Bezzi *et al.*, 2004).

Per visualizzare gli eventi di fusione delle vescicole glutammatergiche, dopo 2-3 giorni dalla trasfezione con VGLUT2-EGFP, gli astrociti sono stati caricati con un marker degli eventi di fusione vescicolare l' Acridine Orange (AO) (Molecular Probes) (Avery *et*

al., 2000; Tsuboi *et al.*, 2000) alla concentrazione di 5 μ M nel buffer HEPES-KRH per 15 min a 37°C al buio. L'AO è una base debole che passa facilmente la membrana plasmatica e si accumula preferenzialmente negli organelli acidi (come lisosomi, endosomi e vescicole sinaptiche Fig. 2.3 A). Quando è concentrata nei compartimenti acidi l'AO forma degli aggregati che possiedono un alta energia ("quench"); quando l'organello fonde con la membrana plasmatica l'AO viene rilasciata nello spazio extracellulare ed in seguito alla sua diluizione si ha un fenomeno di "dequencing"(cioè l'AO passa da una forma ad alta energia ad una forma a bassa energia) emettendo energia sottoforma di luce (flash di luce). Perciò grazie a questa proprietà possiamo seguire una singola fusione tramite la formazione dei flash di luce.

Subito dopo la fine dell'incubazione con AO, mediante microscopia TIRF abbiamo eccitato le cellule (la cui selezione segue i criteri precedentemente illustrati per gli esperimenti di misurazione del calcio in singola cellula) tramite l'onda evanescente proveniente da un laser (argon 488 nm), e stimolato tramite microperfusione locale di MetAEA 300 μ M, 5 s (similmente a quanto effettuato negli esperimenti di calcio in singola cellula). La dinamica della fusione delle singole vescicole è stata quindi, seguita in tempo reale prima e dopo l'applicazione locale dell'agonista. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata a 20 Hz (50 ms di esposizione per immagine).

Negli esperimenti di co-localizzazione tra VGLUT2-EGFP e AO le cellule sono state eccitate con un'unica lunghezza d'onda (laser argon 488 nm) e l'emissione verde proveniente dall'EGFP e rossa proveniente da AO sono state raccolte tramite due filtri uno che separa il verde dal rosso 535 \pm 10 nm *band pass* ed uno che separa il rosso dal verde 575 nm *long-pass* (Omega Optical) (Fig. 2.3 B).

2.13 Analisi delle immagini

Le immagini digitalizzate con il software MetaFluor, sono state analizzate con il software MetaMorph (Universal Imaging).

Negli esperimenti di misurazione delle dinamiche di calcio in singola cellula con EPI: tramite MetaFluor abbiamo posto una regione di interesse (ROI) sull'intero perimetro cellulare per valutare le variazioni di fluorescenza del FLUO-4-AM. La dinamica temporale della fluorescenza è stata espressa come $\Delta F/F_0$, dove F_0 rappresenta il livello di fluorescenza della cellula prima della stimolazione, e ΔF rappresenta i cambiamenti di fluorescenza che avvengono durante la stimolazione. I dati sono stati espressi come media \pm S.E.

Negli esperimenti di valutazione della dinamica di fusione delle vescicole glutammatergiche con TIRF: le singole fusioni sono state valutate in base ai cambiamenti di fluorescenza dell'AO. I cambiamenti di fluorescenza dell'AO sono stati contati come "singola fusione" solo quando (i) la fluorescenza aumentava bruscamente (in uno o due frame), (ii) si espandeva nello spazio extracellulare, (iii) scompariva (Bezzi *et al.*, 2004). La dinamica temporale della fluorescenza ($\Delta F/F_0$) rappresenta la somma dei singoli flashes per cellula. I dati sono stati espressi come media \pm S.E.

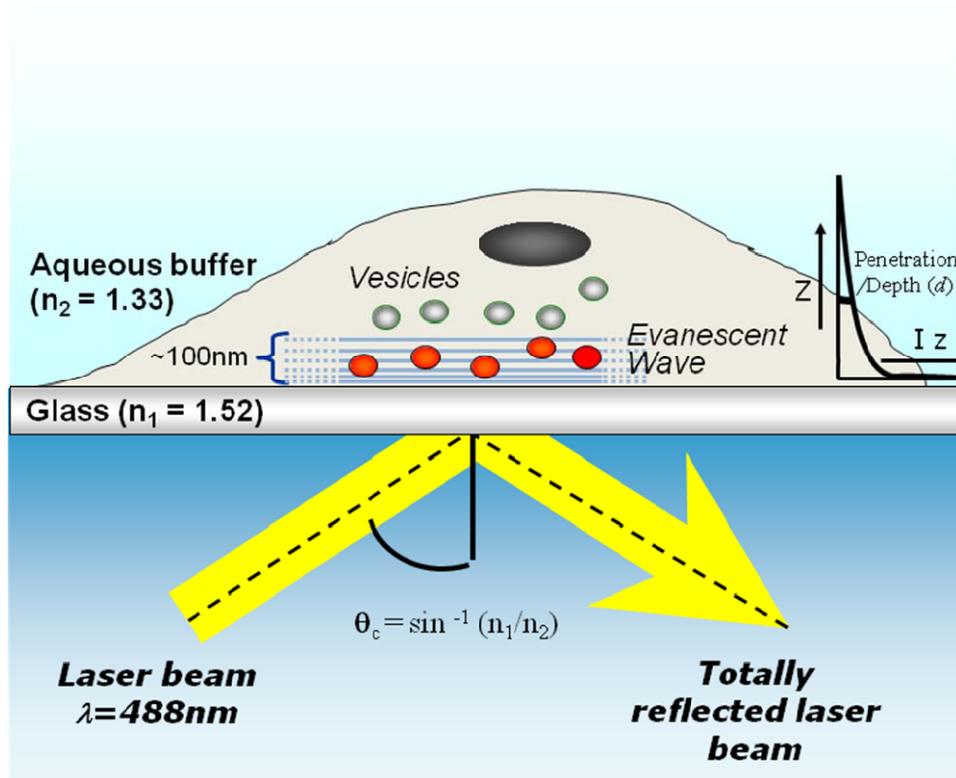
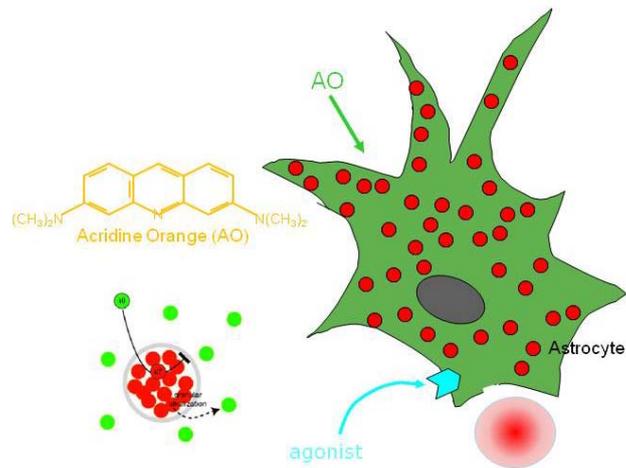


Fig. 2.2 Microscopia ad onda evanescente. Quando un raggio di luce parallelo colpisce una superficie con alto indice di rifrazione (n_1) che si interfaccia con un mezzo a più basso indice di rifrazione (n_2), questo viene riflesso totalmente all'interno del mezzo (n_1) se l'angolo di incidenza α supera il cosiddetto angolo critico. La riflessione totale verso l'interno genera un'onda evanescente nel mezzo a più basso indice di rifrazione. L'intensità dell'onda evanescente media diminuisce esponenzialmente con la distanza dell'interfaccia fino ad arrivare alla distanza d oltre la quale non si ha più energia.

A.



B.

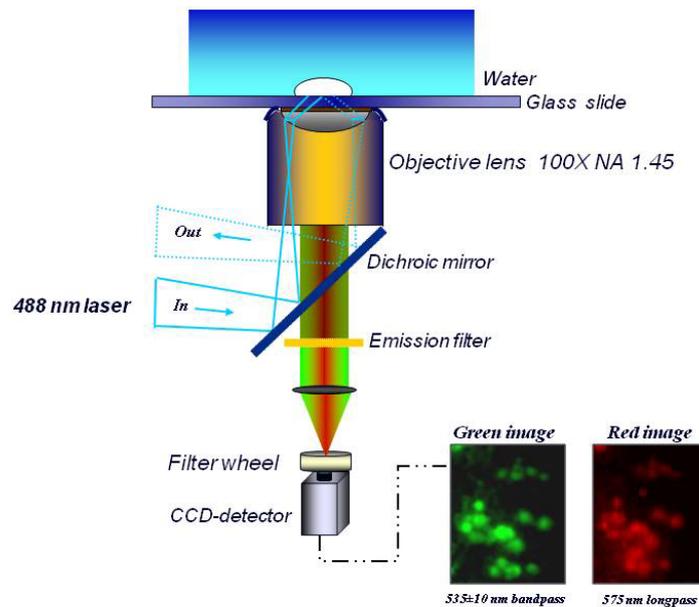


Fig. 2.3 Visualizzazione degli eventi di fusione mediante acridine orange (AO). (A) Gli astrociti trasfettati con il plasmide VGLUT2-EGFP vengono incubati con AO, un colorante che si accumula nei compartimenti acidi della cellula e quindi anche all'interno delle vescicole VGLUT+. L'AO quando è concentrata emette fluorescenza nel rosso. Una stimolazione che determina la fusione delle vescicole con la membrana plasmatica, e quindi la diluizione dell'AO, provoca la comparsa di flash di luce. (B) Le vescicole VGLUT+ e caricate con AO vengono visualizzate con un microscopio "dual windows" tramite il quale si eccita il campione con un'unica lunghezza d'onda (488 nm) e tramite l'uso di filtri si raccolgono le emissioni di fluorescenza proveniente dal rosso e dal verde.

3. RISULTATI

3.1 Le cellule di astrocitoma umano U373MG possiedono un sistema endocannabinoide funzionale

Studi precedenti hanno evidenziato che esiste un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nei meccanismi di neurodegenerazione indotti dalla somministrazione nella corteccia cerebrale di ratto (somministrazione *in vivo*) della proteina del capsid dell'HIV gp120 (Maccarrone *et al.*, 2004). Numerose evidenze sperimentali hanno inoltre dimostrato come le cellule gliali svolgano un ruolo fondamentale nella neurotossicità indotta dalla gp120 (Bezzi *et al.*, 2001a; Kaul *et al.*, 2001; Meucci *et al.*, 1996). In virtù delle suddette osservazioni, in questo lavoro di tesi, è stato valutato il ruolo degli endocannabinoidi sui meccanismi cellulari delle cellule gliali tramite i quali la gp120 agisce. Nella prima parte dello studio sono state utilizzate le cellule di astrocitoma umano U373MG. Come emerge dai dati di letteratura, le cellule U373MG (i) risultano essere un bersaglio del virus dell'HIV, che è capace di essere internalizzato e di replicarsi al loro interno (Sancho *et al.*, 2005), e (ii) possiedono i recettori funzionali per le chemochine (Mahajan *et al.*, 2005) sui quali la gp120 agisce come agonista (Atchison *et al.*, 1996). È inoltre noto, che questa linea cellulare esprime il recettore CB1 (Bouaboula *et al.*, 1995a; Gomez del Pulgar *et al.*, 2000; Rinaldi-Carmona *et al.*, 2004), pertanto risulta essere particolarmente adatta per investigare i fenomeni che coinvolgono gli (endo)cannabinoidi.

Al fine di evidenziare chiaramente se i recettori degli (endo)cannabinoidi fossero espressi sulle cellule di astrocitoma umano U373MG sono stati effettuati studi di binding. Per prima cosa, è stato dimostrato che queste cellule sono in grado di legare il cannabinoide sintetico [³H]CP55.940, che possiede elevata affinità sia per il recettore CB1 che per il recettore CB2 (Pertwee, 1997) (Fig. 3.1). In seguito, per valutare quale tipo di recettore fosse espresso sulla linea cellulare sono stati effettuati esperimenti di spiazzamento di legame mediante l'uso di antagonisti selettivi per i recettori CB1 e CB2. Dai dati è stato evidenziato che l'antagonista selettivo del recettore CB1, SR141716A (1μM), ma non l'antagonista selettivo del recettore CB2, SR144528 (1μM), è in grado di

spiazzare il legame del [³H]CP55.940 (Fig. 3.1). Questi risultati confermano quindi, che soltanto il recettore CB1 è espresso sulle cellule U373MG. Le cellule di astrocitoma mostrano, inoltre, una bassa affinità di legame per la [³H]RTX, (~8 fmol/mg di proteine) un agonista selettivo del recettore vanilloide TRPV1 (Ross *et al.*, 2001), suggerendo che anche una piccola quantità di recettore vanilloide è espressa sulle cellule U373MG.

Confortati dai risultati degli esperimenti di binding che hanno chiaramente dimostrato l'espressione dei "target" molecolari degli endocannabinoidi nelle cellule U373MG, è stata valutata la presenza delle proteine responsabili della loro sintesi (NAPE-PLD, DAGL), trasporto (EMT), e degradazione (FAAH, MAGL).

Mediante un saggio di "uptake" è stato indagato attraverso quale processo l'AEA e il 2-AG triziati ([³H]AEA e [³H]2-AG) fossero in grado di entrare all'interno della linea cellulare in esame. È stato osservato che le cellule U373MG integre sono in grado di accumulare al loro interno, tramite un processo di saturazione caratteristico del trasportatore EMT, sia l'AEA ([³H]AEA ($K_m = 3.0 \pm 0.2 \mu M$ e $V_{max} = 141 \pm 5 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg di proteine}^{-1}$, $n=3$), che il 2-AG ([³H]2-AG ($K_m = 0.2 \pm 0.05 \mu M$ e $V_{max} = 8.0 \pm 0.7 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg di proteine}^{-1}$, $n=3$), suggerendo la presenza del trasporto attivo di membrana. L'analisi successiva dell'attività degli enzimi responsabili della sintesi dell'AEA e del 2-AG, NAPE-PLD e DAGL rispettivamente, insieme con l'analisi dell'attività della FAAH che idrolizza prevalentemente l'AEA, e della MAGL che è il principale enzima idrolitico del 2-AG, hanno dimostrato che le cellule U373MG possiedono il macchinario biochimico necessario per il metabolismo degli endocannabinoidi (Tabella 3.1).

Questi risultati indicano che le cellule di astrocitoma U373MG sono in grado di produrre e inattivare l'AEA e il 2-AG, e possiedono i target molecolari attraverso i quali gli endocannabinoidi svolgono le loro azioni biologiche, queste cellule pertanto rappresentano un buon modello per studiare il ruolo del sistema endocannabinoide nelle cellule gliali durante i meccanismi neuropatologici indotti dalla gp120.

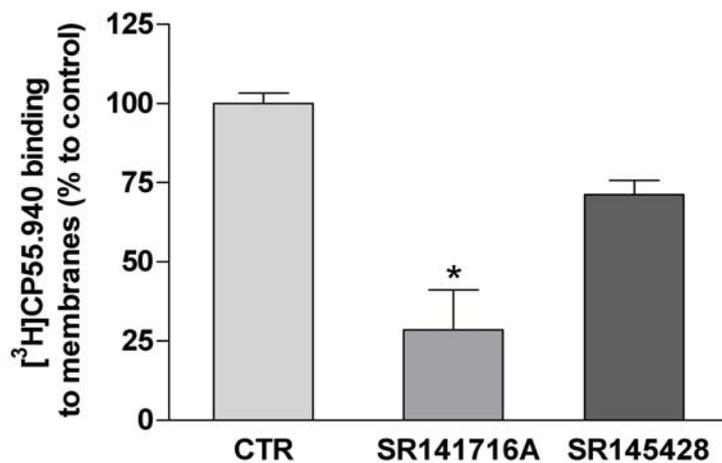


Fig 3.1 Recettori cannabinici nelle cellule di astrocitoma U373MG. Spiazzamento del legame del [³H]CP55.940 400 pM (CTR: 100% = 31±2 fmol per mg di proteine) da parte di SR141716A e SR144528, gli antagonisti dei recettori CB1 e CB2, rispettivamente; ciascuno usato alla concentrazione di 1 μM. Le linee verticali rappresentano il valore corrispondente allo SEM (n=3); *indica p<0.05 rispetto al controllo (CTR), Unpaired T test a due code.

TABELLA 3.1

Metabolismo dell' AEA e del 2-AG nelle cellule di astrocitoma U373MG.

