

Università degli Studi della Calabria

Facoltà di Scienze M.F.N.

**Dottorato di Ricerca in Biologia Animale
XXIII Ciclo**

**In
NEUROANATOMIA COMPARATA**

SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE: BIO/06

**Ruolo del cross-talking GABA-glutammato nello
sviluppo morfo-funzionale dei neuroni ippocampali di
*Mesocricetus auratus***

Dr.ssa Anna Di Vito

RELATORE

Prof. Marcello Canonaco

COORDINATORE

Prof.ssa Maria Carmela Cerra

Anno Accademico 2009-2010

*Alla mia
dolce Giusy*

Indice

Abstract	5
Riassunto.....	7
Introduzione	9
<u>STATO DELL'ARTE</u>	13
<u>Capitolo primo: IPPOCAMPO</u>	
Caratteristiche anatomiche e funzionali	14
I.1 Telencefalo.....	15
I.2 Sistema limbico	15
I.3 L'Ippocampo	16
I.3.1 La citoarchitettura della formazione ippocampale.....	19
Cellule granulari.....	21
Cellule piramidali e interneuroni in CA1 e CA3.....	23
I.4 Connessioni intra- ed extra-ippocampali.....	27
Connessioni intraparaippocampali	28
Proiezioni del paraippocampo verso l'ippocampo.....	30
Connessioni intraippocampali.....	31
I.5 Ontogenesi dell'ippocampo.....	33
Origine degli interneuroni ippocampali.....	35
Origine delle diverse classi di interneuroni.....	35
Modalità di migrazione neuronale.....	36
I.6 Neurogenesi nell'HIP adulto dei Mammiferi.....	37
I.7 Maturazione morfo-funzionale dei neuroni ippocampali	39
I.8 Funzioni ippocampali: apprendimento e memoria.....	41
I.8.1 Definizione di memoria.....	42
I.8.2 Il ruolo dell'HIP nella formazione della memoria.....	45
I.8.3 La memoria neuronale.....	46
<u>Capitolo secondo: I sistemi di neurotrasmissione ippocampali</u>	
I sistemi GABAergico e Gluergico.....	48
II.1 Sintesi, metabolismo e secrezione del GABA.....	48

Distribuzione dei neuroni GABAergici a livello dell'ippocampo	49
II.2 Caratteristiche molecolari e funzionali dei recettori GABAergici	51
II.2.1 GABA_BRs	52
II.2.2 GABA_ARs	53
Organizzazione dei geni per le subunità del GABA _A R.....	55
Pattern di distribuzione delle subunità GABA _A ergiche nell'encefalo adulto.....	56
Distribuzione dei sottotipi recettoriali GABA _A ergici nell'ippocampo.....	57
Maturazione funzionale dei GABA _A Rs.....	59
Alterazioni strutturali e farmacologiche dei GABA _A Rs durante lo sviluppo.....	62
II.3 Le benzodiazepine	63
II.3.1 Caratteristiche generali delle benzodiazepine	64
Farmacologia.....	65
II.3.2 Le benzodiazepine nell'ippocampo	68
II.4 Il sistema Gluergico: ruolo nello sviluppo neuronale	70
II.4.1 Recettori ionotropici del Glu: NMDAR	70
Struttura degli NMDARs.....	70
Meccanismi di azione degli NMDARs.....	72
II.4.2 Recettori ionotropici del Glu: AMPAR e KAR	73
L'espressione degli AMPARs.....	74
Struttura dell'AMPAR.....	75
Regolazione dell'AMPAR.....	76
II.4.3 mGluRs	77
Regolazione degli mGluRs di gruppo I.....	78
II.4.4 Ruolo dei recettori del Glu nella neurogenesi	80
II.5 Citotossicità del Glu	81
II.6 Altri fattori coinvolti nel differenziamento neuronale	83
Marcatori strutturali dello sviluppo neuronale.....	86

<u>MATERIALI E METODI</u>	90
III.1 Modello sperimentale	91
Caratteristiche biologiche di <i>Mesocricetus auratus</i>	90
III.2 Colture cellulari ippocampali	91
Animali.....	94
Dissezione dell'ippocampo.....	94
Protocollo di isolamento e messa in coltura di cellule ippocampali.....	94
III.3 Caratteristiche morfologiche dei neuroni su due sistemi di coltura (in collaborazione con l'ITM-CNR)	95
Supporti a membrana.....	96
Caratterizzazione delle membrane FC (ITM-CNR)	97
III.3.1 Saggi metabolici	97
Consumo di glucosio.....	97
Produzione di lattato.....	98
Dosaggio del BDNF.....	98
III.3.2 Analisi strutturale delle colture cellulari ippocampali	98
Doppia immunofluorescenza.....	100
III.4 Caratterizzazione molecolare	102
Estrazione dell'RNA totale.....	103
Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto.....	104
Trascrizione inversa.....	104
La reazione a catena della DNA polimerasi.....	105
Purificazione del prodotto di PCR.....	109
III.5 Studio d'espressione: Real-Time PCR	109
III.6 Trattamenti farmacologici <i>in vitro</i>	114
III.7 Ibridazione <i>in situ</i> non radioattiva	117
III.8 Analisi statistica	119
<u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	120
<u>Risultati: parte molecolare</u>	
IV.1 Identificazione molecolare di GABAα₂ in <i>Mesocricetus auratus</i>	121

IV.2 Identificazione molecolare di GABA α_4 in <i>Mesocricetus auratus</i>	124
IV.3 Identificazione molecolare di GABA α_5 in <i>Mesocricetus auratus</i> ...	127
IV.4 Identificazione molecolare di Syn in <i>Mesocricetus auratus</i>	130
IV.5 Identificazione molecolare di MAP2 in <i>Mesocricetus auratus</i>	134
IV.6 Identificazione molecolare di β -actina in <i>Mesocricetus auratus</i>	137
<u>Risultati: parte morfo-funzionale</u>	
Ottimizzazione del sistema di coltura bioartificiale per neuroni ippocampali	141
V.1 Differenziamento dei neuroni ippocampali di <i>Mesocricetus auratus in vitro</i>	141
V.2 Caratteristiche morfo-funzionali dei neuroni ippocampali su due sistemi di coltura.....	144
Ruolo della trasmissione GABAergica sulla maturazione morfo-funzionale dei neuroni ippocampali nella prima settimana di sviluppo <i>in vitro</i>	148
V.3 Alterazione della morfologia neuronale.....	148
V.4 Ruolo della trasmissione GABA Δ ergica sull'espressione dei recettori Gluergici.....	152
Ruolo delle subunità GABAergiche $\alpha_{2,5}$ sulla maturazione morfo-funzionale dei neuroni ippocampali nella prima settimana di sviluppo <i>in vitro</i>	155
V.5 Variazioni dell'attività metabolica neuronale.....	155
V.6 Alterazione della morfologia neuronale.....	156
V.7 Effetti delle subunità GABAergiche $\alpha_{2,5}$ sull'espressione dei recettori Gluergici.....	160
Discussione.....	161
Conclusioni.....	162
Bibliografia.....	168

ABSTRACT

The hippocampus (HIP) is recognized as a major telencephalic area processing learning and episodic memory events through the accumulation of neuronal signals deriving from the different subregions. In particular, hippocampal neurons have received particular attention due to some of their functional properties being regulated by GABAergic and Glutamate- (Glu)-ergic neuronal signals during both postnatal and adult stages. For the present study, growth of hamster hippocampal neurons on biohybrid membrane substrates allowed us to show for the first time that the two major GABA_A α receptor subunits ($\alpha_{2,5}$) promote early neuronal shaping plus expression differences of the main neuronal cytoskeletal factors (GAP-43, MAP2, Syn, the neurotrophin BDNF) along with Gluergic subtypes. In a first case, the selective GABA_AR agonist diazepam (DZP; $\alpha_{2,5}$) caused very great ($p < 0.001$) increases of dendritic sprouting and branching processes mainly at DIV3, while its effects continued to account even for great ($p < 0.01$) axonal length during the entire culture period. In addition, DZP also accounted for great ($p < 0.01$) up-regulation of neuritic NR1, GluR2 and MAP2 while it moderately ($p < 0.05$) increased synaptophysin (Syn) at DIV7. Such effects were abolished by its highly selective antagonist flumazenil. The application of the inverse α_5 agonist (RY-080) tended to strongly suggest its specific role on the dendritic component via the inhibition of BDNF, as shown by a reduction of dendritic length at DIV7 concomitantly to very low levels of the neurotrophin. Conversely, the effects of the preferentially specific agonist for hippocampal α_2 subunit (flunitrazepam) were, instead, directed at the formation of growth cones at DIV3 in the presence of greatly ($p < 0.01$) diminished GAP-43 levels as displayed by strongly reduced axonal sprouting. It is interesting to note that contextually to these morphological variations, the transcription of some Gluergic receptor subtypes resulted to be altered. Indeed, the α_2 agonist was responsible for a distinctly rising expression pattern of axonal NR1 mRNA levels from DIV3 ($p < 0.01$) until DIV7 ($p < 0.001$), along with a very great up-regulation of Syn at DIV7. In the case of RY-080, it evoked a very great ($p < 0.001$) downregulation of dendritic GluR2 at only DIV7. Together, our results demonstrate that GABA_A $\alpha_{2,5}$ receptor-containing subunits are considered key modulating neuronal elements of HIP morphological features by regulating the precise synchronization of cytoskeletal factors. Moreover, the notable NR1 and GluR2 transcription differences promoted by these GABA_A α subunits tend to favorably corroborate the early role of $\alpha_2 + \alpha_5$ on HIP neuronal networks in hibernating rodents through the recruitment and activation of silent neurons. We are still at the beginning but further studies are required to establish the nature of molecular signals controlling responses of the different hippocampal subregions, which may have therapeutic bearings for neurological disorders.

RIASSUNTO

L'ippocampo (HIP) è ampiamente riconosciuto come principale area telencefalica preposta al controllo dell'apprendimento e di eventi mnemonici attraverso l'accumulo di segnali neuronali inviati da distinte regioni ippocampali. In particolare, I neuroni ippocampali hanno ricevuto notevole attenzione recentemente grazie ad alcune proprietà funzionali regolate dalla trasmissione GABAergica e Gluergica sia nel periodo postnatale che nell'adulto. In questo studio, l'impiego di neuroni ippocampali di criceto cresciuti su supporti bioibridi a membrana ha permesso di dimostrare, per la prima volta, che le maggiori subunità α del GABA_AR ($\alpha_{2,5}$) promuovono il differenziamento precoce della morfologia neuronale oltre a regolare l'espressione di importanti fattori citoscheletrici (GAP-43, MAP2, Syn, la neurotrofina BDNF) insieme a specifici sottotipi Gluergici. In un primo caso, l'applicazione dell'agonista selettivo diazepam (DZP; $\alpha_{2,5}$) determina un incremento molto elevato ($p < 0.001$) dei processi di sprouting e branching dendritico principalmente a DIV3, mentre i suoi effetti continuano a determinare una maggiore ($p < 0.01$) lunghezza assonica per l'intero periodo di coltura. In aggiunta, il DZP determina una forte up-regulation del livello degli mRNAs neuritici per NR1, GluR2 e MAP2 mentre esso aumenta solo in modo moderato ($p < 0.05$) il livello della sinaptofisina (Syn) a DIV7. Tali effetti sono completamente aboliti dall'antagonista benzodiazepinico flumazenil. Gli effetti indotti dall'applicazione dell'agonista inverso per la subunità α_5 (RY-080) tende a sottolineare la specificità di tale subunità sulla determinazione della componente dendritica attraverso la riduzione dei livelli di BDNF, in accordo con la ridotta lunghezza dendritica a DIV7 parallela ai livelli molto bassi di tale neurotrofina. Al contrario, l'azione dell'agonista preferenziale per la subunità α_2 (flunitrazepam) è, invece, diretta alla formazione del cono di crescita a DIV3 in presenza di una forte riduzione ($p < 0.01$) dei livelli di GAP43 oltre che del processo di sprouting dendritico. E' interessante notare che contemporaneamente alle alterazioni morfologiche ora descritte, anche la trascrizione di alcune subunità Gluergiche risulta alterata. Infatti, l'agonista di α_2 è responsabile di distinti incrementi dei livelli di mRNA della subunità NR1 da DIV3 ($p < 0.01$) a DIV7 ($p < 0.001$), oltre che di un'up-regulation molto forte della Syn a DIV7. Nel caso di RY-080, esso è responsabile di una down-regulation molto forte ($p < 0.001$) dei livelli di GluR2 solo a DIV7. Considerati nell'insieme, i nostri risultati dimostrano che i recettori GABA_A contenenti le subunità $\alpha_{2,5}$ rivestono un ruolo chiave nella determinazione morfologica delle componenti neuronali attraverso la regolazione sincronizzata di importanti fattori citoscheletrici. Inoltre, le evidenti alterazioni nella trascrizione di NR1 e GluR2 promosse da tali subunità GABAergiche porta a considerare un ruolo precoce per $\alpha_2 + \alpha_5$ sui network neuronali ippocampali nei roditori ibernanti attraverso il reclutamento di sinapsi silenti. Siamo ancora all'inizio ma ulteriori studi ci consentiranno di determinare la natura dei processi molecolari che controllano le risposte delle diverse are ippocampali con importanti applicazioni terapeutiche verso patologie neurologiche.