Enzima	Attività
NAPE-PLD	16±1 ^a
FAAH	91±2 ^b
DAGL	770±20 ^c
MAGL	90±7 ^d

I valori di attività enzimatica sono espressi in pmol/min per mg di proteine.

^a Il substrato è [³H]NArPE alla concentrazione di 100 µM (media ± SEM; n=3).

^b Il substrato è [³H]AEA alla concentrazione di 10 µM (media ± SEM; n=3).

^c Il substrato è [¹⁴C]DAG alla concentrazione di 10 µM (media ± SEM; n=4).

^d Il substrato è [³H]2-OG alla concentrazione di 10 µM (media ± SEM; n=3).

3.2 L'esposizione alla gp120 non influenza la vitalità delle cellule di astrocitoma umano U373MG

Numerose evidenze sia *in vitro* che *in vivo*, indicano che la proteina gp120 dell'HIV è in grado di per sé di produrre neurotossicità (Dreyer *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1993; Lipton *et al.*, 1991). Per esempio, in ratti adulti il trattamento con la gp120 è capace di indurre apoptosi neuronale in seguito a somministrazione intracerebroventricolare della proteina virale nella corteccia cerebrale di ratto (Bageeta *et al.*, 1996). È noto inoltre, che la gp120 determina neurotossicità indiretta attraverso l'attivazione delle cellule gliali (astrociti e microglia) (Lipton *et al.*, 1995; Wahl *et al.*, 1989), che in seguito alla stimolazione dei recettori per le chemochine da parte della proteina virale producono una serie di sostanze tossiche che contribuiscono alla morte neuronale (Bezzi *et al.*, 2001a; Kaul *et al.*, 2001; Meucci *et al.*, 1996).

È stato testato quindi, se l'esposizione alla gp120 fosse tossica per le cellule di astrocitoma U373MG. Utilizzando il saggio dell'MTT, che valuta la vitalità cellulare, è stato osservato che il trattamento delle cellule U373MG, per 1h a varie concentrazioni di gp120 (1-200 pM) non influenza significativamente la vitalità di queste cellule (Fig. 3.2). Al contrario, l'esposizione allo stesso "range" di dosi di gp120 è in grado di indurre morte cellulare delle cellule di neuroblastoma umano CHP100 (Corasaniti *et al.*, 1995) o SHSY5Y (Corasaniti *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2005).

Questi dati, in accordo con precedenti evidenze che mostrano che l'esposizione alla gp120 non influenza direttamente la vitalità e la morfologia degli astrociti (Navarra *et al.*, 2004; Viviani *et al.*, 2001), avvalorano l'ipotesi che la neurotossicità della gp120 avviene a carico delle cellule neuronali e non degli astrociti che invece, rilasciando ulteriori fattori neurotossici come citochine pro infiammatorie tra cui il TNF- α , radicali liberi, specie reattive dell'ossigeno, agiscono come amplificatori del danno neuronale (Bezzi *et al.*, 2001a; Viviani *et al.*, 2001).

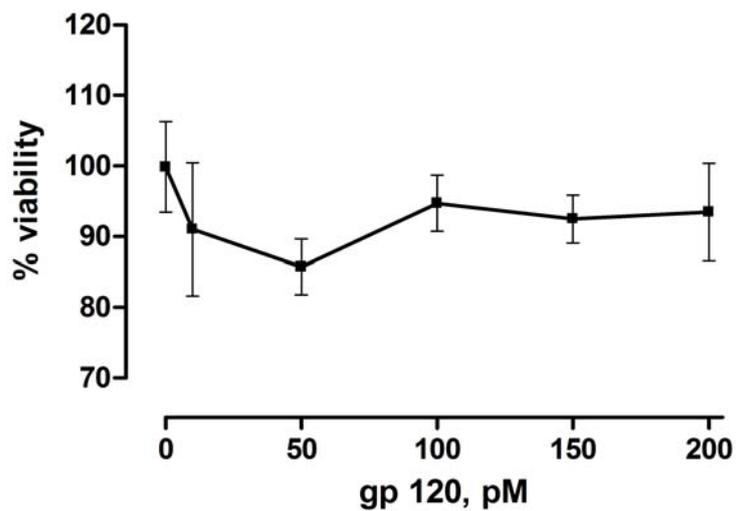


Fig 3.2 Effetto della gp120 sulla vitalità delle cellule U373MG. La vitalità cellulare è stata misurata tramite il saggio colorimetrico dell' MTT. I valori corrispondenti alle cellule vive sono stati calcolati come percentuale del valore di assorbanza ottenuto dalle cellule controllo, non trattate con la gp120 (0.224 ± 0.014). Ogni punto della curva rappresenta il valore medio \pm SEM di 3 diversi esperimenti. Gli effetti del trattamento non sono risultati essere statisticamente diversi dal controllo ($p > 0.05$, Unpaired T test a due code).

3.3 L'esposizione alla gp120 altera il sistema endocannabinoide delle cellule di astrocitoma umano U373MG

È stato dimostrato che la somministrazione intracerebroventricolare di gp120 determina nella neocorteccia di ratto un aumento tempo-dipendente dell'espressione e dell'attività FAAH, enzima chiave nella degradazione dell'anandamide, ed un parallelo incremento dell'attività del trasportatore (EMT) attraverso cui l'anandamide viene ricaptata dal terminale nervoso. Tali effetti si associano ad una riduzione, nella stessa area cerebrale, dei livelli endogeni di anandamide (Maccarrone *et al.*, 2004). In tali condizioni sperimentali, il pretrattamento con il composto metil-arachidonil-fluorofosfato (MAFP), un inibitore della FAAH, riduce l'apoptosi dei neuroni corticali indotta dalla gp120 (Maccarrone *et al.*, 2004). Questi dati supportano l'idea che si verifichino delle alterazioni del sistema endocannabinoide alla base dei meccanismi di neurodegenerazione indotti dalla gp120, sebbene non indichino su quali tipi di cellule cerebrali si manifestino queste alterazioni.

Numerose evidenze dimostrano che la proteina gp120 interagisce con gli astrociti inducendo tra l'altro depolarizzazione membranale (Benos *et al.*, 1994), incrementi della concentrazione di calcio intracellulare (Codazzi *et al.*, 1995), inibizione dell'uptake del glutammato (Dreyer *et al.*, 1995; Vesce *et al.*, 1997). Queste alterazioni delle funzioni degli astrociti indotti dalla gp120 potrebbero ulteriormente danneggiare i neuroni. Quindi, visto il coinvolgimento delle cellule gliali e del sistema endocannabinoide nell'attivazione dei meccanismi di morte neuronale indotti dalla gp120, sono stati condotti esperimenti per verificare se la gp120 fosse in grado di alterare il sistema endocannabinoide delle cellule di astrocitoma U373MG.

Tramite saggi di attività enzimatica, è stato dimostrato che l'esposizione alla gp120 (200 pM, 1h) ha indotto rilevanti modificazioni a carico di alcuni elementi del SE delle cellule U373MG. In particolare, è stato osservato che il trattamento di queste cellule con la proteina virale ha determinato un aumento statisticamente significativo dell'attività della FAAH (+~80% rispetto alle cellule controllo; $p < 0.05$) (Fig. 3.3), ma non dell'attività della NAPE-PLD e dell'AMT che restano invece invariate (Fig. 3.3). Questi dati indicano che

la gp120 altera il metabolismo dell'AEA aumentandone la sua degradazione. Infatti, in accordo con l'aumento dell'attività della FAAH, i livelli endogeni di AEA nelle cellule U373MG sono stati ridotti a ~60% rispetto al controllo ($p < 0.05$) dal trattamento con la gp120 (Tabella 3.2).

Complessivamente questi risultati confermano precedenti dati ottenuti *in vivo* (Maccarrone *et al.*, 2004) evidenziando che la gp120 provoca una riduzione dei livelli dell'AEA, aumentando l'attività dell'enzima responsabile della degradazione dell'endocannabinoide, e, quindi, suggerendo che la neurotossicità indotta dalla proteina virale possa essere dovuta ad un ridotto tono neuroprotettivo da endocannabinoidi.

In un diverso set di esperimenti una particolare attenzione è stata posta sul possibile coinvolgimento del 2-AG nei meccanismi attraverso i quali agisce la gp120 nelle cellule gliali. Il 2-AG, infatti è il più abbondante endocannabinoide presente a livello del SNC e agisce come agonista dei recettori CB1 e CB2 (Mackie, 2006; Sugiura *et al.*, 2006). In alcuni studi questo composto ha dimostrato di possedere effetti neuroprotettivi in diversi modelli sperimentali (Sarne *et al.*, 2005; Walter *et al.*, 2004).

Pertanto, è stato valutato se la gp120 è in grado di modificare il metabolismo del 2-AG delle cellule di astrocitoma umano. I saggi di attività enzimatica effettuati hanno evidenziato una forte riduzione dell'attività della DAGL delle cellule U373MG trattate con la gp120 rispetto alle cellule trattate col solo veicolo (~50%; $p < 0.05$) (Fig. 3.4). Parallelamente, non sono state invece evidenziate modificazioni statisticamente significative sia dell'attività della MAGL che della ricaptazione del 2-AG nelle cellule di astrocitoma trattate con la proteina virale (Fig. 3.4).

Questi dati indicano che la gp120 è in grado di diminuire la sintesi del 2-AG. Contrariamente alle aspettative, l'analisi dei livelli endogeni del 2-AG ha dimostrato che l'esposizione delle cellule di astrocitoma alla gp120 non modifica i livelli endogeni dell'endocannabinoide (Tabella 3.2). Questo risultato potrebbe essere spiegato considerando che esistono altre vie di sintesi del 2-AG (Sugiura *et al.*, 2006) diverse da quella analizzata che potrebbero essere attivate in seguito alla stimolazione con la gp120 per compensare un eventuale deficit di 2-AG.

Infine, è stato osservato che il trattamento delle cellule U373MG con la proteina virale provoca un aumento del legame del cannabinoide sintetico, [³H]CP55.940, alla membrana cellulare (+~135% rispetto al valore di controllo; p<0.01). Questi dati suggeriscono che la gp120 determina probabilmente un aumento dell'espressione del recettore CB1. Al contrario, il legame della [³H]RTX, agonista del recettore vanilloide, non è stato alterato dalla gp120, suggerendo che il recettore vanilloide probabilmente non è implicato nella tossicità da gp120 (Tabella 3.2).

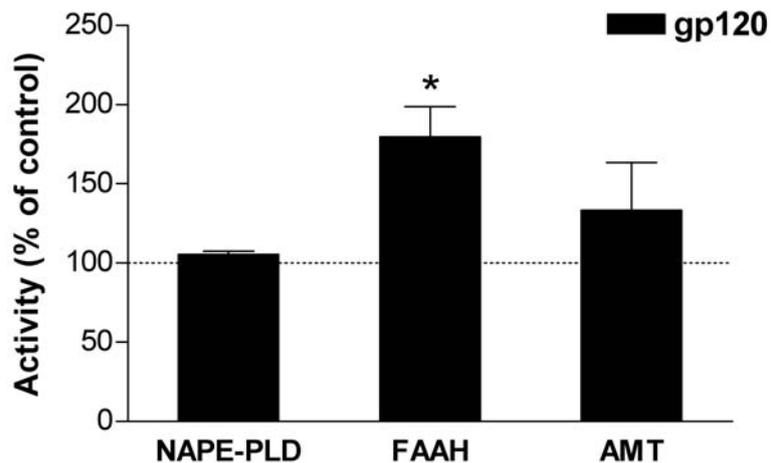


Fig. 3.3 La proteina gp120 aumenta l'attività della FAAH nelle cellule U373MG. L'attività della NAPE-PLD, della FAAH, e dell'AMT, sono state misurate in cellule trattate con la gp120 (200 pM, 1h) ed in cellule controllo trattate con il solo veicolo. I valori sono stati espressi come percentuale dell'attività delle cellule controllo (100% = 16±1 pmol/min per mg proteine, per la NAPE-PLD; 91±2 pmol/min per mg proteine, per la FAAH; 30±3 pmol/min per mg proteine, per l'AMT). Le linee verticali rappresentano il valore di SEM di 3 esperimenti. *indica $p < 0.05$ rispetto al controllo, Umparied T test a due code.

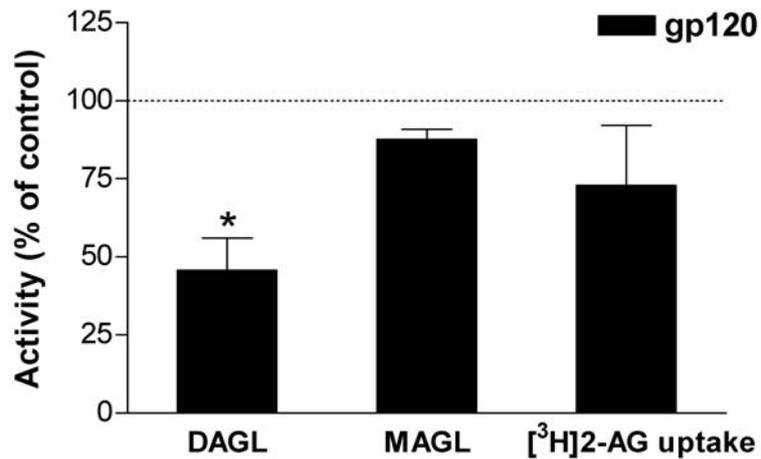


Fig. 3.4 La proteina gp120 riduce l'attività della DAGL nelle cellule U373MG. L'attività della DAGL, della MAGL e dell' Uptake del 2-AG sono state misurate in cellule trattate con la gp120 (200 pM, 1h) ed in cellule controllo trattate con il solo veicolo. I valori sono stati espressi come percentuale dell'attività delle cellule controllo (100% = 773±123 pmol/min per mg proteine, per la DAGL; 93±7 pmol/min per mg proteine, per la MAGL; 13±2 pmol/min per mg proteine, per l'Uptake del 2-AG). Le linee verticali rappresentano il valore di SEM di 3 esperimenti. *indica $p < 0.05$ rispetto al controllo, Unpaired T test a due code.

TABELLA 3.2

Effetti della gp120 sui livelli endogeni di endocannabinoidi e sul binding ai recettori

	Controllo	+ gp120
Livelli endogeni AEA (pmol/mg protein)	0,36±0,04 (100%)	0,15±0,04 (42%)*
Livelli endogeni 2-AG (pmol/mg protein)	169±17 (100%)	205±37 (121%)
CBR binding ^a (fmol/mg protein)	31±2 (100%)	73±3 (235%)**
TRPV1 binding ^b (fmol/mg protein)	7,4±0,2 (100%)	6,7±0,8 (90%)

I valori in parentesi rappresentano la percentuale del controllo, indicato come 100.

^a Il substrato è [³H]CP55.940 alla concentrazione di 400 pM (media ± SEM; n=3).

^b Il substrato è [³H]RTX alla concentrazione di 55 pM (media ± SEM; n=3).

*Indica p < 0.05 rispetto al controllo; **indica p<0.01 rispetto al controllo, Unpaired T test a due code.

3.4 L'inibitore della FAAH URB590 inibisce il rilascio di TNF- α indotto dalla gp120

Numerose evidenze mostrano che il meccanismo finale con cui la gp120 provoca tossicità neuronale è la iperattivazione dei recettori canale NMDA, il cui principale agonista endogeno è il glutammato (Bezzi *et al.*, 2001a; Corasaniti *et al.*, 1995; Kaul *et al.*, 2001). Una delle ipotesi riguardo al meccanismo cellulare tramite il quale la gp120 è in grado di produrre un aumento delle concentrazioni di glutammato extracellulare è stata avanzata dal gruppo del Prof. Andrea Volterra (Bezzi *et al.*, 2001a). È stato proposto che la gp120, attivando il recettore CXCR4 presente sia sugli astrociti che sulla microglia, determini un imponente rilascio di TNF- α , che a sua volta, agendo come mediatore autocrino e/o paracrino, provochi un massivo rilascio di glutammato dagli astrociti responsabile della morte neuronale (Bezzi *et al.*, 2001a).

Sulla base dei dati presenti in letteratura sono stati effettuati esperimenti per verificare se l'azione della gp120 sul sistema endocannabinoide delle cellule U373MG fosse legata al rilascio della citochina proinfiammatoria TNF- α . Mediante l'utilizzo di un saggio ELISA è stato osservato che il trattamento delle cellule U373 con la gp120 (200 pM, 1h), determina un notevole aumento dei livelli extracellulari di TNF- α (+~85% rispetto al controllo; $p < 0.05$); questo risultato è molto simile a quello ottenuto quando le cellule sono state stimolate con LPS (+~75% rispetto alle cellule non trattate; $p < 0.05$), usato come controllo positivo (Fig. 3.5).

Inoltre, considerando che gli (endo)cannabinoidi sono in grado di inibire il rilascio di citochine e chemochine indotto da uno stimolo infiammatorio negli astrociti (Ortega-Gutierrez *et al.*, 2005; Sheng *et al.*, 2005) e che in seguito alla stimolazione con la gp120 si ha una riduzione dell'AEA dovuto ad un aumento dell'attività della FAAH, è stato misurato il rilascio di TNF- α nel medium delle cellule U373MG trattate con la proteina virale in presenza di un inibitore selettivo della FAAH, l'URB590 (1 μ M). La preincubazione per 15 minuti con questo inibitore abolisce quasi completamente il rilascio di TNF- α indotto dalla proteina virale (~85% di inibizione; $n=4$) (Fig.3.5). Questi risultati indicano fortemente che nel meccanismo del rilascio astrocitario del TNF- α indotto dalla gp120 è coinvolta la FAAH.

Al fine di individuare quale recettore fosse coinvolto nell'inibizione da parte dell'URB590 del rilascio di TNF- α indotto dalla gp120, sono stati eseguiti studi di antagonismo recettoriale. È stato valutato il rilascio di TNF- α nel medium di cellule trattate con la gp120 (200pM, 1h) e preincubate 15 min prima con l'URB590 e contemporaneamente con l'SR141716A (1 μ M), un antagonista selettivo del CB1R, o con la I-RTX (1 μ M), un antagonista selettivo del TRPV1. I risultati ottenuti mostrano che la coapplicazione di questi antagonisti con l'URB590, non reverte l'effetto inibitorio sul rilascio di TNF- α , suggerendo che nè il recettore CB1 nè il recettore vanilloide siano implicati in questo processo (Fig. 3.5).

In un'altra serie di esperimenti è stato valutato se fosse coinvolto il recettore PPAR- γ , un recettore nucleare su cui l'AEA agisce come agonista (O'Sullivan, 2007). Recenti pubblicazioni dimostrano infatti, che l'attivazione di questo recettore determina neuroprotezione in un modello eccitotossicità indotto dalla somministrazione di acido kainico (Luna-Medina *et al.*, 2007) e in un modello di ischemia (Luo *et al.*, 2006) mediante l'inibizione del rilascio di citochine pro infiammatorie. Anche in questo caso, è stato evidenziato che il GW9662 (5 μ M), un antagonista selettivo del recettore PPAR- γ , non è in grado di annullare l'effetto dell'URB590 sul rilascio di TNF- α indotto dalla gp120 nelle cellule U373MG (Fig. 3.5), suggerendo che il recettore PPAR- γ non sia coinvolto nel meccanismo studiato.

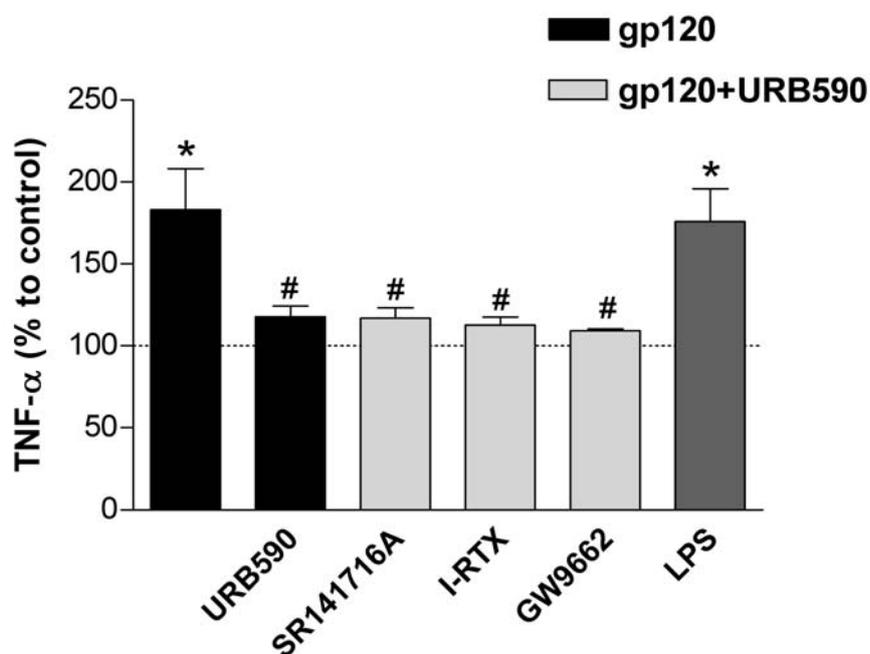


Fig. 3.5 L'URB590 abolisce il rilascio di TNF- α indotto dalla gp120 nelle cellule U373MG. I livelli di TNF- α sono stati misurati tramite un saggio ELISA nel medium extracellulare di cellule controllo e cellule trattate per 1h con la gp120 (200 pM) o con l'LPS (1 μ g/ml). L'inibitore selettivo della FAAH, URB597 (1 μ M), è stato applicato alle cellule 15 minuti prima dell'aggiunta della proteina virale, e negli studi di antagonismo recettoriale, l'SR141716A (1 μ M), antagonista selettivo del CB1R, la I-RTX (1 μ M), antagonista selettivo del recettore TRPV1, o il GW9662 (5 μ M), antagonista selettivo del recettore PPAR- γ , sono stati addizionati al medium cellulare 15 minuti prima della somministrazione dell'URB597. I valori sono stati espressi come percentuale dei livelli di TNF- α delle cellule non trattate (100% = 1,5 \pm 0,2 pg/ml). Le linee verticali rappresentano il valore di SEM di 4 esperimenti.*Indica $p < 0.05$ rispetto al controllo; # indica $p < 0.05$ rispetto alla gp120 applicata da sola.

3.5 Le colture primarie di astrociti corticali di ratto esprimono il recettore CB1 la cui attivazione determina aumento del $[Ca^{2+}]_i$

Negli ultimi anni numerosi studi hanno messo in evidenza come gli astrociti siano in grado di influenzare attivamente l'attività sinaptica modulando la comunicazione neurone-neurone (Santello *et al.*, 2008b; Volterra *et al.*, 2005b). È stato ampiamente dimostrato che i neurotrasmettitori rilasciati nello spazio sinaptico si propagano alle cellule gliali circostanti, attivando recettori di membrana, e provocando un aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare (Pasti *et al.*, 1997; Perea *et al.*, 2007), con conseguente attivazione del rilascio di trasmettitori chimici, detti gliotrasmettitori, che a loro volta sono in grado di modulare la risposta neuronale (Araque *et al.*, 1999; Bezzi *et al.*, 1998; Parpura *et al.*, 1994). Tra i vari gliotrasmettitori, lo studio del rilascio di glutammato dagli astrociti ha assunto una notevole importanza, dato il ruolo chiave che questo trasmettitore svolge in numerosi processi sia fisiologici che patologici (Bezzi *et al.*, 2001b; Volterra *et al.*, 2005b). Il meccanismo di rilascio di glutammato dagli astrociti è stato ampiamente studiato negli ultimi anni. Recenti ricerche hanno messo in evidenza che gli astrociti possiedono un apparato vescicolare esprimente la proteina per il trasporto del glutammato (vesicular glutamate transporter o VGLUT) (Montana *et al.*, 2004) che può subire esocitosi regolata in seguito all'aumento di Ca^{2+} intracellulare (Bezzi *et al.*, 2004; Domercq *et al.*, 2006; Jourdain *et al.*, 2007; Marchaland *et al.*, 2008).

Recentemente, inoltre, è stato evidenziato un interessante coinvolgimento degli endocannabinoidi nella comunicazione bidirezionale tra astrociti e neuroni (Navarrete *et al.*, 2008). In particolare, è stato dimostrato che gli astrociti ippocampali posseggono il recettore CB1 la cui attivazione, tramite gli endocannabinoidi rilasciati dai neuroni, determina mobilizzazione di Ca^{2+} dai depositi interni e conseguente rilascio di glutammato, che va ad attivare i recettori del tipo NMDA presenti sui neuroni piramidali (Navarrete *et al.*, 2008). Il meccanismo attraverso il quale avviene il rilascio di glutammato dagli astrociti perisinpatici, in seguito all'attivazione del recettore CB1, è tuttavia ancora sconosciuto.

Sulla base di tale evidenza, nella seconda parte di questo lavoro di tesi è stato valutato l'effetto dell'attivazione del recettore CB1 sul rilascio di glutammato dagli astrociti. In particolare è stato testato se tale rilascio fosse di tipo esocitotico, come quello recentemente descritto per l'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato (Bezzi *et al.*, 2004; Marchaland *et al.*, 2008).

Una prima serie di esperimenti è stata necessaria al fine di stabilire se gli astrociti corticali di ratto esprimessero il recettore CB1 funzionale. Sono stati condotti esperimenti di immunocitochimica in cui è stata eseguita una doppia marcatura immunofluorescente per verificare se gli astrociti corticali esprimessero il recettore CB1 sulla membrana plasmatica. La doppia marcatura ha prodotto una fluorescenza puntiforme che si distribuisce uniformemente sulla membrana degli astrociti, identificati in maniera univoca con il marcaggio della proteina citoscheletrica GFAP (Fig. 3.6). Questi risultati indicano pertanto, che il recettore CB1 è espresso nelle colture di astrociti corticali di ratto, ed avvalorano precedenti studi che mostrano la presenza del recettore CB1 sulle cellule gliali in coltura (Molina-Holgado *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2003).

Accanto all'evidenza morfologica, è stata testata la funzionalità del recettore CB1 astrocitario. Mediante l'utilizzo di esperimenti di "calcium imaging" in singola cellula, è stato evidenziato che l'applicazione locale della MetAEA (300 μ M, 5s), un agonista non selettivo dei recettori cannabinici (Pertwee, 1997), determina un rapido incremento transiente della $[Ca^{2+}]_i$ che ritorna a livelli basali, qualche secondo dopo la fine della stimolazione (Fig. 3.7 A). L'analisi delle cinetiche del Ca^{2+} , ottenute misurando l'aumento della fluorescenza del colorante FLUO-4-AM nelle regioni di interesse (poste sull'intero perimetro cellulare), mostra chiaramente che in seguito all'attivazione del recettore CB1 si verifica un aumento della $[Ca^{2+}]_i$ pari a $\sim 0.65 \Delta F/F_0$ ($\sim 65\%$ rispetto al basale, Fig. 3.7 B).

Complessivamente questi dati indicano che gli astrociti corticali esprimono a livello della membrana il recettore CB1 funzionale, la cui attivazione tramite il cannabinoide sintetico MetAEA determina un aumento della $[Ca^{2+}]_i$. Poiché il recettore CB1 espresso sugli astrociti è probabilmente un recettore accoppiato a proteine G_q (la sua attivazione determina quindi produzione di IP3) (Lauckner *et al.*, 2005; Navarrete *et al.*, 2008), gli aumenti della $[Ca^{2+}]_i$ sono molto presumibilmente dovuti al rilascio di calcio dai depositi

intracellulari. Numerosi studi hanno dimostrato che il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico è l'evento necessario per la liberazione di glutammato dagli astrociti (Bezzi *et al.*, 2004; Fellin *et al.*, 2004; Marchaland *et al.*, 2008; Pasti *et al.*, 1997).

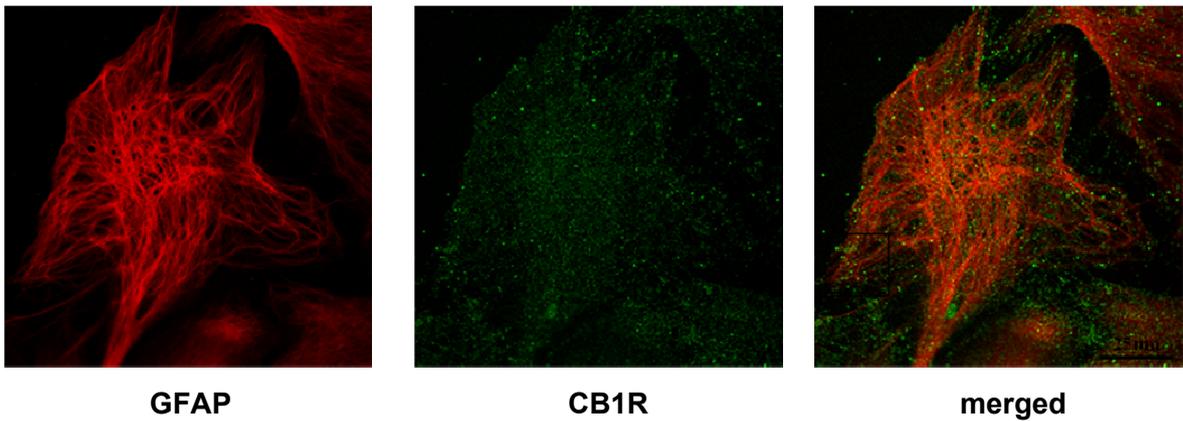
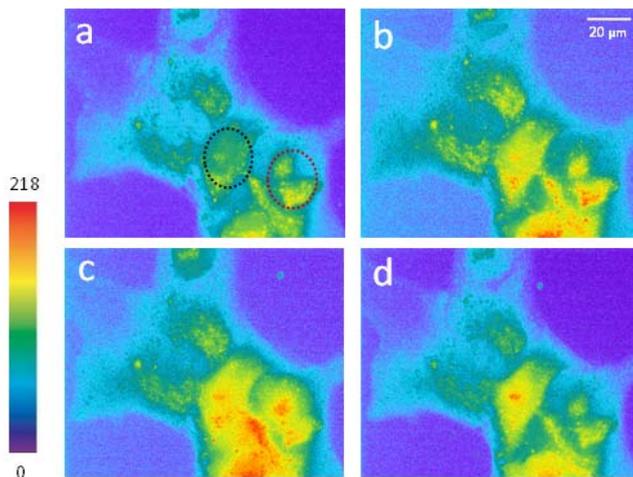


Fig. 3.6 Espressione del recettore CB1 sugli astrociti corticali di ratto. La sequenza di immagini confocali mostra un astrocita che esprime il recettore CB1. Una doppia marcatura immunofluorescente è stata effettuata su astrociti corticali di ratto in coltura, fissati in paraformaldeide al 4%, e successivamente incubati con anticorpi diretti contro CB1R (1:250) e GFAP (1:500). La visualizzazione è stata effettuata con anticorpi secondari coniugati con i fluorofori Alexa 488 (1:200) o Alexa 555 (1:200) rispettivamente.

A.



B.

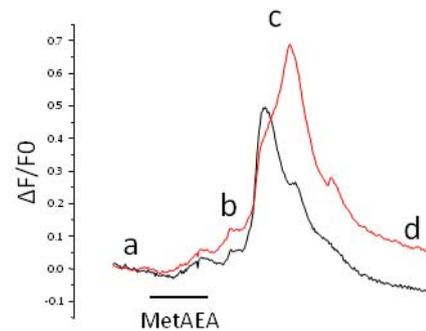


Fig. 3.7 L'attivazione del CB1R aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ negli astrociti. (A) Gli astrociti in coltura sono stati incubati con FLUO4-AM (200nM, 15 min). Le immagini pseudocolore mostrano l'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ in un gruppo di astrociti, prima (a) e dopo (b,c,d) la perfusione locale di MetAEA (300 μ M, 5s), un agonista sintetico e non selettivo dei recettori cannabinici. In (a) due regioni di interesse sono state poste su due cellule diverse per valutare gli aumenti e le cinetiche del colorante FLUO4-AM. In (b, c, d) le stesse cellule appena dopo l'applicazione locale dell'agonista; notare che la fluorescenza di FLUO4-AM aumenta progressivamente raggiungendo il massimo in (c). Nelle scale di pseudocolore il giallo e il rosso indicano forti aumenti della fluorescenza di FLUO4-AM (e quindi di calcio). (B) Le tracce rappresentano i cambiamenti della cinetica del FLUO4-AM e quindi del $[Ca^{2+}]_i$ in seguito all'applicazione della MetAEA misurati nelle due cellule raffigurate in A (a). Gli aumenti di fluorescenza sono stati espressi come $\Delta F/F_0$.