Introduzione

Numerosi studi hanno focalizzato l'attenzione sull'organizzazione funzionale dei diversi campi neuronali, supportando in particolare evidenze sperimentali relative all'importanza dell'equilibrio inibitorio/eccitatorio in distinte aree telencefaliche, quali l'ippocampo (HIP). Un primo e fondamentale sistema neuronale implicato in tale equilibrio è il complesso recettoriale GABAergico di tipo A ($GABA_A$ R), appartenente alla superfamiglia dei complessi proteici accoppiati a canali ionici e riconosciuto come il maggior sistema di neurotrasmissione nel sistema nervoso dei Mammiferi. Tra le 20 subunità del $GABA_A$ R coinvolte nella formazione della struttura pentamerica (Sernagor et al., 2010), le subunità α rappresentano il principale componente responsabile dell'attività interneuronale inibitoria, oltre che del corretto assemblaggio recettoriale e di distinte proprietà farmacologiche (Sieghart, 1995). La trasmissione GABAergica neocorticale precoce esercita un preciso ruolo nella regolazione della proliferazione, migrazione e differenziamento cellulare, agendo da primo potenziale organizzatore neuronale rispetto all'influenza eccitatoria di altri sistemi quale il sistema Gluergico. Di conseguenza, i neuroni di nuova formazione sono in grado di ricevere input GABAergici dagli interneuroni ancor prima che si formino le sinapsi Gluergiche (Brooks-Kayal et al., 1998; Hennou et al., 2002), una tendenza ulteriormente confermata dalla comparsa di sinapsi GABAergiche già a partire dai primissimi giorni di sviluppo neuronale in alcune aree telencefaliche e corticali (Swanwick et al., 2006).

Una delle regioni telencefaliche che maggiormente presenta proprietà di plasticità sinaptica è l'ippocampo (HIP), un'area che esibisce un'organizzazione anatomica molto complessa, oltre ad essere attivamente implicata in svariate funzioni neuro-comportamentali, omeostatiche e mnemoniche (Benfenati, 2007). Il Corno di Ammone che esso comprende, in particolare, è distinto in quattro subregioni tra le quali, CA1 e CA3 differiscono sia per l'organizzazione dei circuiti neuronali interni ed esterni che le caratterizzano che per la diversa citoarchitettura laminare (Li et al., 2009). In aggiunta, è ormai noto il coinvolgimento di CA3 nella determinazione della memoria a breve termine, in accordo con la più antica origine filogenetica, e il ruolo di CA1 nella stabilizzazione di connessioni con aree corticali superiori per la modulazione di funzioni complesse e di più recente acquisizione (Daumas et al., 2005). A ciò va associata una diversa vulnerabilità ad agenti stressori di varia natura, come dimostrato dalla presenza di neuroni piramidali in CA1 molto più suscettibili ad eventi di

eccitotossicità (Olsson et al., 2003) o insulti ischemici (Jackson e Foster, 2009) rispetto a CA3. Nell'HIP è possibile riconoscere molteplici tipologie neuronali, tra le quali le più importanti sono i neuroni piramidali, cellule dalla forma ben definita e dotati di una ricca arborizzazione dendritica (Hur and Kim, 2007). I neuroni ippocampali mostrano la capacità di crescere *in vitro* anche per lunghi periodi di coltura (Molder et al., 2007), permettendo in tal modo non solo l'osservazione dei complessi processi di estensione dei prolungamenti e di formazione dei contatti sinaptici, ma anche l'analisi di specifiche compartimentazioni recettoriali durante lo sviluppo (Fukata et al., 2002). Accanto a tali evidenze, recenti studi supportano il ruolo chiave svolto dalla formazione ippocampale nel ciclo di ibernazione, in quanto tale regione è una delle prime a riattivare i meccanismi di neurotrasmissione nella fase di risveglio (Magariños et al., 2006), caratterizzata da eventi simil-ischemici (Osborne e Hashimoto, 2003; Canonaco et al., 2005). In tale contesto, la scelta del criceto ibernante quale modello sperimentale per il presente studio assume un'importanza rilevante legata alla capacità di tale roditore ad entrare in un vero e proprio ciclo di ibernazione, che si traduce in uno specifico stato fisiologico di adattamento associato ad un elevato grado di plasticità sinaptica (Arendt, 2004).

Sebbene lo studio della crescita delle popolazioni neuronali attraverso i metodi tradizionali abbia consentito la comprensione di numerose proprietà sinaptiche, tali metodi presentano dei limiti associati alla capacità di mimare un substrato fisiologico. Recentemente, innovativi sistemi a biomembrana vengono sempre più frequentemente proposti come substrato preferenziale nell'ambito dell'ingegneria tissutale neuronale, considerate le loro proprietà di biostabilità, selettiva permeabilità (Drioli e De Bartolo, 2006) e protezione (De Bartolo et al., 2007). Sulla base di tali considerazioni, lo scopo del presente lavoro di dottorato è stato quello di stabilire il ruolo delle subunità α del complesso GABA_AR nel differenziamento dei neuroni ippocampali attraverso l'instaurarsi di specifici meccanismi di cross-talking con il sistema Gluergico. Per tale scopo, la trasmissione GABAergica è stata inizialmente modulata mediante applicazione della benzodiazepina 7-chloro-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one (Diazepam, DZP) e dell'antagonista imidabenzodiazepinico ethyl 12-fluoro- 8-methyl- 9-oxo- 2,4,8- triazatricyclo [8.4.0.0^{2,6}] tetradeca- 1(10),3,5,11,13-pentaene- 5-carboxylate (Ro 15-1788, Flumazenil, FLM). L'applicazione di DZP e FLM è correlata all'elevata specificità del primo agonista verso i complessi recettoriali GABAergici contenenti $\alpha_{1/2/3/5}\beta_{2/3}\gamma_2$ (Ali and Thomson, 2007), e di conseguenza, nel

nostro sistema, di GABA_ARs contenenti α_2 ed α_5 , mentre l'antagonista è stato impiegato in combinazione con il DZP grazie alla sua capacità di bloccare gli effetti della benzodiazepina attraverso l'inibizione competitiva del sito benzodiazepinico sui recettori GABA_Aergici (Poleszak, 2008). Numerose evidenze sperimentali supportano, infatti, il ruolo chiave svolto da queste due subunità non solo nelle primissime fasi di sviluppo (Brooks-Kayal et al., 1998; Swanwick et al., 2006), ma anche in numerose funzioni associative mnemoniche e nella regolazione e determinazione degli elementi neuronali dell'HIP (Möhler, 2007). Il ruolo distinto di α_2 ed α_5 nelle diverse fasi dello sviluppo dei neuroni ippocampali *in vitro* è stato caratterizzato grazie all'utilizzo di agonisti selettivi per ciascuna subunità, ricorrendo alla somministrazione della benzodiazepina Flunitrazepam (Flu, α_2) e dell'agonista inverso ethyl-8-ethynyl-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5- α] [1,4] benzodiazepine-3-carboxylate (RY-080, α_5). Nel caso di Flu, la sua scelta è stata determinata sulla base delle proprietà dei neuroni ippocampali immaturi che mostrano complessi recettoriali GABAergici formati principalmente da $\alpha_2, \beta_{2,3} \gamma_2$, mentre combinazioni con le subunità α_1 ed α_3 sono, rispettivamente, non ancora attive a causa dello stadio di maturazione precoce o non caratteristiche dell'area telencefalica presa in considerazione (Sieghart, 1995; Olsen e Sieghart, 2009). Al contrario, RY-080 è stato scelto a causa della sua specificità verso i complessi recettoriali $\alpha_5, \beta_{2,3} \gamma_2$ (Skolnick et al., 1997). Le proprietà morfo-funzionali relative allo sprouting assonico ed all'arborizzazione dendritica sono state valutate in presenza di tali agenti farmacologici, utilizzando alcuni markers strutturali neuronali, quali la proteina associata alla crescita dell'assone di 43 kDa (GAP-43) e la β -tubulina. Tali fattori citoscheletrici sono comunemente impiegati come indicatori per la caratterizzazione precoce dell'integrità delle proiezioni neuronali (Chakravarthy et al., 2008). La comprensione dell'attività GABAergica sia sull'arborizzazione dendritica che sul processo di sinaptogenesi si è avvalsa anche della valutazione quantitativa del pattern di espressione di MAP2 e della sinaptofisina, marcatori dendritico e sinaptico rispettivamente (Li et al., 2009; Soltani et al., 2005).

Recentemente, l'applicazione di alcuni protocolli sperimentali volti alla modifica del gradiente degli ioni Cl⁻ nei neuroni immaturi, ha portato alla considerazione della depolarizzazione GABA-mediata come principale elemento sinaptico preposto alla regolazione sia degli elementi cellulari granulari generati nell'HIP adulto che nella formazione delle sinapsi Gluergiche corticali (Ge et al., 2007). In aggiunta, gli effetti della trasmissione GABAergica, mediata da combinazioni recettoriali specifiche, sulla

morfologia neuronale sono stati anche associati alla secrezione del fattore neurotrofico derivato dall'encefalo (BDNF), un fattore preposto alla regolazione della neurotrasmissione GABAergica e Gluergica durante lo sviluppo e coinvolto nella corretta inserzione sulla membrana plasmatica del recettore per l'acido propionico α -amine-3 hydroxy-5 methyl-4 isoxiazode (AMPA; Kolarow et al., 2007). Il coinvolgimento dei sistemi recettoriali Gluergici nella regolazione dello sviluppo, plasticità sinaptica ed eventi di eccitotossicità (Liu et al., 2007), hanno rafforzato la necessità di correlare le alterazioni morfologiche dipendenti dalle subunità α ai livelli di espressione delle subunità maggiori dei complessi AMPARs e del recettore per l'N-methyl.D-aspartate (NMDAR). Per tale scopo, nella seconda parte di tale lavoro di dottorato, è stato valutato l'effetto derivante dall'attivazione di specifiche sinapsi GABAergiche sulla comparsa di precisi input Gluergici, analizzando i livelli di espressione di NR1 (NMDAR) e GluR2 (AMPA). Accanto alla determinazione del ruolo delle subunità GABAergiche α_2 ed α_5 nella definizione della morfologia neuronale, la valutazione dei livelli di espressione di tali subunità Gluergiche durante lo sviluppo ippocampale del criceto fornisce importanti dettagli funzionali sulla localizzazione di specifici clusters recettoriali a livello assonico o dendritico. La comprensione del processo di maturazione degli elementi neuronali potrebbe aprire nuovi orizzonti riguardo la precisa attivazione temporale di sinapsi silenti responsabile dell'induzione di meccanismi di switching eccitatorio/inibitorio durante lo sviluppo neuronale ippocampale dei roditori ibernanti, oltre a fornire targets molecolari utili per applicazioni terapeutiche nell'ambito dei disordini neurodegenerativi.

STATO DELL'ARTE

IPPOCAMPO

Caratteristiche anatomiche e funzionali

L'amigdala (AMY), l'ippocampo (HIP), l'area del setto e le varie regioni della corteccia encefalica che costituiscono il sistema limbico svolgono un ruolo centrale nella regolazione delle manifestazioni emotive. La stimolazione di determinati gruppi di cellule, in tale sistema, può suscitare rabbia, gioia ed eccitazione sessuale. Le strutture limbiche operano insieme per influenzare il sistema endocrino e il sistema nervoso autonomo, punti nodali specifici per quasi tutti i sistemi di rilascio di neurotrasmettitori; questi ultimi sono a loro volta preposti alla trasmissione di segnali da un neurone all'altro. Da un punto di vista anatomico e funzionale, il sistema limbico è un circuito costituito da un insieme di centri corticali e subcorticali fra loro interconnessi da proiezioni di fibre che trasportano specifici neurotrasmettitori. Nella maggioranza dei Vertebrati, il principale costituente telencefalico del sistema limbico è il pallio mediale che contiene la formazione ippocampale, cioè giro dentato (DG) e l'HIP, mentre i componenti aggiuntivi telencefalici sono i nuclei del setto e dell'AMY. L'AMY o complesso amigdaloido, in particolare, è costituito da due gruppi di nuclei: la divisione corticale o corticomediale, che è una continuazione ventrale del pallio laterale (paleopallio), e la divisione basale o basolaterale che è di origine subpalliale. La caratterizzazione funzionale dell'AMY ha, invece, portato alla definizione di un'AMY estesa che include i nuclei centrale e mediale della divisione corticale (AMY centromediale) e molte strutture della parte basale del telencefalo, accomunate da connessioni e caratteristiche istochimiche simili. Altre strutture esterne al telencefalo, situate nel diencefalo, vengono considerate componenti del sistema limbico ed includono parti dell'epitalamo, del talamo dorsale (sensitivo) e dell'ipotalamo. I nuclei del setto e dell'AMY ricevono input diretti dal bulbo olfattivo, mentre nei Mammiferi questi input non raggiungono più la formazione dell'HIP che assume invece un ruolo essenziale per la memoria a breve termine. L'AMY è anche interconnessa con lo striato, con l'ipotalamo e con ampie aree della neocorteccia (isocorteccia), in particolare con la corteccia prefrontale (Butler e Hodos, 1996). L'HIP è, infine, considerato componente chiave dell'encefalo, in quanto implicato sia in attività cognitive, quali apprendimento e memoria, che nella manifestazione di stati emozionali, quali l'ansia, la depressione e il condizionamento alla paura (Barkus et al., 2010).

I.1 Telencefalo

Il telencefalo rappresenta la vescicola anteriore dell'encefalo e nei Mammiferi è costituita principalmente dagli emisferi cerebrali che, nella loro estensione, nascondono ed inglobano una grande varietà di strutture encefaliche. Alla base degli emisferi si sviluppa una struttura di sostanza grigia, il corpo striato, mentre nella parte anteriore spicca una struttura rudimentale nell'uomo, il lobo olfattivo. Il resto della parete emisferica va a costituire il mantello o pallio; la porzione ventrale del telencefalo, detta anche basale o gangliare, forma, invece, i nuclei della base o nuclei del telencefalo. Questi comprendono il claustrum, l'AMY e il corpo striato, il quale risulta diviso in due ulteriori porzioni. Lateralmente vi è il nucleo lenticolare, una formazione piramidale che può essere ulteriormente suddivisa in una parte laterale, il *putamen*, e una mediale detta nucleo pallido, mentre medialmente vi è il nucleo caudato, suddiviso in una testa, un corpo ed una coda. I nuclei della base insieme ad altre formazioni agiscono prevalentemente sulle funzioni motorie.

I.2 Sistema limbico

Sotto la denominazione di sistema limbico si riuniscono alcune formazioni degli emisferi cerebrali e del diencefalo deputate a svolgere particolari funzioni, quali emozioni e risposte viscerali ad esse connesse, nonché attività associate alla memoria. Al sistema limbico appartengono: il lobo limbico (insieme di aree corticali), l'HIP o formazione ippocampale (HF), parte del nucleo amigdaloideo, l'ipotalamo (corpi mammillari) ed il nucleo anteriore del talamo. E' ampiamente riconosciuto che il sistema limbico contribuisce all'espressione delle attività emozionali alla base della conservazione dell'individuo e della specie: paura, rabbia, emozioni associate all'attività sessuale quali corteggiamento, accoppiamento e cura della prole, nonché alla manifestazione delle emozioni (Cardinal et al., 2002). Il sistema limbico svolge, inoltre, un ruolo fondamentale nei processi di memorizzazione. Le aree del sistema limbico maggiormente coinvolte nella percezione delle sensazioni sono:

Zona fronto-temporale, rappresentata dall'uncino dell'HIP e dal DG; è implicata nel controllo della nutrizione e nelle reazioni di attacco e di difesa;

Zona parieto-occipitale mediale, rappresentata dal giro ippocampale; è implicata nel controllo dell'attività sessuale;

Zona occipito-temporale mediale, rappresentata dalla parte posteriore della corteccia del cingolo; è implicata nella regolazione della vita affettiva;

Zona fronto-temporale mediale o zona sopracallosa o corteccia del cingolo, rappresentata dalla parte anteriore e intermedia della corteccia del cingolo; è implicata nella preservazione dell'individuo e della specie.

I.3 L'ippocampo

L'HIP è un'insieme di formazioni che si svolgono attorno all'ilo dell'emisfero cerebrale in profondità e concentricamente con il sistema limbico. Più di 400 anni fa, nel 1587, l'anatomista italiano Arantius fu il primo a usare il termine 'ippocampo' in riferimento al DG umano (Walther, 2002). Nel 1732, Winslow descrisse l'HIP come simile alle corna di un ariete e nel 1742 de Garengeot coniò il termine "*Cornu Ammonis*" (corno di Ammone; Ahmed e Metha, 2009). L'acronimo di questa frase latina (CA) è la radice del nome assegnato ai sottocampi ippocampali da Lorente de No nel 1934 (Lorente de No, 1934). La superficie laterale della HF è ricoperta quasi completamente da una tela coroidea e dal plesso coroide del corno temporale; in seguito alla sua rimozione, la superficie ventricolare della HF somiglia ad una cometa con una lunga coda ricurva (fig. I.1).

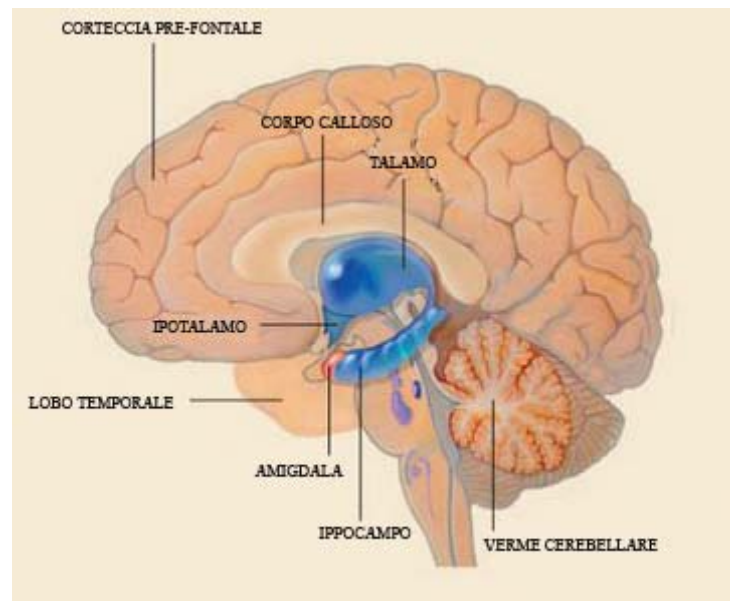


Fig. I.1. HF vista in seguito all'asportazione del plesso coroide.

La testa della cometa rappresenta il *bulbous pes hippocampi* nella parte terminale anteriore del corno temporale, mentre la porzione mediale si assottiglia progressivamente verso la parete mediale inferiore del corno temporale. La coda

terminale rappresenta la fimbria (Fi) e il corpo del fornice (F), che curvano intorno al talamo per formare la parete inferiore mediale dell'*atrium* e il corpo del ventricolo laterale. Al contrario, anteriormente al *pes hippocampi* si trova l'AMY, strettamente interconnessi (Naidich et al., 1987).

Ai fini descrittivi l'HIP può essere suddiviso in una porzione dorsale situata appena dietro il setto, una porzione posteriore, dove comincia a piegarsi ventralmente e lateralmente, ed una porzione ventrale situata nella parte temporale dell'encefalo (fig. I.2; O'Keefe e Nadel, 1978). Se, invece, tale struttura viene rapportata al corpo calloso (Cc), si distingue un HIP dorsale (DH) e un HIP ventrale (VH), uniti per il tramite dell'esigua fasciola cinerea, che continua nel DG. Il DH è costituito da un'esile strato di sostanza grigia che prende il nome di *induseum griseum*, il quale presenta sui margini un ispessimento definito, per ciascun lato, stria longitudinale laterale (*stria tecta*) e stria longitudinale mediale (o nervo del Lancisi). Tali componenti sono da considerarsi atrofiche formazioni di sostanza grigia, in quanto ricevono solo esili fascetti di fibre nervose mieliniche dalla via olfattiva.

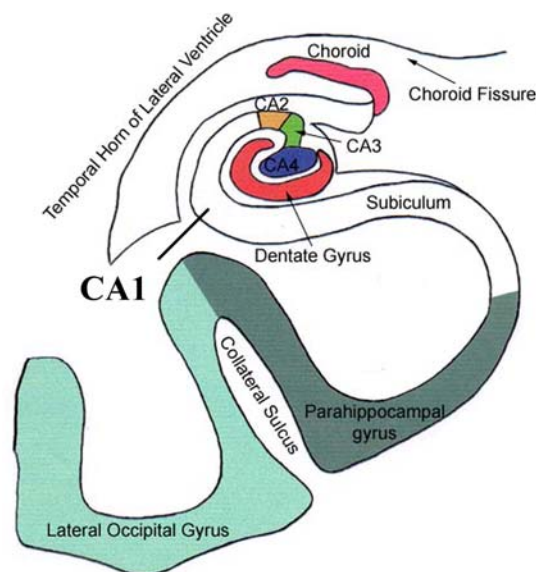


Fig. I.2. Visione schematizzata dell'HIP con strutture annesse.

Il VH, al contrario, si presenta come un rilievo che sporge dal pavimento del corno inferiore del ventricolo laterale; esso si sviluppa intorno al solco (o fessura) dell'HIP (Mezzogiorno et al., 1999) e consta di due grandi settori a forma di U che, in senso medio-laterale, sono:

- l'*alveus* (Alv), o fondo dell'HIP, che si trova dopo lo strato polimorfo ed il corno inferiore dei ventricoli laterali;

- il DG (area dentata, fascia dentata), appartenente all'archipallio e tristratificato. Presenta numerose incisure che gli conferiscono un aspetto dentato, da cui il nome. Si prolunga davanti nella benderella dell'*uncus*, che si continua nell'*uncus*, e dietro abbandona la Fi e va verso la superficie dorsale del Cc. Presenta una faccia convessa in continuazione con lo strato molecolare dell'HIP, ed una faccia concava, che è in continuazione con la lamina terminale dell'HIP;
- l'HIP (CA), che rappresenta la porzione mediale del corno inferiore del pavimento dei ventricoli laterali ed appartiene alla paleocorteccia;
- la Fi, che va verso la superficie ventrale del Cc stesso, lasciando in mezzo lo splenio del Cc.

Lateralmente alla HF notiamo la presenza di una formazione paraippocampale (PHR) che confina con una regione particolare dell'HIP definita *subiculum* (Sub). Quest'ultimo è suddiviso in *presubiculum* (PrS), *parasubiculum* (PaS), corteccia entorinale (EC; suddivisa in una zona mediale, MEC ed una laterale, LEC), corteccia peririnale (PER; composta dalle aree di Brodmann 35 e 36) e corteccia postrinale (POR; fig. I.3; van Strien et al., 2009).

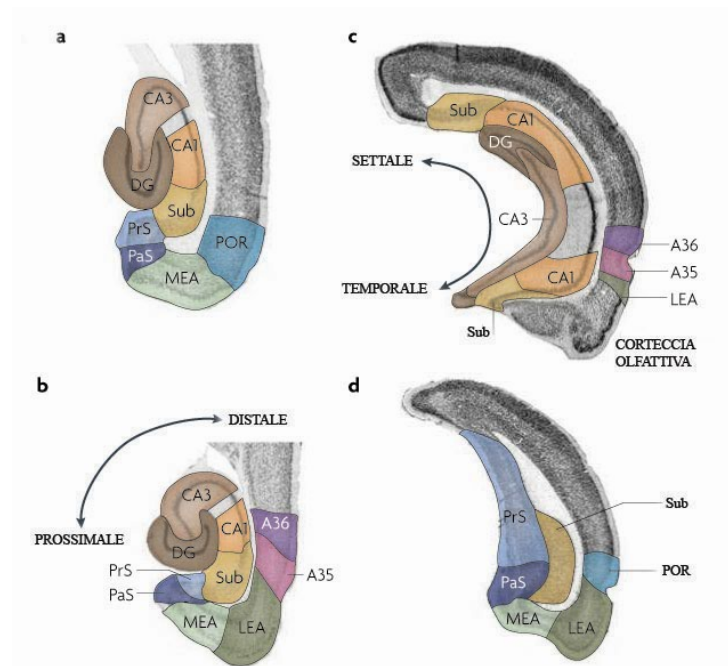


Fig. I.3. Visione laterale (schema a sinistra; a,b) e caudale (schema a destra; c,d) della PHR nel cervello di ratto con sub-regioni evidenziate da colori differenti: DG, giro dentato; PrS, presubiculum; PaS, parasubiculum; MEA, area entorinale mediale; LEA, area entorinale laterale; POR, corteccia postrinale; van Strien et al., 2009).

I.3.1 La citoarchitettura della formazione ippocampale

La HF presenta in tutte le sue componenti una precisa stratificazione il cui grado di complessità varia tra le parti che lo costituiscono (van Strien et al., 2009). In particolare, a livello del DG si riscontrano tre strati (fig. I.4):

- lo strato granulare (SG), contenente i corpi cellulari fortemente raggruppati delle cellule granulari;
- lo strato molecolare (SM), caratterizzato dall'intreccio dei dendriti apicali delle cellule granulari e delle loro afferenze;
- lo strato polimorfo (SPol), che si fonde con la regione 4 di CA (CA4) e contiene i segmenti iniziali degli assoni delle cellule granulari; questi ultimi si riuniscono a formare il fascio delle fibre muscoidi (MF). Esso, inoltre, contiene anche cellule non granulari, di cui le più importanti sono le cellule basket.

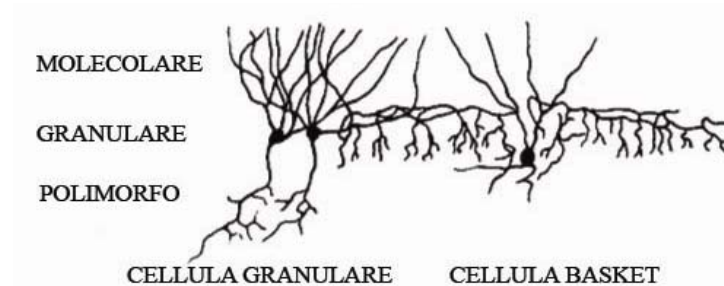


Fig. I.4. Stratificazione del DG ippocampale.