3.6 L'attivazione del recettore CB1 determina rilascio esocitotico di glutammato dagli astrociti

In vista della recente dimostrazione che gli astrociti in coltura sono in grado di rilasciare glutammato attraverso l'esocitosi regolata di microvescicole (SLMVs), analoghe a quelle dei neuroni, (Bezzi *et al.*, 2004; Cali *et al.*, 2008; Marchaland *et al.*, 2008), e che gli endocannabinoidi determinano rilascio di glutammato dagli astrociti *in situ* (Navarrete *et al.*, 2008), nell'ultima parte del lavoro di tesi, è stato testato se la stimolazione del recettore CB1 potesse determinare rilascio di glutammato attraverso lo stesso tipo di processo.

Per avere una dimostrazione diretta che il rilascio di glutammato in seguito alla stimolazione del recettore CB1 avvenga attraverso un meccanismo di tipo esocitotico, è stato utilizzato il microscopio TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) che costituisce lo stato dell'arte tra i microscopi a fluorescenza per lo studio delle cinetiche di esocitosi (Bezzi *et al.*, 2004; Domercq *et al.*, 2006; Steyer *et al.*, 2001). Gli astrociti sono stati transfettati con il plasmide VGLUT2-EGFP, che è un marker delle vescicole glutammatergiche, ed incubati con l'acridine orange (AO), che è un marker degli eventi di fusione (Avery *et al.*, 2000). L'AO è un colorante che si accumula all'interno dei compartimenti acidi della cellula, e quindi anche all'interno delle vescicole marcate con VGLUT-EGFP (VGLUT+). Quando una vescicola contenente AO, fonde con la membrana plasmatica il colorante viene rilasciato nello spazio extracellulare e si verifica un transiente aumento della fluorescenza (flash di luce) seguito da diffusione e scomparsa della fluorescenza. La figura 3.8 A rappresenta l'immagine TIRF di un astrocita, caricato con AO, in cui ogni punto di fluorescenza rappresenta una vescicola. È importante notare, nell'ingrandimento, come tutte le vescicole VGLUT+ contengono al loro interno AO, mentre alcune vescicole, indicate con le frecce, non esprimono VGLUT-EGFP, suggerendo che si possa trattare di lisosomi e altri compartimenti acidi della cellula. Esperimenti preliminari, indicano che una breve (5s) e localizzata stimolazione degli astrociti con la MetAEA (300 μ M, n=4) determina un aumento repentino della fluorescenza che raggiunge il plateau in 2,5-4 s (Fig. 3.8 B). Dalle analisi effettuate risulta che in seguito

all'attivazione del recettore CB1 ~30% della vescicole fonde contemporaneamente con la membrana plasmatica, il che è caratteristico del processo esocitotico astrocitario (Marchaland *et al.*, 2008).

A.....B

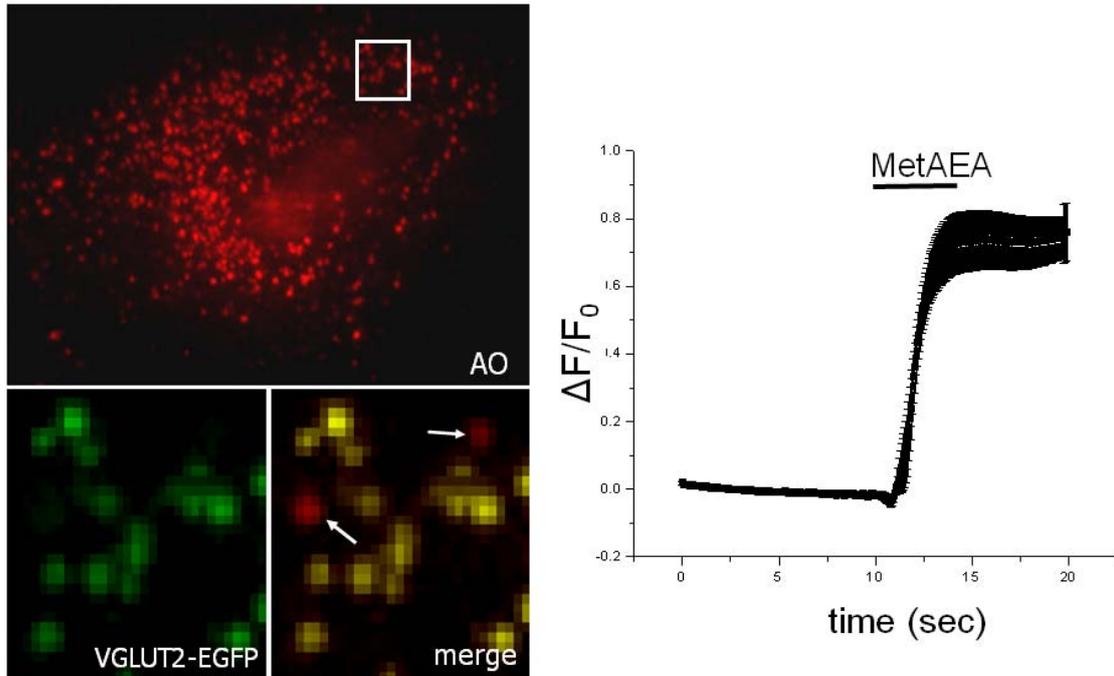


Fig 3.8 L'attivazione del CB1R determina rilascio esocitotico di glutammato dagli astrociti Fusione esocitotica delle vescicole marcate con VGLUT-EGFP osservata in astrociti viventi. (A) Vescicole astrocitarie doppiamente fluorescenti per AO e VGLUT-EGFP. L'immagine TIRF mostra la fluorescenza dell'AO (rosso); l'ingrandimento della regione nel riquadro raffigura la fluorescenza della EGFP (verde) e la sovrapposizione della fluorescenza dell'AO e della EGFP (giallo). Le frecce indicano le vescicole contenenti AO che non corrispondono a vescicole VGLUT+. (B) Cinetica dei cambiamenti dell'intensità di fluorescenza dell'AO prima, durante e dopo la stimolazione con MetAEA; la curva rappresenta la media \pm S.E. di 4 esperimenti.

4. DISCUSSIONE

I risultati di questo lavoro di tesi identificano il coinvolgimento degli (endo)cannabinoidi nella modulazione della produzione di TNF- α e del rilascio di glutammato dagli astrociti. Questa scoperta risulta essere particolarmente interessante in virtù del fatto che gli astrociti, mediante il rilascio di trasmettitori chimici (i cosiddetti gliotrasmettitori), sono capaci di interagire con i neuroni e modulare l'attività sinaptica (Bezzi *et al.*, 2001b; Volterra *et al.*, 2005b). Nel corso dell'ultimo decennio il numero di sostanze riconosciute come gliotrasmettitori è notevolmente cresciuto; per esempio il glutammato, l'ATP e i suoi metaboliti, la D-serina, il TNF- α e le prostaglandine (PGs), sono attualmente considerati mediatori chimici partecipanti al sistema di comunicazione intercellulare anche tra astrociti e neuroni (Araque *et al.*, 1999). Malgrado gli studi fin qui effettuati e i dati finora ottenuti, il meccanismo molecolare responsabile del rilascio dei gliotrasmettitori dagli astrociti è ancora molto discusso nella comunità scientifica e per molti scienziati deve essere ulteriormente chiarito (Nedergaard *et al.*, 2003).

Il presente lavoro di tesi è stato focalizzato sullo studio degli astrociti, utilizzando sia linee cellulari di astrocitoma umano U373MG, che colture primarie di astrociti corticali di ratto. L'attenzione è stata particolarmente rivolta all'azione degli endocannabinoidi sui processi di rilascio di TNF- α e di glutammato dagli astrociti. Gli astrociti esprimono recettori di membrana di vario tipo (Haydon, 2001); recettori canale e recettori accoppiati a G proteine come ad esempio i recettori metabotropi del glutammato di tipo I (mGluRI) o recettori per le chemokine. Studi effettuati sia *in vitro* che *in situ* hanno evidenziato che le chemochine insieme con i loro recettori sono costitutivamente espressi sia nelle cellule gliali che dalle cellule nervose in cervelli di animali adulti (Asensio *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2002; Rostene *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2003). Fino a qualche tempo fa, il ruolo delle chemochine e dei loro recettori era associato quasi esclusivamente ai processi di infiammazione cerebrale, quindi a ruoli patologici. Recenti evidenze hanno invece suggerito come alcune chemochine svolgano un ruolo fisiologico sia nel sistema di

segnalazione neuronale che in quello astrociti-neuroni (Guyon *et al.*, 2007; Limatola *et al.*, 2000).

Tra i diversi sistemi chemochine-recettori, uno dei più studiati è il sistema CXCL12-CXCR4; il recettore CXCR4 ha ricevuto un'attenzione particolare perché costituisce il co-recettore che media l'ingresso del virus dell'HIV-1 nelle cellule. Studi precedenti hanno evidenziato che la proteina del capsido del virus gp120 poteva agire, al pari dell'agonista fisiologico CXCL12 o SDF1- α , sul recettore CXCR4 (Atchison *et al.*, 1996) ed attivare la segnalazione Ca²⁺-dipendente intracellulare sia nei neuroni che negli astrociti. In particolare è stato dimostrato che l'attivazione del recettore CXCR4 negli astrociti dava luogo ad un rilascio Ca²⁺-dipendente di glutammato, TNF- α e PGs (Bezzi *et al.*, 2001a). Questi dati forniscono un ipotetico meccanismo attraverso il quale si manifesta la sindrome neurologica associata all'infezione con HIV-1; la cosiddetta "HIV-associated dementia" caratterizzata da disturbi cognitivi e motori che si manifestano in circa il 20% dei pazienti affetti da HIV (Bezzi *et al.*, 2001a; Kaul *et al.*, 2001; Kaul *et al.*, 2005).

Alla luce dei dati presenti in letteratura nella prima parte dello studio le cellule di astrocitoma umano U373MG sono state trattate con gp120 ed è stata valutata come l'attivazione del recettore CXCR4 potesse alterare/modulare il metabolismo degli endocannabinoidi. I dati ottenuti indicano che la gp120 attiva una cascata di eventi che porta ad un aumento dell'attività dell'enzima FAAH, enzima chiave per la degradazione dell'anandamide. L'aumento di questa attività enzimatica è inoltre, associata ad una diminuzione dei livelli endogeni dell'endocannabinoide. Questi dati sono in accordo con precedenti osservazioni *in vivo* che evidenziano come la somministrazione di gp120 nella neocorteccia di ratto determina un aumento dell'attività FAAH associata all'apoptosi neuronale (Maccarrone *et al.*, 2004). Altri dati indicano che esiste un selettivo aumento dell'espressione e dell'attività della FAAH negli astrociti e nelle cellule microgliali anche in pazienti affetti da diverse neuropatologie come ad esempio il morbo d'Alzheimer (Benito *et al.*, 2003) e la sclerosi multipla (Benito *et al.*, 2007). Queste osservazioni suggeriscono pertanto, che l'overespressione della FAAH nelle cellule gliali potrebbe avere uno specifico ruolo patogenetico in diversi disordini sia a carattere neurodegenerativo che neuroinfiammatorio, quindi la modulazione farmacologica di

questo enzima potrebbe rappresentare un approccio terapeutico per il trattamento di diversi disordini neurologici (Centonze *et al.*, 2007). I dati ottenuti dimostrano inoltre, che la gp120 non risulta essere tossica per le cellule U373MG, che in seguito alla stimolazione da parte della proteina virale determina un' aumentata produzione di TNF- α . Ciò avvalorava l'ipotesi che la neurotossicità della gp120 avviene a carico delle cellule neuronali e non degli astrociti che invece producono una serie di sostanze neurotossiche che amplificano il danno neuronale (Bezzi *et al.*, 2001a; Kaul *et al.*, 2001; Viviani *et al.*, 2001).

I dati successivi indicano una relazione stretta tra l'attività dell'enzima FAAH, la produzione di anandamide e la liberazione di TNF- α . Infatti l'uso di un inibitore selettivo della FAAH, l'URB590, abolisce il rilascio di TNF- α indotto dalla gp120, suggerendo che l'anandamide endogena è direttamente coinvolta nel controllo del rilascio di tale citochina. Questi risultati suggeriscono che l'enzima FAAH possa essere responsabile del controllo del rilascio di glutammato dagli astrociti visto che è noto che l'attivazione del recettore CXCR4, su cui fa da agonista la gp120, determina una cascata di eventi che porta al rilascio di glutammato Ca²⁺-dipendente, mediato dal TNF- α e dalle PGs (Bezzi *et al.*, 2001a; Domercq *et al.*, 2006). Avvalorava questa ipotesi la considerazione che l'aumentata degradazione dell'anandamide porta ad un incremento della concentrazione di acido arachidonico, che fa da substrato per la ciclossigenasi (COX) e dei suoi prodotti derivati come le PGs. È stato dimostrato infatti che, la COX è overespressa dall'azione della gp120 (Bageeta *et al.*, 1998; Maccarrone *et al.*, 2000a) ed i suoi prodotti di reazione, le PGs, sono coinvolte nell'induzione dell'aumento del rilascio di glutammato (Bezzi *et al.*, 1998).

Bisogna sottolineare, che la modulazione da parte degli endocannabinoidi del rilascio di TNF- α assume un'importanza fondamentale non solo nei processi patologici che presentano una componente neuroinfiammatoria, ma anche nella comunicazione fisiologica astrociti-neuroni. Il TNF- α è infatti, coinvolto nel meccanismo di rilascio di glutammato da astrociti in condizioni fisiologiche (Santello *et al.*, 2008a) e la modulazione delle quantità prodotte/rilasciate di citochina da parte degli endocannabinoidi potrebbe rappresentare il punto di cambiamento fra una condizione fisiologica ed una patologica. È possibile, infatti, ipotizzare che condizioni capaci di creare una fluttuazione delle

concentrazioni endogene di TNF- α possano controllare la quantità di glutammato rilasciato dagli astrociti.

In che modo l'anadamide può controllare il rilascio di glutammato dagli astrociti? I dati sperimentali ottenuti in questo studio dimostrano, che gli astrociti corticali di ratto esprimono il recettore CB1 funzionale; l'attivazione del recettore con agonisti specifici determina infatti un aumento transiente della concentrazione di calcio intracellulare, che, teoricamente dovrebbe essere sufficiente a determinare il rilascio di glutammato (Bezzi *et al.*, 1998; Bezzi *et al.*, 2001a; Domercq *et al.*, 2006). Questi dati ottenuti in astrociti in coltura sono infatti avvalorati da recenti evidenze ottenute in fettine acute di ippocampo che dimostrano come la stimolazione del recettore CB1 negli astrociti induce la modulazione sinaptica glutammato-dipendente (Navarrete *et al.*, 2008).

Nella seconda parte dello studio è stato dunque, imperativo studiare il meccanismo attraverso il quale l'attivazione del recettore CB1 porta al rilascio di glutammato dagli astrociti. Poichè negli astrociti l'attivazione di diversi recettori accoppiati a G proteine, induceva rilascio di glutammato tramite meccanismo esocitotico (Bezzi *et al.*, 2004; Domercq *et al.*, 2006), per effettuare questi studi è stato utilizzato il microscopio TIRF, che rappresenta lo stato dell'arte tra i microscopi a fluorescenza per lo studio delle cinetiche di esocitosi ed endocitosi (Steyer *et al.*, 2001). In accordo con un metodo messo a punto in precedenza (Bezzi *et al.*, 2004; Domercq *et al.*, 2006) le vescicole glutammatergiche negli astrociti in coltura sono state visualizzate mediante trasfezione di una proteina chimerica fluorescente VGLUT-EGFP mentre gli eventi di fusione della singola vescicola sono stati visualizzati tramite un marker fluorescenza chiamato acridine orange (AO). L'illuminazione TIRF, permette di monitorare esclusivamente le vescicole astrocitarie, doppiamente fluorescenti per VGLUT-EGFP e per l'AO, confinate nell'onda evanescente che si produce a circa 90 nm attorno alla membrana cellulare. Nei esperimenti dinamici, l'attivazione del recettore CB1 ha prodotto la fusione di circa il 30% delle vescicole presenti nell'onda evanescente causando un "burst" di esocitosi che raggiunge un picco massimo tra 2.5-4 sec. Questi risultati mostrano per la prima volta che l'attivazione del recettore per gli endocannabinoidi causa il rilascio esocitotico di glutammato dagli astrociti. Questo dato potrebbe apparire in contraddizione con il fatto che generalmente il

recettore CB1 è accoppiato a proteine G di tipo inibitorio e la sua stimolazione determina una diminuzione dell'attività dell'adenilato ciclasi (Mackie, 2006) piuttosto che un aumento della $[Ca^{2+}]_i$. Tuttavia, recentemente è stato dimostrato che la stimolazione del CB1 può essere accoppiata, tramite una proteina $G_{q/11}$, all'attivazione della PLC, che determina un aumento dei livelli di inositolo trifosfato (IP3) e quindi rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico (Lauckner *et al.*, 2005; Navarrete *et al.*, 2008). Probabilmente, l'interazione del recettore CB1 con la proteina $G_{q/11}$ è favorita negli astrociti piuttosto che nei neuroni. Il rilascio esocitotico di gliotrasmettitori dovuto all'aumento di Ca^{2+} dai depositi interni, è un fenomeno comune all'attivazione di diversi recettori quali, recettori metabotropici del glutammato di tipo I (mGluRI) (Bezzi *et al.*, 1998; Bezzi *et al.*, 2004; Marchaland *et al.*, 2008), recettori purinergici P2Y1 (Domercq *et al.*, 2006), recettore per la chemochina CXCR4 (Bezzi *et al.*, 2001a; Cali *et al.*, 2008), suggerendo che potrebbe essere implicato nei processi di segnalazione intercellulare che avvengono in condizioni fisiologiche.

Un importante caratteristica del processo esocitotico di glutammato CB1-dipendente è la sua rapidità. Infatti, nonostante sia noto che l'esocitosi negli astrociti non avviene attraverso l'ingresso del Ca^{2+} dai canali Na^+ -dipendenti (Carmignoto *et al.*, 1998), bensì dalla segnalazione intracellulare IP_3 -dipendente, questo processo avviene in modo estremamente rapido rispetto ad altri tipi di cellule secretorie non eccitabili elettricamente (Chow *et al.*, 1996; Chow *et al.*, 1994; Kasai, 1999). Ciò può essere spiegato considerando che gli astrociti presentano compartimenti citosolici di dimensioni sub-micrometrici e delimitati dal reticolo endoplasmatico e la membrana cellulare. Tali compartimenti, chiamati comunemente "microdomains" sub-membrana, contengono le vescicole glutammatergiche e ospitano degli aumenti rapidi e localizzati della concentrazione di calcio proveniente dal reticolo endoplasmatico. È stato evidenziato che in seguito ad aumenti localizzati di Ca^{2+} gli eventi di fusione avvengono in stretta correlazione spaziale e temporale (Marchaland *et al.*, 2008). Questi risultati possono essere estremamente rilevanti per la comprensione del ruolo funzionale del rilascio di trasmettitore dagli astrociti nella fisiologia cerebrale. Un recente lavoro dimostra, per la prima volta, che gli aumenti rapidi e localizzati di Ca^{2+} avvengono *in vivo* ed in seguito all'attività neuronale con picchi

estremamente veloci (nella scala temporale dei ms) (Winship *et al.*, 2007). Questi dati suggeriscono che gli eventi locali di calcio recentemente evidenziati nei “microdomains” non sono una peculiarità degli astrociti in coltura ma corrispondono a eventi che possono avvenire anche nel cervello. Stabilire se gli eventi rapidi di calcio *in vivo* sono associati al rilascio di trasmettitori chimici diventa quindi di estrema importanza. Future ricerche dovranno definire in modo chiaro ed inequivocabile come il rilascio di gliotrasmettitori possa influenzare e/o modulare i circuiti neuronali adiacenti.

In conclusione, dai dati presentati si può dedurre che gli endocannabinoidi agiscono sul recettore CB1 presente sugli astrociti e determinano il rilascio di glutammato secondo un meccanismo esocitotico. Il glutammato rilasciato in queste condizioni potrebbe essere implicato nei normali processi fisiologici di comunicazione intercellulare. In condizioni patologiche potrebbe verificarsi una diminuzione dei livelli endogeni di endocannabinoidi, legata all’aumento della produzione di TNF- α e quindi di glutammato. Questo aumento potrebbe essere dovuto ad un’attività compensatoria della cellula in seguito alla disregolazione di un meccanismo omeostatico

5. RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare il Prof. Giacinto Bagetta per avermi dato l'opportunità di approfondire e accrescere la mia preparazione scientifica tramite il contatto con laboratori di alto livello.

Un doveroso e sentito ringraziamento va al Prof. Mauro Maccarrone, che mi ha seguito per i primi anni di dottorato, ed ai membri del suo gruppo Monica Bari, Valeria Gasperi, Filomena Fezza, Daniele Amadio, Chiara De Simone, Valentina Pirazzi e Monia Di Tommaso dell'Università di Roma Tor Vergata, che mi hanno affiancato nella prima parte del lavoro di tesi. Inoltre, ringrazio la Dott.ssa Natalia Battista, dell'Università di Teramo, per l'analisi dei livelli endogeni degli endocannabinoidi.

Ringrazio la Prof. Paola Bezzi che mi ha seguito nell'ultimo anno di dottorato che ho svolto al DBCM dell'Università di Losanna e mi aiutato nella stesura della tesi; ringrazio, inoltre Julie Marchaland, Corrado Cali, Osvaldo Mirante e Vanessa Schubert per il supporto negli esperimenti di imaging; Sabino Vesce e Mirko Santello per il confronto sulla discussione della tesi.

Ringrazio Stefania Curcio, Cristiana Sinapi, Giovanni Petrella e Nicolas Liaudet per l'assistenza tecnica e la loro costante disponibilità.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABEL, E.L. (1970). Marijuana and memory. *Nature*, **227**, 1151-2.
- AGUADO, F., ESPINOSA-PARRILLA, J.F., CARMONA, M.A. & SORIANO, E. (2002). Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci*, **22**, 9430-44.
- ALBILLOS, A., DERNICK, G., HORSTMANN, H., ALMERS, W., ALVAREZ DE TOLEDO, G. & LINDAU, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, **389**, 509-12.
- ALES, E., TABARES, L., POYATO, J.M., VALERO, V., LINDAU, M. & ALVAREZ DE TOLEDO, G. (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol*, **1**, 40-4.
- ALEXANDER, S.P. & KENDALL, D.A. (2007). The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *Br J Pharmacol*, **152**, 602-23.
- ARAQUE, A., PARPURA, V., SANZGIRI, R.P. & HAYDON, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, **22**, 208-15.
- ASENSIO, V.C. & CAMPBELL, I.L. (1999). Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci*, **22**, 504-12.
- ATCHISON, R.E., GOSLING, J., MONTECLARO, F.S., FRANCI, C., DIGILIO, L., CHARO, I.F. & GOLDSMITH, M.A. (1996). Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines. *Science*, **274**, 1924-6.
- AUCLAIR, N., OTANI, S., SOUBRIE, P. & CREPEL, F. (2000). Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, **83**, 3287-93.
- AVERY, J., ELLIS, D.J., LANG, T., HOLROYD, P., RIEDEL, D., HENDERSON, R.M., EDWARDSON, J.M. & JAHN, R. (2000). A cell-free system for regulated exocytosis in PC12 cells. *J Cell Biol*, **148**, 317-24.
- BAGETTA, G., CORASANITI, M.T., MALORNI, W., RAINALDI, G., BERLIOCCHI, L., FINAZZI-AGRO, A. & NISTICO, G. (1996). The HIV-1 gp120 causes ultrastructural changes typical of apoptosis in the rat cerebral cortex. *Neuroreport*, **7**, 1722-4.
- BAGETTA, G., CORASANITI, M.T., PAOLETTI, A.M., BERLIOCCHI, L., NISTICO, R., GIAMMARIOLI, A.M., MALORNI, W. & FINAZZI-AGRO, A. (1998). HIV-1 gp120-

- induced apoptosis in the rat neocortex involves enhanced expression of cyclooxygenase type 2 (COX-2). *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 819-24.
- BARI, M., BATTISTA, N., FEZZA, F., GASPERI, V. & MACCARRONE, M. (2006). New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem*, **6**, 257-68.
- BASS, N.H., HESS, H.H., POPE, A. & THALHEIMER, C. (1971). Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*, **143**, 481-90.
- BEGG, M., PACHER, P., BATKAI, S., OSEI-HYIAMAN, D., OFFERTALER, L., MO, F.M., LIU, J. & KUNOS, G. (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther*, **106**, 133-45.
- BELTRAMO, M. & PIOMELLI, D. (2000). Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylethanolamide. *Neuroreport*, **11**, 1231-5.
- BELTRAMO, M., STELLA, N., CALIGNANO, A., LIN, S.Y., MAKRIYANNIS, A. & PIOMELLI, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, **277**, 1094-7.
- BENITO, C., NUNEZ, E., TOLON, R.M., CARRIER, E.J., RABANO, A., HILLARD, C.J. & ROMERO, J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*, **23**, 11136-41.
- BENITO, C., ROMERO, J.P., TOLON, R.M., CLEMENTE, D., DOCAGNE, F., HILLARD, C.J., GUAZA, C. & ROMERO, J. (2007). Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J Neurosci*, **27**, 2396-402.
- BENOS, D.J., MCPHERSON, S., HAHN, B.H., CHAIKIN, M.A. & BENVENISTE, E.N. (1994). Cytokines and HIV envelope glycoprotein gp120 stimulate Na⁺/H⁺ exchange in astrocytes. *J Biol Chem*, **269**, 13811-6.
- BEZZI, P., CARMIGNOTO, G., PASTI, L., VESCE, S., ROSSI, D., RIZZINI, B.L., POZZAN, T. & VOLTERRA, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, **391**, 281-5.
- BEZZI, P., DOMERCQ, M., BRAMBILLA, L., GALLI, R., SCHOLS, D., DE CLERCQ, E., VESCOVI, A., BAGETTA, G., KOLLIAS, G., MELDOLESI, J. & VOLTERRA, A. (2001a). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*, **4**, 702-10.

- BEZZI, P., GUNDERSEN, V., GALBETE, J.L., SEIFERT, G., STEINHAUSER, C., PILATI, E. & VOLTERRA, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*, **7**, 613-20.
- BEZZI, P. & VOLTERRA, A. (2001b). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol*, **11**, 387-94.
- BISOGNO, T., HOWELL, F., WILLIAMS, G., MINASSI, A., CASCIO, M.G., LIGRESTI, A., MATIAS, I., SCHIANO-MORIELLO, A., PAUL, P., WILLIAMS, E.J., GANGADHARAN, U., HOBBS, C., DI MARZO, V. & DOHERTY, P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*, **163**, 463-8.
- BISOGNO, T., MACCARRONE, M., DE PETROCELLIS, L., JARRAHIAN, A., FINAZZI-AGRO, A., HILLARD, C. & DI MARZO, V. (2001). The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem*, **268**, 1982-9.
- BLANKMAN, J.L., SIMON, G.M. & CRAVATT, B.F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, **14**, 1347-56.
- BOUABOULA, M., BOURRIE, B., RINALDI-CARMONA, M., SHIRE, D., LE FUR, G. & CASELLAS, P. (1995a). Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem*, **270**, 13973-80.
- BOUABOULA, M., DUSSOSSOY, D. & CASELLAS, P. (1999). Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 phosphorylation by the inverse agonist SR 144528. Implications for receptor biological responses. *J Biol Chem*, **274**, 20397-405.
- BOUABOULA, M., POINOT-CHAZEL, C., BOURRIE, B., CANAT, X., CALANDRA, B., RINALDI-CARMONA, M., LE FUR, G. & CASELLAS, P. (1995b). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*, **312** (Pt 2), 637-41.
- BRACEY, M.H., HANSON, M.A., MASUDA, K.R., STEVENS, R.C. & CRAVATT, B.F. (2002). Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*, **298**, 1793-6.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.

- BUSHONG, E.A., MARTONE, M.E. & ELLISMAN, M.H. (2004). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci*, **22**, 73-86.
- BUSHONG, E.A., MARTONE, M.E., JONES, Y.Z. & ELLISMAN, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, **22**, 183-92.
- CABRAL, G.A. & DOVE PETTIT, D.A. (1998). Drugs and immunity: cannabinoids and their role in decreased resistance to infectious disease. *J Neuroimmunol*, **83**, 116-23.
- CALI, C., MARCHALAND, J., REGAZZI, R. & BEZZI, P. (2008). SDF 1-alpha (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. *J Neuroimmunol*, **198**, 82-91.
- CALIGNANO, A., LA RANA, G., GIUFFRIDA, A. & PIOMELLI, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, **394**, 277-81.
- CARMIGNOTO, G., PASTI, L. & POZZAN, T. (1998). On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes in situ. *J Neurosci*, **18**, 4637-45.
- CARRACEDO, A., LORENTE, M., EGIA, A., BLAZQUEZ, C., GARCIA, S., GIROUX, V., MALICET, C., VILLUENDAS, R., GIRONELLA, M., GONZALEZ-FERIA, L., PIRIS, M.A., IOVANNA, J.L., GUZMAN, M. & VELASCO, G. (2006). The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*, **9**, 301-12.
- CARRIER, E.J., KEARN, C.S., BARKMEIER, A.J., BREESE, N.M., YANG, W., NITHIPATIKOM, K., PFISTER, S.L., CAMPBELL, W.B. & HILLARD, C.J. (2004). Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, **65**, 999-1007.
- CATERINA, M.J., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D. & JULIUS, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-24.
- CENTONZE, D., FINAZZI-AGRO, A., BERNARDI, G. & MACCARRONE, M. (2007). The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci*, **28**, 180-7.
- CHAO, T., RICKMAN, M. & WOLFF, J. (2002). In *The Tripartite Synapse: Glia in Synaptic transmission* ed. Volterra, A., Magistretti, P. & Haydon, P. pp. 3-23. Oxford Univ. Press, Oxford UK

- CHEN, X., WANG, L., ZHOU, Y., ZHENG, L.H. & ZHOU, Z. (2005). "Kiss-and-run" glutamate secretion in cultured and freshly isolated rat hippocampal astrocytes. *J Neurosci*, **25**, 9236-43.
- CHEVALEYRE, V., TAKAHASHI, K.A. & CASTILLO, P.E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 37-76.
- CHIEREGATTI, E., CHICKA, M.C., CHAPMAN, E.R. & BALDINI, G. (2004). SNAP-23 functions in docking/fusion of granules at low Ca²⁺. *Mol Biol Cell*, **15**, 1918-30.
- CHIEREGATTI, E. & MELDOLESI, J. (2005). Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 181-7.
- CHILCOTE, T.J., GALLI, T., MUNDIGL, O., EDELMANN, L., MCPHERSON, P.S., TAKEI, K. & DE CAMILLI, P. (1995). Cellubrevin and synaptobrevins: similar subcellular localization and biochemical properties in PC12 cells. *J Cell Biol*, **129**, 219-31.
- CHILDERS, S.R. (2006). Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. *Aaps J*, **8**, E112-7.
- CHO, C. & MILLER, R.J. (2002). Chemokine receptors and neural function. *J Neurovirol*, **8**, 573-84.
- CHOW, R.H., KLINGAUF, J., HEINEMANN, C., ZUCKER, R.S. & NEHER, E. (1996). Mechanisms determining the time course of secretion in neuroendocrine cells. *Neuron*, **16**, 369-76.
- CHOW, R.H., KLINGAUF, J. & NEHER, E. (1994). Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12765-9.
- COCO, S., VERDERIO, C., TROTTI, D., ROTHSTEIN, J.D., VOLTERRA, A. & MATTEOLI, M. (1997). Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, **9**, 1902-10.
- CODAZZI, F., MENEGON, A., ZACCHETTI, D., CIARDO, A., GROHOVAZ, F. & MELDOLESI, J. (1995). HIV-1 gp120 glycoprotein induces [Ca²⁺]_i responses not only in type-2 but also type-1 astrocytes and oligodendrocytes of the rat cerebellum. *Eur J Neurosci*, **7**, 1333-41.
- CORASANITI, M.T., MELINO, G., NAVARRA, M., GARACI, E., FINAZZI-AGRO, A. & NISTICO, G. (1995). Death of cultured human neuroblastoma cells induced by HIV-1 gp120 is prevented by NMDA receptor antagonists and inhibitors of nitric oxide and cyclooxygenase. *Neurodegeneration*, **4**, 315-21.