Per quanto concerne l'HIP, questa componente viene divisa in una regione superiore e una inferiore. La regione superiore si trova in prossimità del Sub e contiene cellule piramidali di medie dimensioni, i cui dendriti emanano piccoli rami laterali che non si dividono per diverse centinaia di μm . La regione inferiore, invece, è un semicerchio in prossimità del DG e contiene cellule piramidali giganti i cui dendriti si biforcano subito dopo essere usciti dal corpo. Già a partire dagli anni trenta, l'HIP veniva suddiviso in quattro settori indicati con la sigla CA (CA1-CA4); la regione superiore corrisponde alla regione 1 di CA (CA1), mentre quella inferiore corrisponde alle regioni 2 e 3 di CA (CA2 e CA3; Lorente de No, 1934). Se si esclude la CA4, tutti i settori dell'HIP hanno un'organizzazione di base molto simile, con grossi neuroni disposti in unica fila e dotati di dendriti che si estendono per alcune centinaia di μm verso la stessa direzione. Nel caso della CA4, questa regione identifica invece una zona posta all'interno dell'*hilus* del DG caratterizzata da una diversa stratificazione e le cui cellule piramidali, pur presentando delle afferenze ed inviando i loro assoni nella Fi, non ricevono input dalle cellule basket. In particolare, i vari settori dell'HIP sono organizzati in ben cinque strati

(fig. I.5), ciascuno definito dalla presenza di specifiche componenti delle cellule piramidali giganti o delle loro afferenze. A partire dalla superficie ventricolare, si possono riconoscere i diversi strati:

- l'Alv, contenente gli assoni delle cellule piramidali diretti verso la Fi o il Sub;
- lo *stratum oriens* (SO), che si trova tra l'Alv e i corpi delle cellule piramidali; contiene, oltre ai dendriti basali delle stesse e delle cellule basket, anche afferenze provenienti dal setto;
- lo *stratum pyramidale* (SP), caratterizzato dai corpi delle cellule piramidali;
- lo *stratum radiatum* (SR), localizzato tra lo *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) e lo SP;
- lo SLM, che sembra contenere la maggior parte delle fibre del perforant path (PP). Quest'ultimo è localizzato sotto la fessura ippocampale con uno spessore di circa 150 μm (Kajiwara et al., 2008; van Strien et al., 2009).

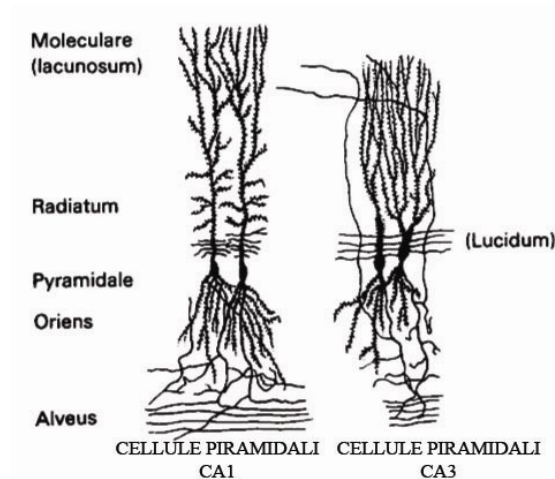


Fig. I.5. Stratificazione dell'HIP.

Gli SR e SLM comprendono rispettivamente i segmenti prossimali e distali dell'albero dendritico apicale delle cellule piramidali. Nella regione CA3 è possibile identificare un altro strato, detto *stratum lucidum* (SL), interposto tra i corpi delle cellule piramidali e lo SR, ove termina parte delle MF delle cellule granulari dentate. A tal proposito, appare rilevante osservare come, nonostante l'organizzazione di base sia conservata, si riscontra un caratteristico tipo cellulare nelle diverse parti della HF. In particolare, neuroni di notevoli dimensioni costituiscono le cellule piramidali giganti di CA3, mentre neuroni piramidali più piccoli si ritrovano in CA1. A livello del DG si riscontrano, invece, le tipiche cellule granulari, dotate di soli dendriti apicali (O'Keefe e

Nadel, 1978). Da un punto di vista citoarchitettonico la PHR presenta sei strati (Fig. I.6), indicati rispettivamente con numeri romani I-VI (van Strien et al., 2009); anche qui, in ciascun strato è possibile identificare diverse tipologie di cellule.

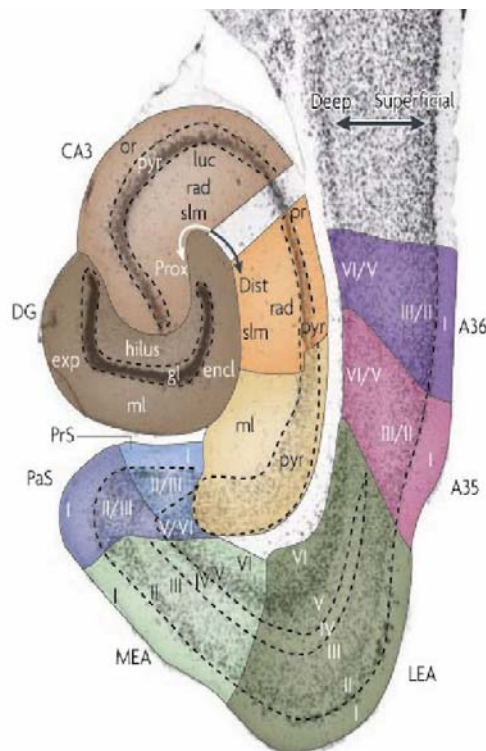


Fig. I.6. Visione della regione paraippocampale (PHR)-ippocampale con annesse sub-regioni di colori differenti: (CA), cornu ammonis; dist, distale; dl, parte dorsolaterale della corteccia entorinale; encl, parte nascosta del giro dentato (DG); exp, parte esposta del DG; gl, strato delle cellule granulari; luc, stratum lucidum; ml, strato molecolare; or, stratum oriens; prox, prossimale; pyr, strato delle cellule piramidali; rad, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-molecolare; vm, parte ventromediale della EC; sub, subiculum; PrS, presubiculum; PaS, parasubiculum; LEA, area entorinale laterale; MEA, area entorinale mediale; POR, corteccia postrinale. I numeri romani indicano gli strati corticali (modificato da van Strien et al., 2009).

Cellule granulari

Il principale elemento neuronale che caratterizza il DG è la cellula granulare (McBain, 2008), con una struttura bipolare ed una natura prevalentemente eccitatoria, in accordo con l'utilizzo del glutammato (Glu), oltre che, in minor misura, dell'acido γ -aminobutirrico (GABA) come principale neuromediatore chimico (Spruston e McBain, 2006). Numerosi studi hanno ormai definito la morfologia di tali neuroni, caratterizzati da piccoli corpi cellulari ovoidali con un diametro di 10 μm ed una lunghezza nel senso longitudinale di 18 μm . Dal corpo si diparte un unico albero dendritico apicale di forma

conica che si estende nello SM terminando in prossimità della fessura ippocampale ed il cui grado di arborizzazione appare estremamente variabile oltre che significativamente inferiore rispetto a quello delle cellule piramidali dell'HIP. L'assone delle cellule granulari, detto MF, emerge, inoltre, dal polo basale del soma e da qui prosegue verso l'*hilus* e la regione CA3 (McBain, 2008). In genere, le cellule granulari danno origine ad un'unica fibra assonale mielinica con un diametro di circa 0.2 μm e con una lunghezza totale (compresi i collaterali) di circa 3 mm (Acsády et al., 1998). Le MF creano ramificazioni che terminano in parte su numerosi tipi cellulari all'interno dell'*hilus*, mentre un'altra porzione si dirige verso i dendriti apicali ed, in minore misura, basali dei neuroni piramidali della regione CA3. La componente muscoide che proietta verso CA3 forma uno stretto fascio parallelo allo strato dei corpi delle cellule piramidali di CA3 corrispondente a circa 100 μm dello SL. In tal contesto, risulta interessante sottolineare l'unicità di tali fibre, capaci di dare luogo a terminazioni sinaptiche altamente specializzate in base alla natura del bersaglio post-sinaptico. È stato particolarmente interessante constatare l'esistenza di tre tipi di terminazioni presinaptiche della MF, distribuite non uniformemente lungo l'intera estensione dell'assone: le terminazioni muscoidali grandi (4-10 μm di diametro), le estensioni filopodiali (0.5-2.0 μm), che proiettano dalle terminazioni muscoidali grandi, e le piccole varicosità *en passant* (0.5-2.0 μm ; Acsády et al., 1998). Il numero totale delle terminazioni muscoidali grandi ritrovate su un solo assone è pari a 10 nella regione *hilar*, dove si realizzano contatti sinaptici con le cellule muscoidi presenti, e a 12 (range 10-18) nella regione CA3, dove al contrario tale tipo di terminazione avviluppa le escrescenze spinose dendritiche dei neuroni piramidali (Acsády et al., 1998). Nel caso delle MF grandi, esse non innervano di solito gli interneuroni GABAergici, mentre le piccole estensioni filopodiali e i terminali *en passant*, che emergono dall'assone parentale, innervano prevalentemente gli interneuroni inibitori presenti nello SL (Acsády et al., 1998), stabilendo sinapsi di tipo sia asso-somatico che asso-dendritico. Il numero totale delle estensioni filopodiali e delle piccole sinapsi *en passant* è notevolmente superiore a quello delle grandi terminazioni delle MF (Acsády et al., 1998) sia nell'*hilus* (120-150) che nella regione CA3 (40-50). Questo tipo di arrangemento è tale che ogni terminazione muscoidale grande nella sotto-regione CA3 crei circa 2.5 piccoli bulbi che terminano nelle estensioni filopodiali, indicando, quindi, che ciascuna MF delle cellule granulari nella sotto-regione CA3 presenta in media 25-35 estensioni filopodiali. Poiché la maggior parte delle terminazioni muscoidali grandi

si dirige principalmente verso le cellule piramidali della regione CA3 e le estensioni filopodiali verso i dendriti lisci degli interneuroni del circuito inibitorio locale, si deduce che il principale bersaglio delle cellule granulari è rappresentato dagli interneuroni inibitori (Acsády et al., 1998).

È interessante notare che il controllo dell'attività neuronale della regione CA3 operato dalle MF si esplica grazie alla diversa capacità di trasmissione dell'impulso presentata dalle terminazioni muscoidali grandi e quelle filopodiali. Le prime, in particolare, caratterizzate da un maggior numero di siti per il rilascio dei mediatori chimici, tendono a mediare le risposte delle cellule principali di CA3 a causa della bassa probabilità di rilascio dei neurotrasmettitori. Le terminazioni filopodiali, al contrario, pur essendo dotate di un unico sito, presentano un'elevata probabilità di trasmissione a livello degli interneuroni dello SL. In tal modo, le cellule granulari del DG, se stimolate a diverse frequenze, produrranno una diversa risposta in CA3. Una stimolazione a basse frequenze delle MF produce, infatti, una netta inibizione dei circuiti in CA3 (Penttonen et al. 1997), mentre ad una più elevata frequenza si avrà una maggiore stimolazione delle cellule principali ed il contemporaneo indebolimento dell'attivazione interneuronale nello SL (Toth et al., 2000; Henze et al., 2002). Da quanto esposto, si può assumere che input corticali e ippocampali, operanti in maniera nettamente separata, realizzano il controllo delle attività delle cellule granulari. Nel primo caso, in particolare, fibre provenienti dalla MEC e LEC terminano all'esterno dello SM sui dendriti distali delle cellule granulari. Al contrario, le fibre provenienti dalle cellule muscoidi dell'*hilus* formano sinapsi sui dendriti prossimali delle cellule granulari, al centro dello SM (Förster et al., 2006).

Cellule piramidali e interneuroni in CA1 e CA3

Numerosi studi sono stati incentrati sulla caratterizzazione dei diversi tipi cellulari che costituiscono i complicati circuiti neuronali in CA1 e CA3. In CA1 recentemente è stata dimostrata la presenza di tre distinti tipi di neuroni piramidali, responsabili dell'innervazione di almeno 10 formazioni extraippocampali (Cenquizca e Swanson, 2006), e di una popolazione molto più eterogenea di interneuroni, preposti a fornire sia una generale trasmissione inibitoria che un sottile controllo dell'attività piramidale. Gli interneuroni, in particolare, possono essere classificati sulla base di diversi criteri, quali il pattern di trasmissione dell'impulso nervoso o la capacità di esprimere un particolare profilo molecolare. Sulla base delle caratteristiche morfologiche dei prolungamenti

dendritici è possibile distinguere neuroni oligopolari e multipolari. Gli interneuroni oligopolari mostrano due o tre tronchi dendritici principali che originano da poli più o meno opposti dei corpi cellulari, mentre gli interneuroni multipolari mostrano quattro o più dendriti principali. Tra questi ultimi si riscontrano, inoltre, configurazioni multipolari stellate dotate di dendriti primari di lunghezza variabile, che emergono radialmente da tutti i lati dei corpi cellulari. I dendriti primari degli interneuroni sono leggermente assottigliati nella parte distale, mentre le parti prossimali dei dendriti secondari spesso mostrano diametri irregolari a causa del loro aspetto varicoso (Kajiwara et al., 2008). Alcuni interneuroni si distribuiscono all'interno di SR e di SLM o, in alternativa, sull'interfaccia SR/SLM (Fig. I.7; Somogyi e Klausberger, 2005).