- CORASANITI, M.T., RUSSO, R., AMANTEA, D., GLIOZZI, M., SIVIGLIA, E., STRINGARO, A.R., MALORNI, W., MELINO, G. & BAGETTA, G. (2005). Neuroprotection by the caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-(acyloxy)mk in experimental neuroAIDS is independent from IL-1beta generation. *Cell Death Differ*, **12 Suppl 1**, 999-1001.
- CRAVATT, B.F., DEMAREST, K., PATRICELLI, M.P., BRACEY, M.H., GIANG, D.K., MARTIN, B.R. & LICHTMAN, A.H. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9371-6.
- CRAVATT, B.F., GIANG, D.K., MAYFIELD, S.P., BOGER, D.L., LERNER, R.A. & GILULA, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, **384**, 83-7.
- CRIPPA, D., SCHENK, U., FRANCOLINI, M., ROSA, P., VERDERIO, C., ZONTA, M., POZZAN, T., MATTEOLI, M. & CARMIGNOTO, G. (2006). Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol*, **570**, 567-82.
- DE PETROCELLIS, L., CASCIO, M.G. & DI MARZO, V. (2004). The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol*, **141**, 765-74.
- DEHNES, Y., CHAUDHRY, F.A., ULLENSVANG, K., LEHRE, K.P., STORM-MATHISEN, J. & DANBOLT, N.C. (1998). The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci*, **18**, 3606-19.
- DEVANE, W.A., DYSARZ, F.A., 3RD, JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S. & HOWLETT, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, **34**, 605-13.
- DEVANE, W.A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R.G., STEVENSON, L.A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A. & MECHOULAM, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**, 1946-9.
- DEWEY, W.L. (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev*, **38**, 151-78.
- DI MARZO, V., BIFULCO, M. & DE PETROCELLIS, L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 771-84.
- DI MARZO, V., FONTANA, A., CADAS, H., SCHINELLI, S., CIMINO, G., SCHWARTZ, J.C. & PIOMELLI, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, **372**, 686-91.

- DI MARZO, V. & PETROSINO, S. (2007). Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol*, **18**, 129-40.
- DIAMOND, M.C., SCHEIBEL, A.B., MURPHY, G.M., JR. & HARVEY, T. (1985). On the brain of a scientist: Albert Einstein. *Exp Neurol*, **88**, 198-204.
- DINH, T.P., FREUND, T.F. & PIOMELLI, D. (2002). A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids*, **121**, 149-58.
- DOMERCQ, M., BRAMBILLA, L., PILATI, E., MARCHALAND, J., VOLTERRA, A. & BEZZI, P. (2006). P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J Biol Chem*, **281**, 30684-96.
- DREYER, E.B., KAISER, P.K., OFFERMANN, J.T. & LIPTON, S.A. (1990). HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. *Science*, **248**, 364-7.
- DREYER, E.B. & LIPTON, S.A. (1995). The coat protein gp120 of HIV-1 inhibits astrocyte uptake of excitatory amino acids via macrophage arachidonic acid. *Eur J Neurosci*, **7**, 2502-7.
- DUAN, S., ANDERSON, C.M., KEUNG, E.C., CHEN, Y., CHEN, Y. & SWANSON, R.A. (2003). P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci*, **23**, 1320-8.
- EGERTOVA, M., CRAVATT, B.F. & ELPICK, M.R. (2003). Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*, **119**, 481-96.
- EHRHART, J., OBREGON, D., MORI, T., HOU, H., SUN, N., BAI, Y., KLEIN, T., FERNANDEZ, F., TAN, J. & SHYTLER, R.D. (2005). Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation*, **2**, 29.
- ELJASCHEWITSCH, E., WITTING, A., MAWRIN, C., LEE, T., SCHMIDT, P.M., WOLF, S., HOERTNAGL, H., RAINE, C.S., SCHNEIDER-STOCK, R., NITSCH, R. & ULLRICH, O. (2006). The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*, **49**, 67-79.
- EVANKO, D.S., ZHANG, Q., ZOREC, R. & HAYDON, P.G. (2004). Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia*, **47**, 233-40.
- FELLIN, T., PASCUAL, O., GOBBO, S., POZZAN, T., HAYDON, P.G. & CARMIGNOTO, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*, **43**, 729-43.

- FERNANDEZ-LOPEZ, D., MARTINEZ-ORGADO, J., NUNEZ, E., ROMERO, J., LORENZO, P., MORO, M.A. & LIZASOAIN, I. (2006). Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res*, **60**, 169-73.
- FERNANDEZ-RUIZ, J., ROMERO, J., VELASCO, G., TOLON, R.M., RAMOS, J.A. & GUZMAN, M. (2007). Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci*, **28**, 39-45.
- FEZZA, F., DE SIMONE, C., AMADIO, D. & MACCARRONE, M. (2008). Fatty Acid Amide Hydrolase: A Gate-Keeper of the Endocannabinoid System. *Subcell Biochem*, **49**, 101-132.
- FEZZA, F., GASPERI, V., MAZZEI, C. & MACCARRONE, M. (2005). Radiochromatographic assay of N-acyl-phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D activity. *Anal Biochem*, **339**, 113-20.
- FIACCO, T.A., AGULHON, C. & MCCARTHY, K.D. (2008). Sorting out Astrocyte Physiology from Pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
- FOWLER, C.J. (2005). Pharmacological properties and therapeutic possibilities for drugs acting upon endocannabinoid receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, **4**, 685-96.
- FREMEAU, R.T., JR., VOGLMAIER, S., SEAL, R.P. & EDWARDS, R.H. (2004). VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci*, **27**, 98-103.
- FREUND, T.F., KATONA, I. & PIOMELLI, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, **83**, 1017-66.
- GALVE-ROPERH, I., AGUADO, T., PALAZUELOS, J. & GUZMAN, M. (2008). Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr Pharm Des*, **14**, 2279-88.
- GALVE-ROPERH, I., RUEDA, D., GOMEZ DEL PULGAR, T., VELASCO, G. & GUZMAN, M. (2002). Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol*, **62**, 1385-92.
- GARCIA, A.D., DOAN, N.B., IMURA, T., BUSH, T.G. & SOFRONIEW, M.V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, **7**, 1233-41.
- GARCIA, D.E., BROWN, S., HILLE, B. & MACKIE, K. (1998). Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurosci*, **18**, 2834-41.

- GERDEMAN, G.L., RONESI, J. & LOVINGER, D.M. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci*, **5**, 446-51.
- GLASER, S.T., KACZOCHA, M. & DEUTSCH, D.G. (2005). Anandamide transport: a critical review. *Life Sci*, **77**, 1584-604.
- GOLGI, C. (1871). Contribuzione alla fine anatomia degli organi centrali del sistema nervoso. *Rivista Clinica di Bologna, Bologna*.
- GOMEZ DEL PULGAR, T., VELASCO, G. & GUZMAN, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J*, **347**, 369-73.
- GONG, J.P., ONAIVI, E.S., ISHIGURO, H., LIU, Q.R., TAGLIAFERRO, P.A., BRUSCO, A. & UHL, G.R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*, **1071**, 10-23.
- GONSIOREK, W., LUNN, C., FAN, X., NARULA, S., LUNDELL, D. & HIPKIN, R.W. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*, **57**, 1045-50.
- GOPARAJU, S.K., UEDA, N., TANIGUCHI, K. & YAMAMOTO, S. (1999). Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, **57**, 417-23.
- GOPARAJU, S.K., UEDA, N., YAMAGUCHI, H. & YAMAMOTO, S. (1998). Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett*, **422**, 69-73.
- GORDON, G.R., CHOI, H.B., RUNGTA, R.L., ELLIS-DAVIES, G.C. & MACVICAR, B.A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*.
- GRASS, D., PAWLOWSKI, P.G., HIRRLINGER, J., PAPADOPOULOS, N., RICHTER, D.W., KIRCHHOFF, F. & HULSMANN, S. (2004). Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *J Neurosci*, **24**, 1358-65.
- GUYON, A. & NAHON, J.L. (2007). Multiple actions of the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha on neuronal activity. *J Mol Endocrinol*, **38**, 365-76.
- HAMA, H., HARA, C., YAMAGUCHI, K. & MIYAWAKI, A. (2004). PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*, **41**, 405-15.
- HANUS, L., ABU-LAFI, S., FRIDE, E., BREUER, A., VOGEL, Z., SHALEV, D.E., KUSTANOVICH, I. & MECHOULAM, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an

- endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3662-5.
- HAUGH, J.M., CODAZZI, F., TERUEL, M. & MEYER, T. (2000). Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides. *J Cell Biol*, **151**, 1269-80.
- HAYDON, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 185-93.
- HERKENHAM, M., LYNN, A.B., LITTLE, M.D., JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S., DE COSTA, B.R. & RICE, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1932-6.
- HILL, J.M., MERVIS, R.F., AVIDOR, R., MOODY, T.W. & BRENNEMAN, D.E. (1993). HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development in rat neonates. *Brain Res*, **603**, 222-33.
- HILLARD, C.J. & JARRAHIAN, A. (2003). Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br J Pharmacol*, **140**, 802-8.
- HIRASE, H. (2005). A multi-photon window onto neuronal-glia-vascular communication. *Trends Neurosci*, **28**, 217-9.
- HIRASE, H., QIAN, L., BARTHO, P. & BUZSAKI, G. (2004). Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol*, **2**, E96.
- HO, S.Y., DELGADO, L. & STORCH, J. (2002). Monoacylglycerol metabolism in human intestinal Caco-2 cells: evidence for metabolic compartmentation and hydrolysis. *J Biol Chem*, **277**, 1816-23.
- HOWLETT, A.C. (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 619-31.
- HOWLETT, A.C., BARTH, F., BONNER, T.I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W.A., FELDER, C.C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B.R., MECHOULAM, R. & PERTWEE, R.G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, **54**, 161-202.
- HOWLETT, A.C., BREIVOGEL, C.S., CHILDERS, S.R., DEADWYLER, S.A., HAMPSON, R.E. & PORRINO, L.J. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, **47 Suppl 1**, 345-58.
- HSIEH, C., BROWN, S., DERLETH, C. & MACKIE, K. (1999). Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem*, **73**, 493-501.

- HUANG, S.M., BISOGNO, T., PETROS, T.J., CHANG, S.Y., ZAVITSANOS, P.A., ZIPKIN, R.E., SIVAKUMAR, R., COOP, A., MAEDA, D.Y., DE PETROCELLIS, L., BURSTEIN, S., DI MARZO, V. & WALKER, J.M. (2001). Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *J Biol Chem*, **276**, 42639-44.
- HUANG, S.M., BISOGNO, T., TREVISANI, M., AL-HAYANI, A., DE PETROCELLIS, L., FEZZA, F., TOGNETTO, M., PETROS, T.J., KREY, J.F., CHU, C.J., MILLER, J.D., DAVIES, S.N., GEPPETTI, P., WALKER, J.M. & DI MARZO, V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8400-5.
- IINO, M., GOTO, K., KAKEGAWA, W., OKADO, H., SUDO, M., ISHIUCHI, S., MIWA, A., TAKAYASU, Y., SAITO, I., TSUZUKI, K. & OZAWA, S. (2001). Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science*, **292**, 926-9.
- IVERSEN, L. (2000). *The Science of Marijuana*. Oxford University Press, Oxford, UK
- JARAI, Z., WAGNER, J.A., VARGA, K., LAKE, K.D., COMPTON, D.R., MARTIN, B.R., ZIMMER, A.M., BONNER, T.I., BUCKLEY, N.E., MEZEY, E., RAZDAN, R.K., ZIMMER, A. & KUNOS, G. (1999). Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14136-41.
- JIN, X.H., OKAMOTO, Y., MORISHITA, J., TSUBOI, K., TONAI, T. & UEDA, N. (2007). Discovery and characterization of a Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *J Biol Chem*, **282**, 3614-23.
- JOURDAIN, P., BERGERSEN, L.H., BHAUKAURALLY, K., BEZZI, P., SANTELLO, M., DOMERCQ, M., MATUTE, C., TONELLO, F., GUNDERSEN, V. & VOLTERRA, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*, **10**, 331-9.
- JUNG, K.M., MANGIERI, R., STAPLETON, C., KIM, J., FEGLEY, D., WALLACE, M., MACKIE, K. & PIOMELLI, D. (2005). Stimulation of endocannabinoid formation in brain slice cultures through activation of group I metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol*, **68**, 1196-202.
- KARWOSKI, C.J., LU, H.K. & NEWMAN, E.A. (1989). Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Muller (glial) cells. *Science*, **244**, 578-80.
- KASAI, H. (1999). Comparative biology of Ca²⁺-dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function. *Trends Neurosci*, **22**, 88-93.

- KAUL, M., GARDEN, G.A. & LIPTON, S.A. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, **410**, 988-94.
- KAUL, M., ZHENG, J., OKAMOTO, S., GENDELMAN, H.E. & LIPTON, S.A. (2005). HIV-1 infection and AIDS: consequences for the central nervous system. *Cell Death Differ*, **12 Suppl 1**, 878-92.
- KETTENMANN, H. & RANSOM, B. (2005). In *neuroglia*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- KHANOLKAR, A.D., PALMER, S.L. & MAKRIYANNIS, A. (2000). Molecular probes for the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids*, **108**, 37-52.
- KIMELBERG, H.K., GODERIE, S.K., HIGMAN, S., PANG, S. & WANIEWSKI, R.A. (1990). Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci*, **10**, 1583-91.
- KREBS, C., FERNANDES, H.B., SHELDON, C., RAYMOND, L.A. & BAIMBRIDGE, K.G. (2003). Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia in vivo and anoxia in vitro. *J Neurosci*, **23**, 3364-72.
- KREFT, M., STENOVEC, M., RUPNIK, M., GRILC, S., KRZAN, M., POTOKAR, M., PANGRSIC, T., HAYDON, P.G. & ZOREC, R. (2004). Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes. *Glia*, **46**, 437-45.
- KREITZER, A.C. & REGEHR, W.G. (2001a). Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci*, **21**, RC174.
- KREITZER, A.C. & REGEHR, W.G. (2001b). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, **29**, 717-27.
- LANG, T., WACKER, I., STEYER, J., KAETHER, C., WUNDERLICH, I., SOLDATI, T., GERDES, H.H. & ALMERS, W. (1997). Ca²⁺-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy. *Neuron*, **18**, 857-63.
- LANGE, J.H. & KRUSE, C.G. (2005). Keynote review: Medicinal chemistry strategies to CB1 cannabinoid receptor antagonists. *Drug Discov Today*, **10**, 693-702.
- LAUCKNER, J.E., HILLE, B. & MACKIE, K. (2005). The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 19144-9.

- LAWRENCE, D.K. & GILL, E.W. (1975). The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol Pharmacol*, **11**, 595-602.
- LIMATOLA, C., GIOVANNELLI, A., MAGGI, L., RAGOZZINO, D., CASTELLANI, L., CIOTTI, M.T., VACCA, F., MERCANTI, D., SANTONI, A. & EUSEBI, F. (2000). SDF-1alpha-mediated modulation of synaptic transmission in rat cerebellum. *Eur J Neurosci*, **12**, 2497-504.
- LIPTON, S.A. & GENDELMAN, H.E. (1995). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, **332**, 934-40.
- LIPTON, S.A., SUCHER, N.J., KAISER, P.K. & DREYER, E.B. (1991). Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Neuron*, **7**, 111-8.
- LIU, J., WANG, L., HARVEY-WHITE, J., OSEI-HYIAMAN, D., RAZDAN, R., GONG, Q., CHAN, A.C., ZHOU, Z., HUANG, B.X., KIM, H.Y. & KUNOS, G. (2006). A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13345-50.
- LUNA-MEDINA, R., CORTES-CANTELI, M., SANCHEZ-GALIANO, S., MORALES-GARCIA, J.A., MARTINEZ, A., SANTOS, A. & PEREZ-CASTILLO, A. (2007). NP031112, a thiadiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *J Neurosci*, **27**, 5766-76.
- LUO, Y., YIN, W., SIGNORE, A.P., ZHANG, F., HONG, Z., WANG, S., GRAHAM, S.H. & CHEN, J. (2006). Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem*, **97**, 435-48.
- LUTZ, B. (2002). Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **66**, 123-42.
- MACCARRONE, M. (2008). Endocannabinoid signaling and neuroinflammatory diseases. *Curr Pharm Des*, **14**, 2252-3.
- MACCARRONE, M., BARBONI, B., PARADISI, A., BERNABO, N., GASPERI, V., PISTILLI, M.G., FEZZA, F., LUCIDI, P. & MATTIOLI, M. (2005). Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci*, **118**, 4393-404.
- MACCARRONE, M., BARI, M., CORASANITI, M.T., NISTICO, R., BAGETTA, G. & FINAZZI-AGRO, A. (2000a). HIV-1 coat glycoprotein gp120 induces apoptosis in rat brain

- neocortex by deranging the arachidonate cascade in favor of prostanoids. *J Neurochem*, **75**, 196-203.
- MACCARRONE, M., BARI, M., LORENZON, T., BISOGNO, T., DI MARZO, V. & FINAZZI-AGRO, A. (2000b). Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem*, **275**, 13484-92.
- MACCARRONE, M., PICCIRILLI, S., BATTISTA, N., DEL DUCA, C., NAPPI, G., CORASANITI, M.T., FINAZZI-AGRO, A. & BAGETTA, G. (2004). Enhanced anandamide degradation is associated with neuronal apoptosis induced by the HIV-1 coat glycoprotein gp120 in the rat neocortex. *J Neurochem*, **89**, 1293-300.
- MACKIE, K. (2006). Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **46**, 101-22.
- MAHAJAN, S.D., AALINKEEL, R., REYNOLDS, J.L., NAIR, B.B., FERNANDEZ, S.F., SCHWARTZ, S.A. & NAIR, M.P. (2005). Morphine exacerbates HIV-1 viral protein gp120 induced modulation of chemokine gene expression in U373 astrocytoma cells. *Curr HIV Res*, **3**, 277-88.
- MARAGAKIS, N.J. & ROTHSTEIN, J.D. (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*, **2**, 679-89.
- MARCHALAND, J., CALI, C., VOGLMAIER, S.M., LI, H., REGAZZI, R., EDWARDS, R.H. & BEZZI, P. (2008). Fast subplasma membrane Ca²⁺ transients control exocytosis of synaptic-like microvesicles in astrocytes. *J Neurosci*, **28**, 9122-32.
- MARINELLI, S., DI MARZO, V., BERRETTA, N., MATIAS, I., MACCARRONE, M., BERNARDI, G. & MERCURI, N.B. (2003). Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci*, **23**, 3136-44.
- MARSICANO, G., GOODENOUGH, S., MONORY, K., HERMANN, H., EDER, M., CANNICH, A., AZAD, S.C., CASCIO, M.G., GUTIERREZ, S.O., VAN DER STELT, M., LOPEZ-RODRIGUEZ, M.L., CASANOVA, E., SCHUTZ, G., ZIEGLGANSBERGER, W., DI MARZO, V., BEHL, C. & LUTZ, B. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, **302**, 84-8.
- MASSI, P., VALENTI, M., BOLOGNINI, D. & PAROLARO, D. (2008). Expression and function of the endocannabinoid system in glial cells. *Curr Pharm Des*, **14**, 2289-98.
- MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTEIN, M.J., YOUNG, A.C. & BONNER, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**, 561-4.