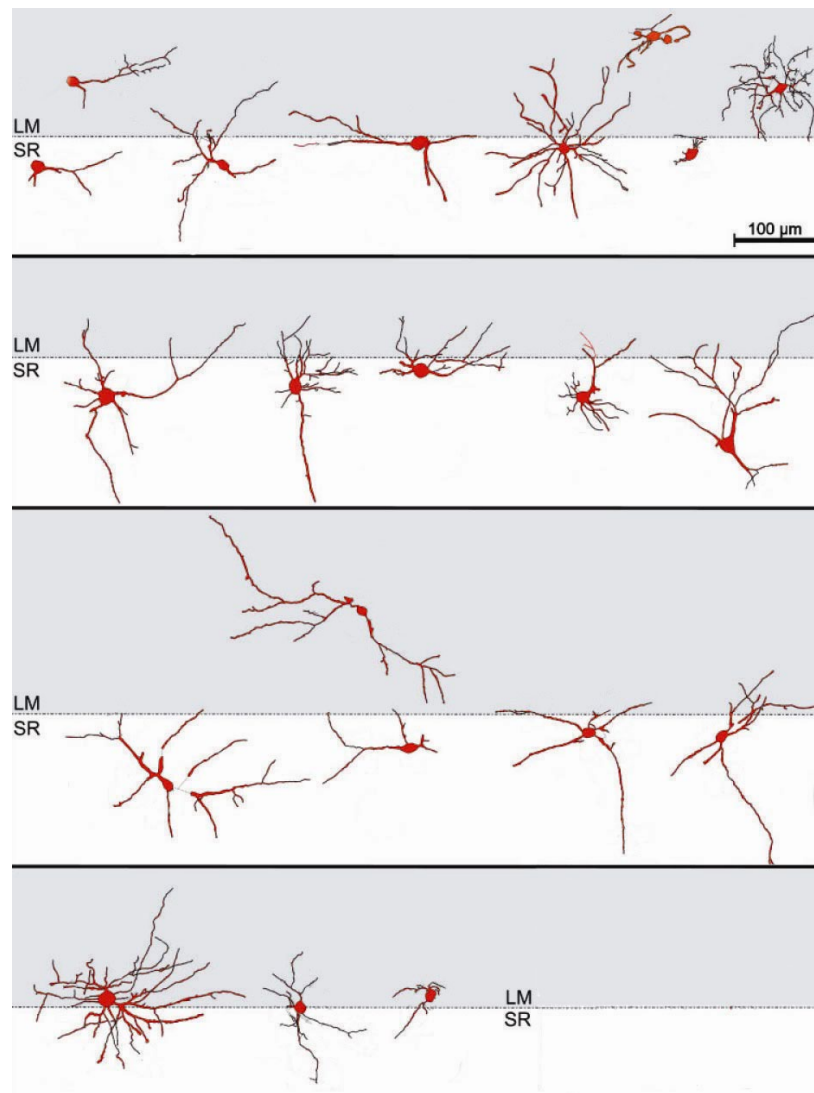


Fig. I.7. Mosaico che illustra la localizzazione degli interneuroni di CA1 (LM, stratum lacunosum-moleculare; SR, stratum radiatum; modificato da Kajiwara et al., 2008).

Gli interneuroni di CA1 presentano, in genere, dendriti privi di spine e assoni proiettati all'interno di SR e SLM, fatta eccezione per una parte di essi che proietta in direzione del versante interno dello SM di DG (Fuentelba et al., 2006). Altre classi neuronali, quali gli interneuroni basket, bistratificati e asso-assonici hanno, invece, i loro corpi cellulari nello SP. Accanto a studi precedenti, che dimostrano come la maggior parte degli assoni degli interneuroni disposti sull'interfaccia SR/SLM discendono in SR per fornire un'inibizione *feed-forward* ai neuroni piramidali di CA1 (Vida et al., 1998), evidenze più recenti individuano gli interneuroni locali di CA1 come principale fonte di input inibitori per le cellule piramidali di CA1 (Somogyi e Klausberger, 2005). Un ulteriore criterio di classificazione degli interneuroni si basa sulla loro capacità di innervare specifici domini nei neuroni piramidali, e a tal proposito, in CA1 sono stati identificati 21 diversi tipi di interneuroni (Klausberger e Somogyi, 2005). Sebbene ciascuna cellula piramidale di CA1 sia in grado di ricevere circa 30000 input sinaptici di natura diversa sul proprio network dendritico, sono solo input di natura GABAergica a giungere in corrispondenza sia del soma che del segmento iniziale del prolungamento assonico. I dendriti basali e qualche dendrite obliquo, che nasce da quelli apicali, ricevono input Gluergici principalmente da CA3, dagli assoni collaterali e dall'AMY, mentre i dendriti apicali ricevono principalmente input Gluergici da EC e

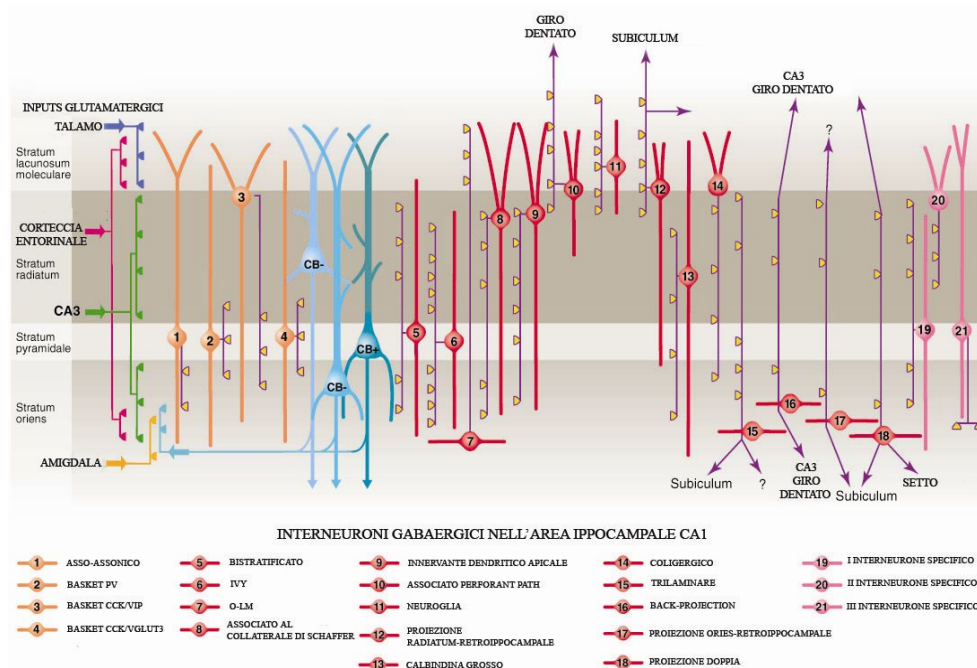


Fig. I.8. Tre tipi di cellule piramidali sono accompagnati da circa ventuno classi di interneuroni nella regione ippocampale CA1 (VIP, polipeptide intestinale vasoattivo; VGLUT, trasportatore vescicolare del glutammato; O-LM, oriens-lacunosum molecolare; CCK, colecistochinina; modificato da Klausberger e Somogyi, 2008).

dal talamo. Tutti i dendriti ricevono, inoltre, input GABAergici dai diversi interneuroni locali, secondo una precisa organizzazione spaziale. È stato dimostrato come almeno 5 distinti tipi di interneuroni che esprimono la parvalbumina (PV) provvedono all'innervazione di altrettanti domini neuronali (Fig I.8.); le cellule asso-asoniche innervano esclusivamente la porzione iniziale del processo assonico, mentre le cellule basket innervano i corpi cellulari oltre che i dendriti prossimali (Klausberger e Somogyi, 2008). Le cellule bistratificate forniscono, inoltre, sinapsi sia ai dendriti basali che a quelli obliqui allineati con gli input Gluergici provenienti da CA3, mentre gli interneuroni degli strati O-LM sinaptano con i dendriti apicali allineati agli input provenienti da EC.

Ciascuna tipologia sinaptica influenza in modo diverso l'attività delle cellule piramidali, come suggerito da evidenze sperimentali sulla capacità delle sinapsi perisomatiche di regolare il potenziale del sodio (Na^+) e quella delle sinapsi dendritiche di regolare, al contrario, l'insorgenza del potenziale d'azione legato alle correnti del calcio (Ca^{2+}). Un altro fattore che contribuisce a rendere molto complicata la regolazione dell'attività piramidale è la presenza di diverse sinapsi interneuronali nello stesso dominio neuronale. A tal proposito è stato dimostrato che anche gli interneuroni che esprimono la colecistochinina (CCK) innervano i neuroni piramidali a livello somatico e dei dendriti prossimali (fig. I.8; interneuroni di tipo 3 e 4), dei dendriti apicali (fig. I.8; interneuroni di tipo 9), dei dendriti che ricevono input Gluergici da CA3 (fig. I.8; interneuroni di tipo 8) e dei ciuffi dendritici apicali (fig. I.8; interneuroni di tipo 10; Papp et al., 1999). Gli interneuroni CCK sono finemente regolati da specifici nuclei del peduncolo cerebrale (Penttonen et al., 1998) ed il loro rilascio di GABA determina un effetto inibitorio sui neuroni piramidali ritenuto essenziale nei processi di integrazione degli impulsi eccitatori forniti da diverse afferenze (Glickfeld e Scanziani, 2006). Analogamente, anche gli interneuroni GABAergici di tipo neurogliaforme riescono a controllare le attività dei neuroni piramidali di CA1 attraverso dei contatti sinaptici con il loro ciuffo dendritico, mentre le cellule Ivy sinaptano con i dendriti prossimali delle cellule principali disposti parallelamente agli input di CA3. Le cellule Ivy costituiscono la classe più numerosa di interneuroni finora descritti e, attraverso il rilascio di GABA così come di neuropeptide Y (NPY), da loro stessi sintetizzato, esercitano una forte regolazione sul rilascio di Glu dalle cellule piramidali di CA3. Queste ultime, infatti, a differenza delle terminazioni delle fibre del PP, esprimono elevati livelli del recettore per il NPY di tipo 2 (Stanic et al., 2006).

Il corretto esplicarsi delle funzioni complesse ippocampali richiede la partecipazione di numerose strutture corticali e, in tal contesto, svolgono un ruolo essenziale particolari classi di interneuroni GABAergici definiti di proiezione (Jinno et al., 2007). Alcuni di questi neuroni proiettano ai sottocampi ippocampali prossimali e/o al setto mediale, altri inviano prolungamenti verso il Sub ed altre aree retroippocampali o verso le sole formazioni retroippocampali; altri ancora proiettano verso lo strato molecolare del Sub, del PrS e della corteccia retrospleniale (Jinno et al., 2007). L'attività coordinata dell'insieme di interneuroni descritti, così come di altri, determina il caratteristico pattern funzionale spazio-temporale dell'HIP (Klausberger e Somogyi, 2008). A differenza degli interneuroni, i corpi cellulari delle cellule piramidali di CA1 sono completamente concentrati nello SP, con dendriti basali che si estendono nello SO, e dendriti apicali che occupano lo SR ed lo SLM (Bertrand e Lacaille, 2001; Fuentealba et al., 2006).

I.4 Connessioni intra- ed extra-ippocampali

Il tipico circuito ippocampale viene descritto come unidirezionale con input che partono dalla EC e, attraverso la PP, giungono sia all'interno del DG che sui neuroni piramidali di CA3 (fig. I.9).

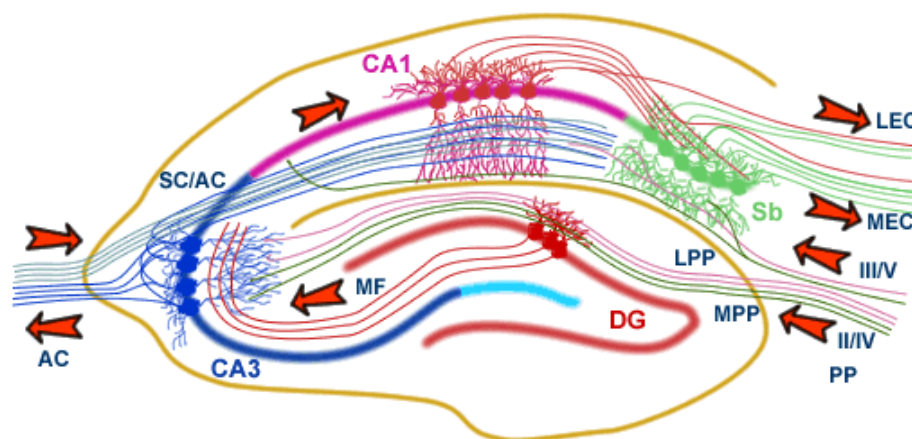


Fig. I.9. Rappresentazione del network ippocampale. (AC, pathway commissurale associativa; SC, collaterali di Schaffer; MF, fibre muscoidi; LPP, perforant path laterale; MPP, perforant path mediale; PP, perforant path; Sb, subiculum; MEC, corteccia entorinale mediale; LEC, corteccia entorinale laterale; DG, giro dentato).