- MATTHIAS, K., KIRCHHOFF, F., SEIFERT, G., HUTTMANN, K., MATYASH, M., KETTENMANN, H. & STEINHAUSER, C. (2003). Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci*, **23**, 1750-8.
- MAUCH, D.H., NAGLER, K., SCHUMACHER, S., GORITZ, C., MULLER, E.C., OTTO, A. & PFRIEGER, F.W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, **294**, 1354-7.
- MCKINNEY, M.K. & CRAVATT, B.F. (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem*, **74**, 411-32.
- MECHOULAM, R. (1986). In *The pharmacohistory of cannabis sativa, in Cannabis as Therapeutic Agent*. ed. Mechoulam, R. pp. 1-19. CRC Press, Boca Raton, FL.
- MECHOULAM, R. (2002). Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **66**, 93-9.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N.E., SCHATZ, A.R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B.R., COMPTON, D.R. & ET AL. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, **50**, 83-90.
- MECHOULAM, R. & DEUTSCH, D.G. (2005). Toward an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17541-2.
- MECHOULAM, R. & GAONI, Y. (1967). The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett*, **12**, 1109-11.
- MECHOULAM, R. & GAONI, Y. (1965). A Total Synthesis of DI-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*, **87**, 3273-5.
- MECHOULAM, R. & LICHTMAN, A.H. (2003). Neuroscience. Stout guards of the central nervous system. *Science*, **302**, 65-7.
- MECHOULAM, R. & SHOHAMI, E. (2007). Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*, **36**, 68-74.
- MELIS, M., PERRA, S., MUNTONI, A.L., PILLLOLA, G., LUTZ, B., MARSICANO, G., DI MARZO, V., GESSA, G.L. & PISTIS, M. (2004). Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci*, **24**, 10707-15.

- MEUCCI, O. & MILLER, R.J. (1996). gp120-induced neurotoxicity in hippocampal pyramidal neuron cultures: protective action of TGF-beta1. *J Neurosci*, **16**, 4080-8.
- MEZEY, E., TOTH, Z.E., CORTRIGHT, D.N., ARZUBI, M.K., KRAUSE, J.E., ELDE, R., GUO, A., BLUMBERG, P.M. & SZALLASI, A. (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3655-60.
- MILLER, G. (2005). Neuroscience. The dark side of glia. *Science*, **308**, 778-81.
- MINAMI, M. & SATOH, M. (1995). Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res*, **23**, 121-45.
- MOLINA-HOLGADO, F., MOLINA-HOLGADO, E., GUAZA, C. & ROTHWELL, N.J. (2002). Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *J Neurosci Res*, **67**, 829-36.
- MONORY, K., MASSA, F., EGERTOVA, M., EDER, M., BLAUDZUN, H., WESTENBROEK, R., KELSCH, W., JACOB, W., MARSCH, R., EKKER, M., LONG, J., RUBENSTEIN, J.L., GOEBBELS, S., NAVE, K.A., DURING, M., KLUGMANN, M., WOLFEL, B., DODT, H.U., ZIEGLGANSBERGER, W., WOTJAK, C.T., MACKIE, K., ELPHICK, M.R., MARSICANO, G. & LUTZ, B. (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, **51**, 455-66.
- MONTANA, V., NI, Y., SUNJARA, V., HUA, X. & PARPURA, V. (2004). Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*, **24**, 2633-42.
- MOORE, S.A., NOMIKOS, G.G., DICKASON-CHESTERFIELD, A.K., SCHOBBER, D.A., SCHAUS, J.M., YING, B.P., XU, Y.C., PHEBUS, L., SIMMONS, R.M., LI, D., IYENGAR, S. & FELDER, C.C. (2005). Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17852-7.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- MUALLEM, S., KWIATKOWSKA, K., XU, X. & YIN, H.L. (1995). Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol*, **128**, 589-98.
- MUCCIOLI, G.G., XU, C., ODAH, E., CUDABACK, E., CISNEROS, J.A., LAMBERT, D.M., LOPEZ RODRIGUEZ, M.L., BAJJALIEH, S. & STELLA, N. (2007). Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J Neurosci*, **27**, 2883-9.

- MUNRO, S., THOMAS, K.L. & ABU-SHAAR, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**, 61-5.
- MURILLO-RODRIGUEZ, E., DESARNAUD, F. & PROSPERO-GARCIA, O. (2006). Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci*, **79**, 30-7.
- MUYDERMAN, H., ANGEHAGEN, M., SANDBERG, M., BJORKLUND, U., OLSSON, T., HANSSON, E. & NILSSON, M. (2001). Alpha 1-adrenergic modulation of metabotropic glutamate receptor-induced calcium oscillations and glutamate release in astrocytes. *J Biol Chem*, **276**, 46504-14.
- NAGAYAMA, T., SINOR, A.D., SIMON, R.P., CHEN, J., GRAHAM, S.H., JIN, K. & GREENBERG, D.A. (1999). Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci*, **19**, 2987-95.
- NAVARRA, M., BALTRONS, M.A., SARDON, T., PEDRAZA, C.E. & GARCIA, A. (2004). HIV-1 coat protein gp120 decreases NO-dependent cyclic GMP accumulation in rat brain astroglia by increasing cyclic GMP phosphodiesterase activity. *Neurochem Int*, **45**, 937-46.
- NAVARRETE, M. & ARAQUE, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, **57**, 883-93.
- NEDERGAARD, M., RANSOM, B. & GOLDMAN, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*, **26**, 523-30.
- NEDERGAARD, M., TAKANO, T. & HANSEN, A.J. (2002). Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 748-55.
- O'SULLIVAN, S.E. (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*, **152**, 576-82.
- ODDI, S., FEZZA, F., PASQUARIELLO, N., DE SIMONE, C., RAPINO, C., DAINESE, E., FINAZZI-AGRO, A. & MACCARRONE, M. (2008). Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 840-50.
- OHNO-SHOSAKU, T., MAEJIMA, T. & KANO, M. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, **29**, 729-38.
- OKAMOTO, Y., MORISHITA, J., TSUBOI, K., TONAI, T. & UEDA, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*, **279**, 5298-305.

- ORTEGA-GUTIERREZ, S., MOLINA-HOLGADO, E. & GUAZA, C. (2005). Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia*, **52**, 163-8.
- PACHER, P., BATKAI, S. & KUNOS, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, **58**, 389-462.
- PARPURA, V., BASARSKY, T.A., LIU, F., JEFTINIJA, K., JEFTINIJA, S. & HAYDON, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, **369**, 744-7.
- PASTI, L., VOLTERRA, A., POZZAN, T. & CARMIGNOTO, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci*, **17**, 7817-30.
- PASTI, L., ZONTA, M., POZZAN, T., VICINI, S. & CARMIGNOTO, G. (2001). Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci*, **21**, 477-84.
- PATRICELLI, M.P. & CRAVATT, B.F. (1999). Fatty acid amide hydrolase competitively degrades bioactive amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism. *Biochemistry*, **38**, 14125-30.
- PAZOS, M.R., NUNEZ, E., BENITO, C., TOLON, R.M. & ROMERO, J. (2005). Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav*, **81**, 239-47.
- PEREA, G. & ARAQUE, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, **317**, 1083-6.
- PERRY, V.H., BELL, M.D., BROWN, H.C. & MATYSZAK, M.K. (1995). Inflammation in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, **5**, 636-41.
- PERTWEE, R.G. (2000). Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Investig Drugs*, **9**, 1553-71.
- PERTWEE, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*, **74**, 129-80.
- PIOMELLI, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 873-84.
- PORTER, A.C., SAUER, J.M., KNIERMAN, M.D., BECKER, G.W., BERNA, M.J., BAO, J., NOMIKOS, G.G., CARTER, P., BYMASTER, F.P., LEESE, A.B. & FELDER, C.C. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, **301**, 1020-4.

- PRICE, R.W., BREW, B., SIDTIS, J., ROSENBLUM, M., SCHECK, A.C. & CLEARY, P. (1988). The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science*, **239**, 586-92.
- RAFF, M.C. (1989). Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science*, **243**, 1450-5.
- RANSOM, B., BEHAR, T. & NEDERGAARD, M. (2003). New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci*, **26**, 520-2.
- REGGIO, P.H. & TRAORE, H. (2000). Conformational requirements for endocannabinoid interaction with the cannabinoid receptors, the anandamide transporter and fatty acid amidohydrolase. *Chem Phys Lipids*, **108**, 15-35.
- RHEE, M.H., BAYEWITCH, M., AVIDOR-REISS, T., LEVY, R. & VOGEL, Z. (1998). Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*, **71**, 1525-34.
- RICHARDSON, D., ORTORI, C.A., CHAPMAN, V., KENDALL, D.A. & BARRETT, D.A. (2007). Quantitative profiling of endocannabinoids and related compounds in rat brain using liquid chromatography-tandem electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, **360**, 216-26.
- RINALDI-CARMONA, M., BARTH, F., CONGY, C., MARTINEZ, S., OUSTRIC, D., PERIO, A., PONCELET, M., MARUANI, J., ARNONE, M., FINANCE, O., SOUBRIE, P. & LE FUR, G. (2004). SR147778 [5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB1 cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, **310**, 905-14.
- ROBBE, D., KOPF, M., REMAURY, A., BOCKAERT, J. & MANZONI, O.J. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8384-8.
- ROCKWELL, C.E. & KAMINSKI, N.E. (2004). A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **311**, 683-90.
- ROCKWELL, C.E., SNIDER, N.T., THOMPSON, J.T., VANDEN HEUVEL, J.P. & KAMINSKI, N.E. (2006). Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol*, **70**, 101-11.
- ROMERO, J., LASTRES-BECKER, I., DE MIGUEL, R., BERRENDERO, F., RAMOS, J.A. & FERNANDEZ-RUIZ, J. (2002). The endogenous cannabinoid system and the basal

- ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol Ther*, **95**, 137-52.
- ROSS, R.A., GIBSON, T.M., BROCKIE, H.C., LESLIE, M., PASHMI, G., CRAIB, S.J., DI MARZO, V. & PERTWEE, R.G. (2001). Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br J Pharmacol*, **132**, 631-40.
- ROSSI, D.J., OSHIMA, T. & ATTWELL, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, **403**, 316-21.
- ROSTENE, W., KITABGI, P. & PARSADANIANTZ, S.M. (2007). Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci*, **8**, 895-903.
- ROUZER, C.A. & MARNETT, L.J. (2008). Non-redundant functions of cyclooxygenases: oxygenation of endocannabinoids. *J Biol Chem*, **283**, 8065-9.
- RUSSO, R., NAVARRA, M., MAIUOLO, J., ROTIROTI, D., BAGETTA, G. & CORASANITI, M.T. (2005). 17beta-estradiol protects SH-SY5Y Cells against HIV-1 gp120-induced cell death: evidence for a role of estrogen receptors. *Neurotoxicology*, **26**, 905-13.
- RYBERG, E., LARSSON, N., SJOGREN, S., HJORTH, S., HERMANSSON, N.O., LEONOVA, J., ELEBRING, T., NILSSON, K., DRMOTA, T. & GREASLEY, P.J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, **152**, 1092-101.
- SAKO, Y., MINOGHCHI, S. & YANAGIDA, T. (2000). Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol*, **2**, 168-72.
- SANAI, N., TRAMONTIN, A.D., QUINONES-HINOJOSA, A., BARBARO, N.M., GUPTA, N., KUNWAR, S., LAWTON, M.T., MCDERMOTT, M.W., PARSA, A.T., MANUEL-GARCIA VERDUGO, J., BERGER, M.S. & ALVAREZ-BUYLLA, A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, **427**, 740-4.
- SANCHEZ, C., DE CEBALLOS, M.L., GOMEZ DEL PULGAR, T., RUEDA, D., CORBACHO, C., VELASCO, G., GALVE-ROPERH, I., HUFFMAN, J.W., RAMON Y CAJAL, S. & GUZMAN, M. (2001). Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res*, **61**, 5784-9.
- SANCHO, R., DE LA VEGA, L., MACHO, A., APPENDINO, G., DI MARZO, V. & MUNOZ, E. (2005). Mechanisms of HIV-1 inhibition by the lipid mediator N-arachidonoyldopamine. *J Immunol*, **175**, 3990-9.
- SANTELO, M., MARCHALAND, J., BEZZI, P. & VOLTERRA, A. (2008a). Pre-synaptic NMDA receptor activation by astrocytes requires synchronous glutamate exocytosis controlled by TNF(alpha). *Nat Neurosci*, submitted.

- SANTELO, M. & VOLTERRA, A. (2008b). Synaptic modulation by astrocytes via Ca(2+)-dependent glutamate release. *Neuroscience*.
- SANZGIRI, R.P., ARAQUE, A. & HAYDON, P.G. (1999). Prostaglandin E(2) stimulates glutamate receptor-dependent astrocyte neuromodulation in cultured hippocampal cells. *J Neurobiol*, **41**, 221-9.
- SARNE, Y. & MECHOULAM, R. (2005). Cannabinoids: between neuroprotection and neurotoxicity. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, **4**, 677-84.
- SAWZDARGO, M., NGUYEN, T., LEE, D.K., LYNCH, K.R., CHENG, R., HENG, H.H., GEORGE, S.R. & O'DOWD, B.F. (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **64**, 193-8.
- SCHIPKE, C.G. & KETTENMANN, H. (2004). Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia*, **47**, 226-32.
- SCHREIBER, D., HARLFINGER, S., NOLDEN, B.M., GERTH, C.W., JAEHDE, U., SCHOMIG, E., KLOSTERKOTTER, J., GIUFFRIDA, A., ASTARITA, G., PIOMELLI, D. & MARKUS LEWEKE, F. (2007). Determination of anandamide and other fatty acyl ethanolamides in human serum by electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, **361**, 162-8.
- SHENG, W.S., HU, S., MIN, X., CABRAL, G.A., LOKENSGARD, J.R. & PETERSON, P.K. (2005). Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia*, **49**, 211-9.
- SHI, B., DE GIROLAMI, U., HE, J., WANG, S., LORENZO, A., BUSCIGLIO, J. & GABUZDA, D. (1996). Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system. *J Clin Invest*, **98**, 1979-90.
- SIMARD, M., ARCUINO, G., TAKANO, T., LIU, Q.S. & NEDERGAARD, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci*, **23**, 9254-62.
- SIMON, G.M. & CRAVATT, B.F. (2008). Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J Biol Chem*, **283**, 9341-9.
- STEINHAUSER, C., BERGER, T., FROTSCHER, M. & KETTENMANN, H. (1992). Heterogeneity in the Membrane Current Pattern of Identified Glial Cells in the Hippocampal Slice. *Eur J Neurosci*, **4**, 472-484.
- STELLA, N. (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*, **48**, 267-77.