Le cellule principali di CA3, che ricevono impulsi anche dal DG attraverso le MF, inviano a loro volta fibre alle cellule piramidali non solo dell'area CA1 omolaterale, attraverso la via delle collaterali di Schaffer (SC), ma anche all'area CA1 controlaterale, attraverso la via commissurale. A livello di CA1 giungono, inoltre, fibre dirette attraverso la PP. Da CA1 partono fibre dirette verso il Sub e verso la EC, costituendo queste ultime il principale output dell'HIP. In particolare, la porzione prossimale dello strato di cellule piramidali di CA1 proietta verso il Sub distale, mentre la parte distale di CA1 proietta verso la parte prossimale del Sub (Naber et al., 2001). In aggiunta a tale modello ampiamente riconosciuto come circuito trisinaptico, esistono diverse backprojections intrinseche alla HF, quali, ad esempio, quelle fornite dalle cellule piramidali in CA3, le quali proiettano all'*hilus* e allo SM interno al DG (Wittner et al., 2007). Recenti evidenze hanno, inoltre, sottolineato il ruolo funzionale di specifiche backprojection da CA1 a CA3, che probabilmente derivano dai neuroni inibitori presenti nello SR e nello SO di CA1 e proiettano verso lo stesso strato in CA3. Backprojections, la cui natura eccitatoria od inibitoria non è stata ancora dimostrata, si dipartono dallo SP del Sub e proiettano a CA1. Nel Sub, cellule piramidali emettono assoni omolaterali che sinaptano con cellule piramidale ed interneuroni di un'ampia regione del Sub stesso localizzata ventralmente al loro sito d'origine (Harris et al., 2001).

Numerosi studi hanno ormai dimostrato come le cellule dell'HIP ricevono afferenze da diverse regioni encefaliche e al contempo proiettano verso numerose aree corticali e subcorticali. In particolare, le afferenze dell'HIP possono essere così classificate: a) afferenze intrinseche provenienti da cellule presenti nello stesso campo ippocampale; b) afferenze intrinseche provenienti da altri settori omolaterali; c) afferenze commissurali provenienti da diversi settori dell'HIP controlaterale; d) afferenze estrinseche o extraippocampali provenienti da un complesso di strutture che vengono comunemente indicate come PHR (van Strien et al., 2009).

Connessioni intraparaippocampali

È ormai nota l'esistenza di una stretta comunicazione funzionale tra la HF e quella PHR (van Strien et al., 2009), caratterizzata da oltre 1600 tipi diversi di connessioni (fig. I.10). Tale complessità si accompagna ad un altrettanto complicato network neuronale all'interno della PHR, che vede coinvolte le diverse componenti secondo un modello molto ordinato. A tal proposito, è stato dimostrato come la PER invia

proiezioni verso la LEC ed, in minor misura, verso la MEC, mentre la POR proietta prevalentemente verso la MEC ed, in minor misura, verso la LEC (Burwell e Amaral, 1998). In particolare, i neuroni presenti nel II, III, V e VI strato dell'area A35 e A36 della PER convergono verso gli strati II e III della LEC, mentre le proiezioni della PER verso la MEC derivano principalmente dall'area A36 (Burwell e Amaral, 1998).

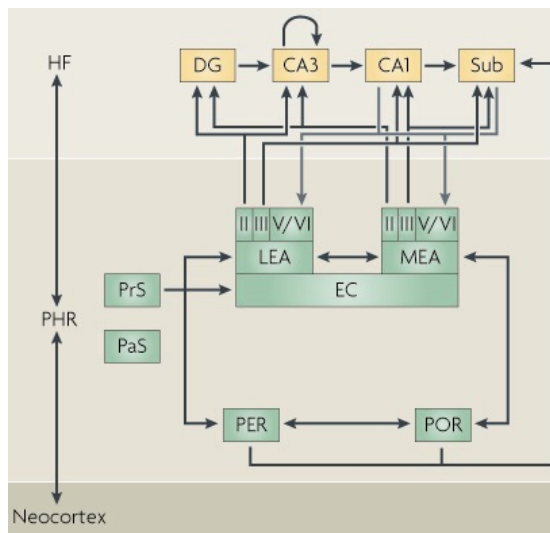


Fig. I.10. Modello standard del circuito HIP-PHR (PHR, formazione paraippocampale; PrS, presubiculum; PaS, parasubiculum; PER, corteccia peririnale; POR, corteccia postrinale; EC, corteccia entorinale; LEA, area entorinale laterale; MEA, area entorinale mediale; HF, formazione ippocampale; DG, giro dentato; Sub, subiculum. I numeri romani indicano gli strati corticali; modificato da van Strien et al., 2009).

Le proiezioni della POR che nascono nel II, III, V e VI strato sinaptano, al contrario, sia negli strati II e III della LEC che negli strati superficiali della MEC (Burwell e Amaral, 1998). Insieme a tali afferenze della EC vanno ricordate le numerose efferenze, secondo un tipico modello di innervazione reciproca tra le diverse componenti della PHR, in cui la EC fornisce proiezioni sia alla PER che alla POR. Sono state riscontrate proiezioni dagli strati III e V della LEC a tutti i livelli di A35 e A36, e dalla MEC a tutti gli strati della A35. La MEC proietta, inoltre, verso A36 ed insieme alla LEC proiettano verso la POR (Witter e Amaral, 2004; Kerr et al., 2007). Sebbene sia stata finora rivolta poca attenzione alla comunicazione tra PER e POR, è nota l'esistenza di fibre nervose che connettono gli strati II e V della POR con tutti gli strati di A35 e A36 ed il III strato della POR con A36, rispettivamente. Analogamente, secondo un modello di innervazione reciproca, fibre nervose, che si dipartono dagli strati II, V e VI della PER, raggiungono la POR (Burwell e Amaral, 1998; Furtak et al., 2007).

Un ulteriore network di fibre neuronali all'interno della PHR è stato riscontrato tra la EC, il PrS e il PaS. Mentre la MEC dorso-laterale proietta ai livelli settali del PrS e del PaS, la MEC ventro-mediale proietta verso il PrS ed il PaS temporale (Kerr et al., 2007). Sia il PrS che il PaS proiettano, inoltre, verso la EC ed in particolare gli strati superficiali del PrS settale proiettano alla parte dorso-laterale ed intermedia della MEC,

mentre il PrS temporale proietta nella sua parte ventro-mediale. Gli strati profondi del PrS proiettano, invece, a tutti i livelli della MEC e prevalentemente agli strati profondi della LEC (Van Haeften et al., 2000; Honda et al., 2008), a tutti gli strati del PaS che convergono, inoltre, al II strato della MEC. Un'ulteriore complicazione a tale descrizione è fornita dalle connessioni reciproche PrS/PaS, PER/POR (Furtak et al., 2007) e connessioni intrinseche della EC. All'interno della MEC, infatti, i neuroni degli strati II, III, V e VI proiettano verso gli strati superficiali della LEC (Dolorfo e Amaral, 1998); gli strati II e V della LEC proiettano, invece, verso gli strati superficiali e gli strati III e VI verso gli strati superficiali e profondi della MEC, rispettivamente (Dolorfo e Amaral, 1998).

Proiezioni del paraippocampo verso l'ippocampo

La PHR rappresenta la principale fonte di afferenze ippocampali che, originando da diversi strati della EC, raggiungono specifiche aree dell'HIP in un complesso network di fibre noto come PP. In particolare, mentre il I strato della EC sinapta con tutti gli strati del DG, le fibre che originano dagli strati III, V e VI contribuiscono solo in misura minore a tale innervazione; in aggiunta, parte delle fibre della PP raggiunge anche la CA1 e la CA3. Numerosi studi hanno messo in evidenza la natura dei contatti sinaptici che si creano tra le fibre della PP e le cellule presenti nelle diverse aree ippocampali (Kerr et al., 2007). A livello dello SM del DG e nello SLM di CA3, ad esempio, le proiezioni della EC convergono sui dendriti apicali delle cellule granulari e degli interneuroni, rispettivamente. In particolare, la LEC proietta verso il terzo esterno dello SM del DG, mentre la MEC proietta verso la metà di questo III esterno. Un simile modello di convergenza (Sporns e Tononi, 2007) è osservato in CA3, dove la LEC termina nella parte superficiale e la MEC nella parte profonda dello SLM. L'organizzazione delle proiezioni della EC verso CA1 e il Sub appare nettamente diversa da quella finora descritta. In particolare sembra sia principalmente il III strato e solo in minor misura gli strati II, V e VI ad inviare proiezioni verso lo SLM di CA1 e lo SM del Sub (Kerr et al., 2007). Accanto alla EC, altre sottoregioni della PHR sono state individuate quali fonti di input per l'HIP. In tal contesto, risultano particolarmente interessanti i neuroni presenti in tutti gli strati del PrS e del PaS, i quali proiettano non solo verso lo SM del DG (Eichenbaum, 2000) e del Sub, ma anche verso lo SLM di CA3 e di CA1. Un altro esempio è fornito dalle fibre che, proiettando dalle aree A35 ed

A36 della PER raggiungono sia CA1 che il Sub, e dalle fibre che connettono la POR con quasi tutti i sottocampi dell'HIP (Furtak et al., 2007).

Connessioni intraippocampali

Le connessioni intraippocampali vengono descritte dal classico modello trisinaptico, in cui fibre provenienti dal DG giungono in CA3 dove si formano a loro volta fibre dirette verso CA1. Sulla base del complicato pattern di connessioni esistente tra le HF e extraippocampali, si comprende bene che non si tratta di un semplice percorso unidirezionale. CA1, ad esempio, riceve fibre da un gran numero di fonti: gli input sub-corticali verso CA1 derivano da aree quali la banda diagonale del setto o la linea mediale del talamo (Witter e Amaral, 2004), mentre gli input corticali generano dalla EC, attraversano la PP e terminano nello SLM. In tal contesto, possono essere individuate due diverse vie che proiettano a CA1. In un primo caso, i neuroni dello strato II della EC forniscono assoni al DG ed alla regione CA3; dal DG nascono le MF che raggiungono CA3 dove si originano i SC che a loro volta terminano nello SR di CA1. Dall'altra parte, i neuroni del III strato di EC proiettano direttamente verso lo SLM di CA1. In entrambi i casi sono i dendriti dei neuroni piramidali e degli interneuroni a ricevere tali input (van Groen et al., 2003; Wittner, 2007), secondo un ordine topografico ben preciso. Se si considerano, infatti, neuroni piramidali prelevati dallo SLM lontani dall'interfaccia SR/SLM, i contatti provengono solo dalle fibre della PP. Se, invece, i neuroni considerati derivano dallo SR, sempre lontano dall'interfaccia SR/SLM, tutti i contatti appartengono ai SC. I neuroni posti in prossimità o sull'interfaccia SR/SLM, al contrario, presentano contatti con entrambi i fasci di fibre. Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato l'esistenza d'interneuroni che ricevono innervazione solo dal PP o da questo e dai SC, mentre non sono stati identificati interneuroni che sinaptano con i soli SC. Anche in questo caso è possibile riscontrare una precisa disposizione topografica per la quale, mentre i contatti tra le fibre della PP e i dendriti degli interneuroni si realizzano in prossimità dello SLM, la maggior parte dei SC sinapta, invece, con i dendriti interneuronali a livello dello SR. I dendriti dei neuroni che si trovano nella regione dell'interfaccia SR/SLM ricevono contatti da entrambe le vie in questione. Si può concludere, quindi, che i neuroni piramidali e gli interneuroni di CA1 ricevono proiezione diretta dalle cellule del III strato della EC, così come input entorinali indiretti mediati dal percorso DG-CA3-SC.

Numerosi studi neuroanatomici suggeriscono, inoltre, che le due vie convergono su neuroni singoli in CA1 (fig. I.11; Ang et al., 2005; Jarsky et al., 2005).

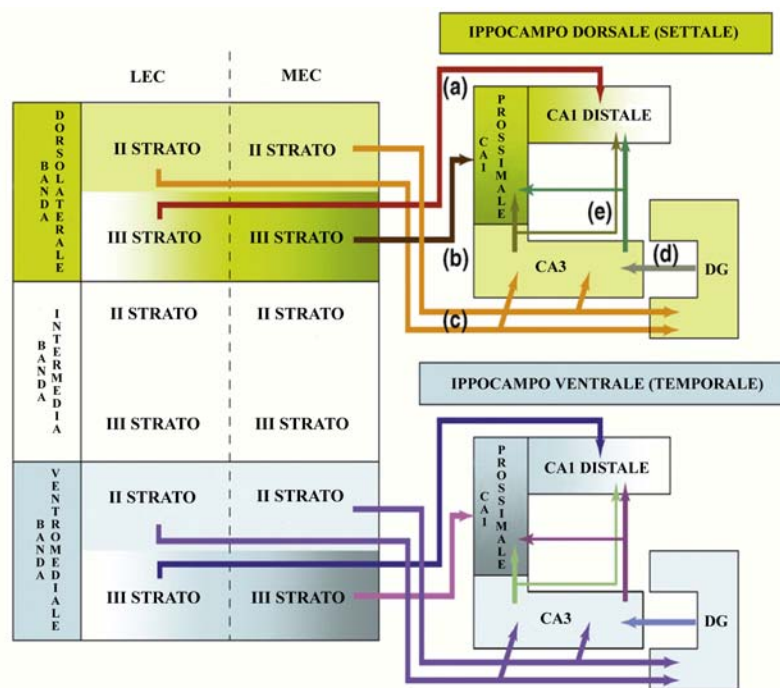


Fig. I.11. Schema illustrativo delle afferenze ippocampali (CA1, regione del Cornu Ammonis; CA3, regione 3 del Cornu Ammonis; DG, giro dentato; modificato da Ahmed e Mehta, 2009).

Proiezioni dell'ippocampo alla formazione paraippocampale

Le principali afferenze ippocampali alla EC nascono dalla regione CA1 e dal Sub e raggiungono in misura variabile gli strati superficiali e profondi sia della MEC che della LEC (Kloosterman et al., 2003). Numerosi studi riportano come la parte prossimale della regione CA1 proietta alla MEC, mentre la parte distale di CA1 proietta alla LEC (Naber et al., 2001). Il Sub prossimale invia una forte proiezione alla LEC ed il Sub distale invia una forte proiezione verso la MEC. Accanto alle proiezioni CA1/Sub-EC, che costituiscono la componente maggiore dell'output ippocampale alla PHR, sono state riscontrate afferenze provenienti da diverse regioni dell'HIP. Ad esempio, CA3, CA1 e il Sub (Kloosterman et al., 2003) proiettano tutti verso il PrS ed il PaS. In tal contesto risulta interessante la connessione Sub/PrS, la quale mette in evidenza un pattern di proiezione secondo un gradiente setto-temporale, in accordo con la comunicazione diretta Sub settale/PrS settale (Kloosterman et al., 2003; Honda et al., 1999) e Sub temporale/PrS temporale (Naber e Witter, 1998). In aggiunta, fibre nervose provenienti dal Sub raggiungono il PaS (Kloosterman et al., 2003), mentre la regione

CA1 ed il Sub proiettano sia verso la PER che la POR sebbene non sia nota l'organizzazione topografica di tali connessioni (Furtak et al., 2007).

I.5 Ontogenesi dell'ippocampo

E' noto che il telencefalo embrionale risulta costituito dal pallio (tetto) e dal subpallio (base; Nadarajah e Parnavelas, 2002); il pallio darà origine alla neocorteccia e all'HIP, mentre differenti regioni del subpallio a molte strutture del telencefalo basale adulto. In particolare, l'Eminenza dei Gangli Mediale (MGE) e l'Eminenza dei Gangli Laterale (LGE) sono fusi in un'unica struttura e genereranno il nucleo pallido e lo striato, rispettivamente; L'Eminenza dei Gangli Caudale (CGE), localizzata posteriormente, darà invece origine alla regione amigdaloidea del sistema limbico (Danglot et al., 2006).

Lo studio dell'ontogenesi della formazione ippocampale, condotto sia nel topo che nel ratto, ha messo in evidenza alcune peculiarità, riferite soprattutto alle modalità di migrazione e disposizione delle cellule, dai loro siti di origine alla posizione definitiva. Da tali studi sono emersi tre caratteristici gradienti di formazione tra le strutture che costituiscono l'HIP. In primo luogo, *le cellule in profondità vengono generate prima rispetto alle cellule superficiali*. In secondo luogo, *si formano inizialmente le cellule più vicine alla fessura rinale e poi quelle più lontane*, seguendo un gradiente che va dalla corteccia rinale al DG. Terzo, *le cellule che si formano per ultime sono affiancate da altre superficiali, di precedente formazione, e da cellule profonde (gradiente a sandwich)*. Ad esempio, nella EC il III strato di cellule origina dopo il II e il IV strato, nel CA le cellule piramidali si originano dopo le cellule dello strato *oriens*, *stratum radiatum* e *lacunosum-molecolare* e, infine, nel DG le cellule granulari originano dopo le grandi cellule dell'*hilus* e dello strato molecolare. Secondo questo gradiente è quindi la corteccia rinale a formarsi per prima, segue il S, l'area CA3 e infine il DG. Sono state dimostrate due eccezioni a tale gradiente: **1)** il PaS ed il PrS si formano dopo il S, e **2)** l'area CA1 si forma in modo evidente solo in seguito all'organizzazione delle cellule in CA3. Questa neurogenesi tardiva può essere correlata al prominente ingresso del talamo ad entrambe le strutture (Bayer, 2004).

Studi mirati alla definizione dei siti di origine e delle modalità di migrazione dei neuroni ippocampali, hanno dimostrato l'esistenza di tre diverse componenti del neuroepitelio ippocampale: il neuroepitelio ammonico, il quale darà origine alle cellule piramidali e ai grandi neuroni degli strati *oriens* e *radiatum*, il neuroepitelio dentato, da

cui si genereranno le cellule dei granuli e i grandi neuroni dello strato molecolare e dell'*hilus* e, infine, il glioepitelio che produrrà le cellule gliali della futura fimbria (Danglot et al., 2006). Tali risultati hanno inoltre evidenziato variazioni nei tempi e modalità di differenziamento dei neuroni delle diverse regioni dell'HIP sia tra le classi dei Vertebrati che tra i Mammiferi stessi. Nel ratto, infatti, i neuroni piramidali sono generati tra il 16° giorno di sviluppo embrionale (E16) ed E19, con un picco per CA3 (E17) che precede CA1 (E19), mentre nel topo si formano tra E14-E15 per CA3 e nel periodo E15-E16 per CA1 (Soriano et al., 1989a,b). La migrazione dei neuroni piramidali ha inizio, in entrambi i casi, il giorno successivo alla loro formazione e definisce una striscia di cellule nella cosiddetta "zona intermedia" (IZ); il giorno seguente, i neuroni abbandonano la IZ e raggiungono la piastra ippocampale (il futuro strato piramidale). Mentre sono richiesti 4 giorni per il raggiungimento della regione CA1, un tempo maggiore è necessario perché le cellule raggiungano CA3, dovendo compiere un tragitto più lungo intorno a CA1. La completa formazione dello strato piramidale sarà osservabile ad E20 in CA1 e ad E22 per CA3, sottolineando quindi come al momento della nascita alcuni neuroni stiano ancora migrando. A differenza dei neuroni piramidali, le cellule dei granuli sono generate tardivamente a partire da E20, con un picco intorno alla prima settimana di sviluppo postatale (PND7). L'intera regione del DG è, infatti, identificabile solo a partire da E21-E22 (Altman e Bayer, 1990c). Alcuni studi condotti sempre da Altman e Bayer hanno descritto le modalità di migrazione di particolari neuroni di grosse dimensioni la cui natura inibitoria, sebbene non dimostrata molecolarmente, è confermata dalla loro disposizione finale nello strato dendritico ippocampale. Tali neuroni derivano, in parte, dal primordio ammonico tra E15 ed E17 e raggiungono lo strato *oriens* e *radiatum*, ed in parte dal primordio dentato nello stesso periodo raggiungendo, queste ultime, l'*hilus* (Bayer, 1980a; Altman e Bayer, 1990a). Particolarmente interessanti risultano i dati emersi da studi mirati alla definizione dei tempi di origine degli interneuroni, in cui sono emerse ancora una volta differenze legate sia alla specie presa in considerazione che alla regione della HF. Un primo risultato sottolinea la formazione prenatale degli interneuroni, sia nel ratto (Amaral e Kurz, 1985) che nel topo (Soriano et al., 1989a,b); nei ratti, in particolare, gli interneuroni originano tra E13 ed E18, invece nei topi sono generati tra E11 ed E17. Mentre la gran parte di tali cellule inibitorie nasce in E12-13 per CA1 e CA3, il picco si registra nei giorni E13-E14 per il DG (Soriano et al., 1989a,b). In aggiunta, la formazione degli interneuroni segue il *gradiente a sandwich* descritto in precedenza,

per il quale le cellule degli strati *oriens* e *radiatum* sono generati prima di quelle dello strato piramidale e, all'interno di quest'ultimo, gli interneuroni di più vecchia formazione sono localizzati in profondità. Complessivamente, tali dati suggeriscono la precoce formazione degli interneuroni rispetto alle cellule principali.

Origine degli interneuroni ippocampali

I processi di formazione dei neuroni piramidali Gluergici e degli interneuroni GABAergici (così definiti in quanto utilizzano come principale neurotrasmettitore il GABA) si distinguono sia per i siti di origine delle cellule che per le diverse modalità di migrazione. Nel primo caso, le cellule principali nascono dal neuroepitelio della zona ventricolare (VZ) del telencefalo dorsale (isocorteccia e HIP) e migrano *radialmente* lungo la IZ fino alla piastra ippocampale. Al contrario, gli interneuroni realizzano una migrazione di tipo *tangenziale* per la quale le cellule si spostano singolarmente o al massimo in coppia (fig. I.12). Poco chiare risultano ancora le informazioni riguardanti i siti di origine degli interneuroni. La maggior parte degli studi finora condotti suggeriscono che gli interneuroni nascono dal subpallio telencefalico (Pleasure et al., 2000), sebbene alcuni autori abbiano indicato come possibile sito di origine anche il pallio dorsale sia nell'uomo (Letinic et al., 2002) che nei roditori (Bellion et al., 2003), in accordo con i risultati di Altman e Bayer.

Origine delle diverse classi di interneuroni

Alcune evidenze suggeriscono che la molteplicità delle popolazioni interneuronali possa essere generata da varie regioni del subpallio embrionale (Danglot et al., 2006). La MGE è stata infatti indicata come fonte di interneuroni corticali (Anderson et al., 2001), striatali (Wichterle et al., 2001) ed ippocampali (Pleasure et al., 2000), mentre la LGE potrebbe fornire gli interneuroni dei bulbi olfattivi, del nucleo *accumbens* e della corteccia (Corbin et al., 2000; Wichterle et al., 2001; Yun et al., 2001). Infine, la CGE produce gli interneuroni che raggiungono la corteccia cerebrale, lo striato, l'AMY, il nucleo rosso della stria terminale, il nucleo *accumbens* e l'HIP (Nery et al., 2002). E' da sottolineare che gli interneuroni derivanti dalla MGE raggiungono il CA, mentre quelli che originano in CGE raggiungono sia il CA che il DG (Nery et al., 2002).

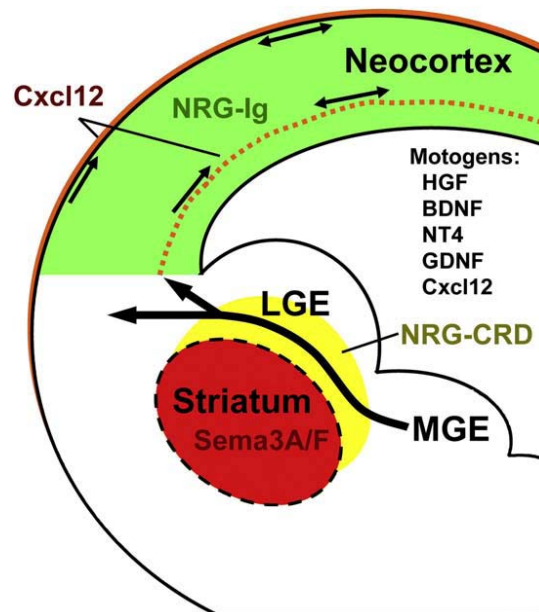


Fig. I.12. Schema rappresentativo della migrazione tangenziale degli interneuroni dalla MGE e dall'LGE. Sono indicati alcuni dei fattori molecolari coinvolti nella migrazione, quali le semaforine 3A (Sema3A) e 3F che impediscono l'invasione degli interneuroni nello striato in via di sviluppo; l'isoforma della Neuregulina-1 che lega la membrana (NRG-CRD), la quale fornisce una via preferenziale lungo la SVZ dell'LGE; un'isoforma secreta della NRG (NRG-Ig) e diversi fattori motogenici specifici per gli interneuroni, quali HGF, BDNF, NT-4, GDNF e la Cxcl12 (modificato da Huang, 2009).

Studi di immunostochimica hanno evidenziato come gli interneuroni che originano in ciascuna regione subpalliale possano esprimere, già ad uno stadio così precoce, specifici *markers* biochimici, quali la parvalbumina (PV), la colecistochinina (CCK) ed altri. In tal modo, le differenze relative al sito di origine e ai tempi di migrazione sono responsabili della formazione di distinti sottotipi interneuronali (Butt et al., 2005; Yuste, 2005).