- STELLA, N., SCHWEITZER, P. & PIOMELLI, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, **388**, 773-8.
- STEYER, J.A. & ALMERS, W. (2001). A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 268-75.
- STEYER, J.A., HORSTMANN, H. & ALMERS, W. (1997). Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature*, **388**, 474-8.
- SUGIURA, T., KISHIMOTO, S., OKA, S. & GOKOH, M. (2006). Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*, **45**, 405-46.
- SUGIURA, T., KOBAYASHI, Y., OKA, S. & WAKU, K. (2002). Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **66**, 173-92.
- SUGIURA, T., KONDO, S., SUKAGAWA, A., NAKANE, S., SHINODA, A., ITOH, K., YAMASHITA, A. & WAKU, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, **215**, 89-97.
- SULLIVAN, J.M. (2000). Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learn Mem*, **7**, 132-9.
- SULSTON, J.E., SCHIERENBERG, E., WHITE, J.G. & THOMSON, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, **100**, 64-119.
- SZALLASI, A., CORTRIGHT, D.N., BLUM, C.A. & EID, S.R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 357-72.
- TAKANO, T., KANG, J., JAISWAL, J.K., SIMON, S.M., LIN, J.H., YU, Y., LI, Y., YANG, J., DIENEL, G., ZIELKE, H.R. & NEDERGAARD, M. (2005). Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 16466-71.
- TAKANO, T., TIAN, G.F., PENG, W., LOU, N., LIBIONKA, W., HAN, X. & NEDERGAARD, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci*, **9**, 260-7.
- TART, C.T. (1970). Marijuana intoxication common experiences. *Nature*, **226**, 701-4.
- TERRAZZINO, S., BERTO, F., DALLE CARBONARE, M., FABRIS, M., GUIOTTO, A., BERNARDINI, D. & LEON, A. (2004). Stearoyl ethanolamide exerts anorexic effects in mice via down-regulation of liver stearoyl-coenzyme A desaturase-1 mRNA expression. *Faseb J*, **18**, 1580-2.

- TIAN, G.F., AZMI, H., TAKANO, T., XU, Q., PENG, W., LIN, J., OBERHEIM, N., LOU, N., WANG, X., ZIELKE, H.R., KANG, J. & NEDERGAARD, M. (2005). An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med*, **11**, 973-81.
- TOGGAS, S.M., MASLIAH, E. & MUCKE, L. (1996). Prevention of HIV-1 gp120-induced neuronal damage in the central nervous system of transgenic mice by the NMDA receptor antagonist memantine. *Brain Res*, **706**, 303-7.
- TOGGAS, S.M., MASLIAH, E., ROCKENSTEIN, E.M., RALL, G.F., ABRAHAM, C.R. & MUCKE, L. (1994). Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature*, **367**, 188-93.
- TRAN, P.B. & MILLER, R.J. (2003). Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 444-55.
- TSACOPOULOS, M. & MAGISTRETTI, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci*, **16**, 877-85.
- TSOU, K., NOGUERON, M.I., MUTHIAN, S., SANUDO-PENA, M.C., HILLARD, C.J., DEUTSCH, D.G. & WALKER, J.M. (1998). Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci Lett*, **254**, 137-40.
- TSUBOI, K., SUN, Y.X., OKAMOTO, Y., ARAKI, N., TONAI, T. & UEDA, N. (2005). Molecular characterization of N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the cholesteryl glycerophosphorylcholine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J Biol Chem*, **280**, 11082-92.
- TSUBOI, T., ZHAO, C., TERAKAWA, S. & RUTTER, G.A. (2000). Simultaneous evanescent wave imaging of insulin vesicle membrane and cargo during a single exocytotic event. *Curr Biol*, **10**, 1307-10.
- TWITCHELL, W., BROWN, S. & MACKIE, K. (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, **78**, 43-50.
- VAN DER STELT, M. & DI MARZO, V. (2005). Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*, **7**, 37-50.
- VAN DER STELT, M., PAOLETTI, A.M., MACCARRONE, M., NIEUWENHUIZEN, W.F., BAGETTA, G., VELDINK, G.A., FINAZZI AGRO, A. & Vliegenthart, J.F. (1997). The effect of hydroxylation of linoleoyl amides on their cannabinomimetic properties. *FEBS Lett*, **415**, 313-6.
- VAN DER STELT, M., VELDHIJIS, W.B., BAR, P.R., VELDINK, G.A., Vliegenthart, J.F. & NICOLAY, K. (2001). Neuroprotection by Delta9-tetrahydrocannabinol, the main

- active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *J Neurosci*, **21**, 6475-9.
- VAN SICKLE, M.D., DUNCAN, M., KINGSLEY, P.J., MOUIHATE, A., URBANI, P., MACKIE, K., STELLA, N., MAKRIYANNIS, A., PIOMELLI, D., DAVISON, J.S., MARNETT, L.J., DI MARZO, V., PITTMAN, Q.J., PATEL, K.D. & SHARKEY, K.A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, **310**, 329-32.
- VARMA, N., CARLSON, G.C., LEDENT, C. & ALGER, B.E. (2001). Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci*, **21**, RC188.
- VESCE, S., BEZZI, P., ROSSI, D., MELDOLESI, J. & VOLTERRA, A. (1997). HIV-1 gp120 glycoprotein affects the astrocyte control of extracellular glutamate by both inhibiting the uptake and stimulating the release of the amino acid. *FEBS Lett*, **411**, 107-9.
- VIRCHOW, R. (1846). Uber das granuliert Ansehen der Waudungen der Gerhirnventrikel. *Allg. Z. Psychiatr*, **3**, 242.
- VIVIANI, B., CORSINI, E., BINAGLIA, M., GALLI, C.L. & MARINOVICH, M. (2001). Reactive oxygen species generated by glia are responsible for neuron death induced by human immunodeficiency virus-glycoprotein 120 in vitro. *Neuroscience*, **107**, 51-8.
- VOLTERRA, A., MAGISTRETTI, P. & HAYDON, P.G. (2002). In *The Tripartite Synapse: Glia in Synaptic Transmission* Oxford Univ. Press, Oxford, UK.
- VOLTERRA, A. & MELDOLESI, J. (2005a). In *neuroglia* eds Kettenmann, H. & Ransom, B.R. pp. 190-201. Oxford Univ. Press, Oxford, UK, .
- VOLTERRA, A. & MELDOLESI, J. (2005b). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 626-40.
- WAHL, L.M., CORCORAN, M.L., PYLE, S.W., ARTHUR, L.O., HAREL-BELLAN, A. & FARRAR, W.L. (1989). Human immunodeficiency virus glycoprotein (gp120) induction of monocyte arachidonic acid metabolites and interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 621-5.
- WALKER, J.M., KREY, J.F., CHU, C.J. & HUANG, S.M. (2002). Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation. *Chem Phys Lipids*, **121**, 159-72.
- WALLRAFF, A., ODERMATT, B., WILLECKE, K. & STEINHAUSER, C. (2004). Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia*, **48**, 36-43.

- WALTER, L., FRANKLIN, A., WITTING, A., MOLLER, T. & STELLA, N. (2002). Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem*, **277**, 20869-76.
- WALTER, L., FRANKLIN, A., WITTING, A., WADE, C., XIE, Y., KUNOS, G., MACKIE, K. & STELLA, N. (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci*, **23**, 1398-405.
- WALTER, L. & STELLA, N. (2004). Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol*, **141**, 775-85.
- WALZ, W. (2000). Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia*, **31**, 95-103.
- WARR, O., TAKAHASHI, M. & ATTWELL, D. (1999). Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *J Physiol*, **514** (Pt 3), 783-93.
- WEI, B.Q., MIKKELSEN, T.S., MCKINNEY, M.K., LANDER, E.S. & CRAVATT, B.F. (2006). A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem*, **281**, 36569-78.
- WILHELM, A., VOLKNANDT, W., LANGER, D., NOLTE, C., KETTENMANN, H. & ZIMMERMANN, H. (2004). Localization of SNARE proteins and secretory organelle proteins in astrocytes in vitro and in situ. *Neurosci Res*, **48**, 249-57.
- WILSON, R.I., KUNOS, G. & NICOLL, R.A. (2001a). Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron*, **31**, 453-62.
- WILSON, R.I. & NICOLL, R.A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, **296**, 678-82.
- WILSON, R.I. & NICOLL, R.A. (2001b). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, **410**, 588-92.
- WINSHIP, I.R., PLAA, N. & MURPHY, T.H. (2007). Rapid astrocyte calcium signals correlate with neuronal activity and onset of the hemodynamic response in vivo. *J Neurosci*, **27**, 6268-72.
- WOODWARD, D.F., LIANG, Y. & KRAUSS, A.H. (2008). Prostanamides (prostaglandin-ethanolamides) and their pharmacology. *Br J Pharmacol*, **153**, 410-9.
- WYSS-CORAY, T., LOIKE, J.D., BRIONNE, T.C., LU, E., ANANKOV, R., YAN, F., SILVERSTEIN, S.C. & HUSEMANN, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*, **9**, 453-7.

- YE, Z.C., WYETH, M.S., BALTAN-TEKKOK, S. & RANSOM, B.R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci*, **23**, 3588-96.
- ZHANG, Q., FUKUDA, M., VAN BOCKSTAELE, E., PASCUAL, O. & HAYDON, P.G. (2004a). Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9441-6.
- ZHANG, Q., PANGRSIC, T., KREFT, M., KRZAN, M., LI, N., SUL, J.Y., HALASSA, M., VAN BOCKSTAELE, E., ZOREC, R. & HAYDON, P.G. (2004b). Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem*, **279**, 12724-33.
- ZHOU, M. & KIMELBERG, H.K. (2001). Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *J Neurosci*, **21**, 7901-8.
- ZIPP, F. & AKTAS, O. (2006). The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, **29**, 518-27.
- ZYGMUNT, P.M., PETERSSON, J., ANDERSSON, D.A., CHUANG, H., SORGARD, M., DI MARZO, V., JULIUS, D. & HOGESTATT, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, **400**, 452-7.

7. PRODUZIONE SCIENTIFICA

Pubblicazioni

BARI, M., ODDI, S., DE SIMONE, C., **SPAGNUOLO, P.**, GASPERI, V., BATTISTA, N., CENTONZE, D. & MACCARRONE, M. (2008) Type-1 cannabinoid receptors colocalize with caveolin-1 in neuronal cells. *Neuropharmacology*, **54**, 45-50.

AMANTEA, D., **SPAGNUOLO, P.**, BARI, M., FEZZA, F., MAZZEI, C., TASSORELLI, C., MORRONE, L.A., CORASANITI, M.T., MACCARRONE, M. & BAGETTA, G. (2007) Modulation of the endocannabinoid system by focal brain ischemia in the rat is involved in neuroprotection afforded by 17beta-estradiol. *FEBS J.*, **274**, 4464-4775.

ODDI, S., **SPAGNUOLO, P.**, BARI, M., D'AGOSTINO, A. & MACCARRONE, M. (2007) Differential modulation of type 1 and type 2 cannabinoid receptors along the neuroimmune axis. *International Review of Neurobiology*, **82**, 327-337.

BARI, M., **SPAGNUOLO, P.**, FEZZA, F., ODDI, S., PASQUARIELLO, N., FINAZZI-AGRO, A. & MACCARRONE, M. (2006) Effect of lipid rafts on Cb2 receptor signaling and 2-arachidonoyl-glycerol metabolism in human immune cells. *J Immunol.*, **177**, 4971-4980.

GASPERI, V., FEZZA, F., **SPAGNUOLO, P.**, PASQUARIELLO, N. & MACCARRONE, M. (2005) Further Insights into the Regulation of Human FAAH by Progesterone and Leptin Implications for Endogenous Levels of Anandamide and Apoptosis of Immune and Neuronal Cells. *Neurotoxicology*, **26**, 811-817.

Comunicazioni a congresso

Spagnuolo P. "Endocannabinoids modulate CXCR4-evoked TNF-alpha release and glutamate exocytosis from astrocytes". Atti del convegno "XII Seminario nazionale per dottorandi in farmacologia e scienze affini", Certosa di Pontignano (Siena), 22-25 Settembre, 2008, A cura di Sgaragli G., Frosini M., Fusi F., 2008.

Spagnuolo P., Cali C., Marchaland J., Bari M., Maccarrone M., Bezzi P., Bagetta G. "(Endo)cannabinoids regulate TNF-alpha and glutamate release from astrocytes". Atti del convegno "XI Workshop On Apoptosis in Biology and Medicine", Educational Building, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japan, September 12th-14th, 2008.

Maccarrone M., Amantea D., **Spagnuolo P.**, Bari M., Fezza F., Tassorelli C., Corasaniti M., Bagetta G. "Modulation of the endocannabinoid system is involved in estrogen-mediated neuroprotection against focal brain ischemia". Atti del convegno "16 th annual symposium on the cannabinoids ICRS", Tihany, Hungary, 24-28 June 2006, p. 213.

Oddi S., Bari M., Fezza F., Gasperi V., **Spagnuolo P.**, Pasquariello N., Finazzi-Agro' A., Maccarrone M. " Lipid rafts, CB2 receptors signaling and metabolism of 2-arachidonoyl-glycerol in human immune cells". Atti del convegno "16 th annual symposium on the cannabinoids ICRS", Tihany, Hungary, 24-28 June 2006, p. 7.

Amantea D., Mazzei C., **Spagnuolo P.**, Bari M., Bagetta G., Corasaniti M.T., Maccarrone M. "Modulation of the endocannabinoid system is implicated in the neuroprotection afforded by 17beta-estradiol (E2) against brain damage caused by transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) in rat". Atti del convegno "5th Forum of European Neuroscience", Vienna, Austria, 8-12 July 2006, Vol. 3, p. A237.1

Spagnuolo P., Oddi S., Bari M., D'Agostino A., Finazzi-agro' A., Maccarrone M. "Differential modulation of CB1 and CB2 receptor along the neuroimmune axis". Contributo a IX workshop on apoptosis in biology and medicine: neuroinflammation in neuronal death and repair, Parghelia (VV), 13-16 september 2006.

Mazzei C., Amantea D., **Spagnuolo P.**, Bari M., Bagetta G., Corasaniti M.T., Maccarrone M. "Modulation of the endocannabinoid system is implicated in the neuroprotection afforded by 17beta-estradiol (E2) against brain damage caused by transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) in rat". Contributo a IX workshop on apoptosis in biology and medicine: neuroinflammation in neuronal death and repair, Parghelia (VV), 13-16 september 2006.

Maccarrone M., Battista N., **Spagnuolo P.**, Pasquariello N., Bari M. "Control of neuronal CB1 receptors by lipid rafts, and modulation of anandamide-induced apoptosis". Atti del convegno "XV Symposium of the International Cannabinoid Research Society", Clearwater, Florida, 24-27 Giugno 2005, p. 112.

Spagnuolo P., Bari M., D'Agostino A., Finazzi-agro' A., Maccarrone M. " Lipid rafts control neuronal cannabinoid receptors, thus impacting cell death". Contributo a VIII workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, Parghelia (VV), 25-26 Maggio 2005.

Fezza F., **Spagnuolo P.**, Mazzei C., Maccarrone M. " Radiochromatographic assay of N-Acyl-phosphatidyl ethanolamine-specific phospholipase D (NAPE-PLD) activity". Atti del convegno "Second European workshop on cannabinoid research", Busto Arsizio (Va), 28-29 Aprile 2005, p. 46, P-4.

Amantea D., Mazzei C., Bari M., **Spagnuolo P.**, Pasquariello N., Corasaniti M.T., Bagetta G., Maccarrone M. "Neuroprotection afforded by 17beta-estradiol in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion implicates modulation of fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity". Atti del convegno "British Pharmacological Society Winter Meeting", London (UK), 20-22 December, 2005, 2005, Vol. 3(4), 164P.

Navarra M., Maiuolo J., **Spagnuolo P.**, Rotiroti D., Corasaniti M.T. "The essential oil of bergamot protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from NMDA-induced cytotoxicity". Atti del convegno "First International Porto Pirog conference on advances in neuroscience", Parghelia (VV), 22-25 Settembre 2004, P10.

Morrone L. A., Rombola' L., Nistico' R. G., Cipolla G., **Spagnuolo P.**, Bagetta G." Effect of bergamot essential oil on aspartate and glycine levels in the hippocampus of rats". Atti del convegno "XIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia", Urbino, 22-25 Gennaio 2003, p.151.