Modalità di migrazione neuronale

E' stato ampiamente dimostrato che le cellule piramidali e gli interneuroni manifestano diverse modalità di migrazione. Sebbene in passato si ritenesse che i neuroni piramidali seguissero una migrazione radiale e gli interneuroni una migrazione tangenziale, è stata dimostrata, da oltre un decennio, la coesistenza di diverse modalità per ciascuna tipologia cellulare, esplicate in momenti diversi dello sviluppo embrionale (Danglot et al., 2006). I neuroni piramidali che originano nel neuroepitelio (VZ) migrano radialmente attraverso tre distinte modalità: la **traslocazione somatica**, la **locomozione glia-guidata** e la **migrazione multipolare** (fig. I.13; Shoukimas e Hinds, 1978; Kriegstein e Noctor, 2004). Gli interneuroni che originano dall'eminenza dei

gangli, al contrario, raggiungono la corteccia migrando tangenzialmente per poi acquisire modalità di migrazione sia radiale che obliqua verso la destinazione finale (vedi review di Danglot et al., 2006).

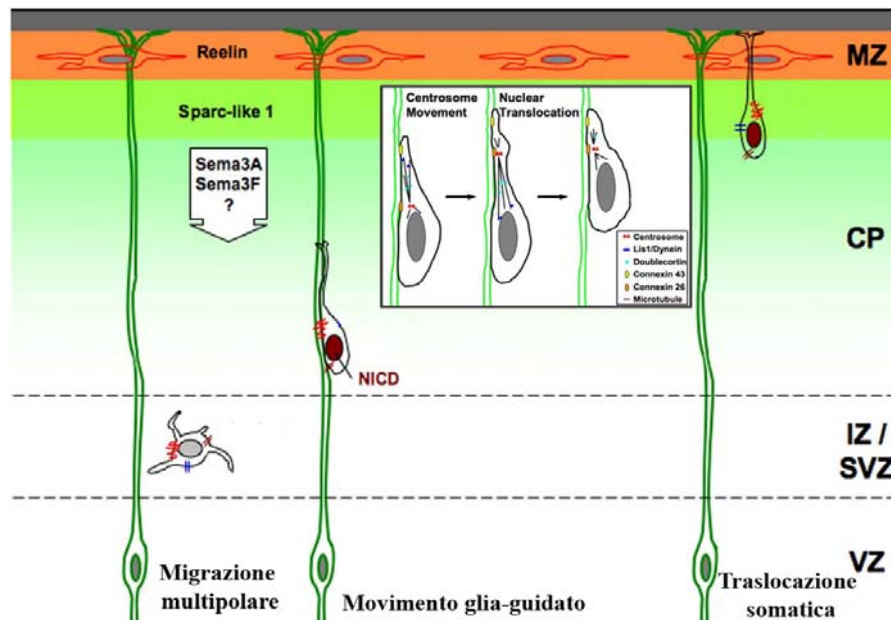


Fig. I.13. Schema illustrativo delle tre principali modalità di migrazione radiale manifestate dai neuroni piramidali. I neuroni formati nella zona ventricolare (VZ) attraversano la zona subventricolare ed intermedia (SVZ/IZ) fino a raggiungere la placca corticale (CP). La proteina Reelin, espressa nella zona marginale (MZ), regola la migrazione neuronale attraverso l'interazione con recettori espressi dai neuroni immaturi; tale interazione inibisce il turnover del dominio intracellulare di Notch che viene traslocato nel nucleo dei neuroni in migrazione. Un gradiente delle semaforine 3A (sema3A) e sema3F potrebbe regolare la direzionalità della migrazione radiale, mentre la proteina extra-cellulare SPARC-like 1 è coinvolta nel blocco della migrazione. L'insero descrive schematicamente la migrazione guidata dalla glia; brevemente, alla crescita di processi cellulari segue la traslocazione del nucleo e del corpo cellulare. Il centrosoma riveste un ruolo importante nell'associare tali eventi; il complesso Lis1/dineina è importante nell'associare i microtubuli sia alla membrana plasmatica che a quella nucleare, mentre la Doublecortin regola la dinamicità microtubulare. Le proteine di giunzione connexina 43 e 26 giocano, infine, un ruolo importante nell'interazione tra la glia radiale ed i neuroni in migrazione (modificato da Huang, 2009).

I.6 Neurogenesi nell'HIP adulto dei Mammiferi

Nell'ultimo decennio, numerosi studi hanno dimostrato la produzione attiva di nuovi neuroni in due regioni specifiche, la zona subventricolare (SVZ) del ventricolo laterale e la zona subgranulare (SGZ) del DG dell'HIP (Gage et al., 2000). I neuroni prodotti in SVZ migrano verso i bulbi olfattivi dove si differenziano in diversi tipi di interneuroni preposti al controllo delle cellule a ciuffo e di quelle mitrali (Ming e Song,

2005). Le cellule prodotte in SGZ del DG vengono, invece, incorporate nello strato molecolare, da dove inviano i propri assoni verso l'*hilus* e CA3, seguendo la via delle MF, ed i dendriti verso lo strato molecolare per ricevere informazioni dalla EC (Ming e Song, 2005). Sebbene i meccanismi che controllano la neurogenesi adulta nei due siti di origine siano diversi, sono stati individuati dei fattori comuni in grado di favorire oppure ostacolare tale processo. La neurogenesi risulta down-regolata, in particolare, dallo stress (Gould et al., 1992), dall'età (Cameron e McKay, 1999), dagli ormoni glucocorticoidi (Gould et al., 1992) e da droghe di abuso (Eisch et al., 2000), mentre è up-regolata dagli ambienti stimolanti (Kempermann et al., 1997), dall'esercizio (van Praag et al., 1999), dall'apprendimento HIP-dipendente (Shors et al., 2001), estrogeni (Tanapat et al., 1999), farmaci anti-depressivi (Malberg et al., 2000), litio e molti altri fattori.

Il significato funzionale della neurogenesi adulta non è stato ancora completamente chiarito. Gli studi finora condotti sono stati mirati, in particolare, alla comprensione del ruolo di tale processo nell'apprendimento e nella memoria, cercando di definire se la formazione di nuovi neuroni sia necessaria perché si abbia apprendimento o se siano tali processi mnemonici a stimolare la neurogenesi (Imayoshi et al., 2008; Saxe, 2006). La stragrande maggioranza degli studi di neurogenesi adulta è stata effettuata in laboratorio su topi e ratti addomesticati. Entrambe le specie mostrano una pronunciata differenza nei loro tassi basali di "neurogenesi adulta ippocampale" o AHN. L'AHN, visualizzata mediante analisi immunostochimiche, ha messo in evidenza alti tassi di proliferazione negli adulti (fino a 20000 nuove cellule al giorno) di topi selvaggi che pattugliano grandi territori, mentre bassi livelli sono stati trovati nelle arvicole rossastre e arvicole di boschi (Amrein et al., 2004). Altri studi sono stati realizzati su due specie di scoiattolo che vivono in territori di diverse dimensioni e assumono comportamenti differenti nel modo di nascondersi. In tal caso, si è osservato che lo scoiattolo con spazi ristretti e poco cibo a disposizione presenta un più basso tasso di proliferazione basale rispetto al roditore che vive in aree più grandi e con maggiore possibilità di nascondere cibo (Barker et al., 2005). Nell'HIP dei pipistrelli, invece, si evidenzia una scarsa neurogenesi, sia in quelli selvatici che in quelli da laboratorio, nonostante manifestino una precisa memoria spaziale per la sorgente di cibo (Amrein et al., 2007). Tali risultati potrebbero indicare il ruolo maggiore della neurogenesi nella memoria spaziale, episodica e contestuale che nella navigazione spaziale (Wojtowicz et al., 2008). Tuttavia, il tentativo di collegare tassi estremi di AHN con qualsiasi tipo di abilità

cognitiva HIP-dipendente pone un grosso problema, legato ai bassi livelli di AHN riscontrati nei primati in età avanzata (Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1999) e, in particolare, nell'uomo dopo i 30 anni di età (Fahrner et al., 2007). Alcuni autori hanno suggerito un'associazione tra la riduzione età-dipendente dell'AHN osservata in molte specie di Mammiferi e il cambiamento dei tratti comportamentali che caratterizza il passaggio da un atteggiamento giovanile a quello adulto. In tal contesto, risulta interessante ricordare come già in passato fosse stato ipotizzato che la maturazione della funzione ippocampale poteva corrispondere alla “trasformazione dell'incoscienza giovanile nella prudenza degli adulti” (Altman et al. 1973). Più tardi, Lipp e Wolfer (1995) hanno cercato di adattare i cambiamenti che si realizzano nel circuito ippocampale adulto ai meccanismi evolutivi. Secondo tali autori, l'alta flessibilità comportamentale durante la tarda adolescenza e nella giovane età adulta migliora la possibilità di creare nicchie ecologiche e sociali facilitando la riproduzione. In seguito al ritrovamento di tali nicchie, comunque, i cambiamenti radicali del profilo comportamentale non sono tali da aumentare il successo riproduttivo, motivo per cui i processi cerebrali che rafforzano le abitudini acquisite fanno probabilmente aumentare le soglie di un cambiamento comportamentale. La diminuzione dei livelli di AHN con l'avanzamento dell'età potrebbe riflettere la forma tardiva della stabilizzazione di uno sviluppo selettivo (Changeux e Danchin, 1976). Le reti contenenti le cellule dei granuli di nuova formazione nel DG, potrebbero formare un mosaico di canali differenzialmente attivati lungo molti anelli paralleli intraippocampali; la continua attività neuronale lungo questi canali potrebbe subire, con l'età, una down-regulation nella zona di proliferazione delle cellule dei granuli, risultando in un pattern topografico dell'attività ippocampale prevedibile e stabile. In definitiva, questo porta ad una maggiore prevedibilità delle attività che caratterizzano un comportamento adulto maturo. La progressiva scomparsa di AHN potrebbe quindi corrispondere a una forma di plasticità neuronale accompagnata da altri cambiamenti età-dipendenti, nel sistema di MF dell'HIP (Wolfer e Lipp, 1995) e in altre strutture cerebrali che controllano il comportamento quali la corteccia prefrontale.

I.7 Maturazione morfo-funzionale dei neuroni ippocampali

Le cellule progenitrici dell'encefalo embrionale e delle SVZ ed SGZ dell'encefalo adulto vanno incontro ad una serie di modifiche morfo-funzionali che porteranno alla formazione di tre distinti fenotipi cellulari: astrociti, oligodendrociti o neuroni (Gage,

2000). L'acquisizione del fenotipo neuronale richiede, in particolare, l'attivazione di set genici che attribuiscono alle cellule le proprietà dell'eccitabilità, della capacità di sintetizzare neurotrasmettitori e di formare connessioni pre- e post-sinaptiche. Sebbene il definitivo fenotipo cellulare venga determinato intorno alla prima settimana di formazione, l'attivazione funzionale segue un preciso pattern di maturazione spazio-temporale e richiede qualche settimana (Esposito et al., 2005). In tal contesto, un primo dato interessante descrive i neuroni di nuova formazione come cellule capaci di sintetizzare neurotrasmettitori e di eccitarsi (grazie all'espressione dei complessi recettoriali sulla membrana plasmatica) prima della comparsa di connessioni afferenti. In aggiunta, le connessioni GABAergiche appaiono prima di quelle Gluergiche, sia durante la neurogenesi adulta che durante lo sviluppo embrionale dei neuroni piramidali e granulari ippocampali (Gozlan e Ben Ary, 2003; Tyzio et al., 1999).

Il processo di maturazione funzionale, descritto in modo dettagliato nel DG adulto, è stato articolato in diverse fasi. Durante la prima settimana di maturazione, i neuroni di nuova formazione esprimono una minima attività elettrica pur senza ricevere alcuna afferenza sinaptica. Nella settimana successiva, i dendriti primari e privi di spine dei nuovi neuroni raggiungono lo strato molecolare interno dove ricevono afferenze di tipo GABAergico. A partire dalla quarta settimana di sviluppo, infine, i neuroni si distribuiscono in maniera definitiva e presentano spine dendritiche che raggiungono lo strato molecolare esterno. In tale stadio si assiste alla comparsa di abbondanti afferenze Gluergiche cui segue lo sviluppo di afferenze GABAergiche perisomatiche (Esposito et al., 2005). La maturazione delle connessioni GABAergiche durante l'intero processo risulta, quindi, articolato in due fasi successive. Input GABAergici di tipo lento giungono precocemente sui dendriti dei neuroni immaturi, mentre input perisomatici a cinetica rapida si attivano solo tardivamente (fig. I.14). Alcuni studi suggeriscono che la netta separazione spazio-temporale riscontrata nella maturazione delle afferenze ippocampali GABAergiche, potrebbe riflettere il ruolo di tali input nella maturazione neuronale. Secondo tale ipotesi, la trasmissione GABAergica attivata precocemente rivestirebbe un importante ruolo trofico nella maturazione cellulare (Ben Ary, 2002), mentre i più tardivi input perisomatici, coinvolti nella regolazione degli output neuronali (Freund, 2003), giocano un ruolo critico nel mantenimento dell'equilibrio eccitatorio-inibitorio in una fase in cui la trasmissione Gluergica è completamente sviluppata. Complessivamente, tali evidenze suggeriscono che lo sviluppo delle afferenze sinaptiche si realizza nell'arco di quattro settimane in base al seguente ordine:

sinapsi silenziose, afferenze GABAergiche lente, afferenze Gluergiche e afferenze GABAergiche rapide (fig. I.14; Esposito et al., 2005).

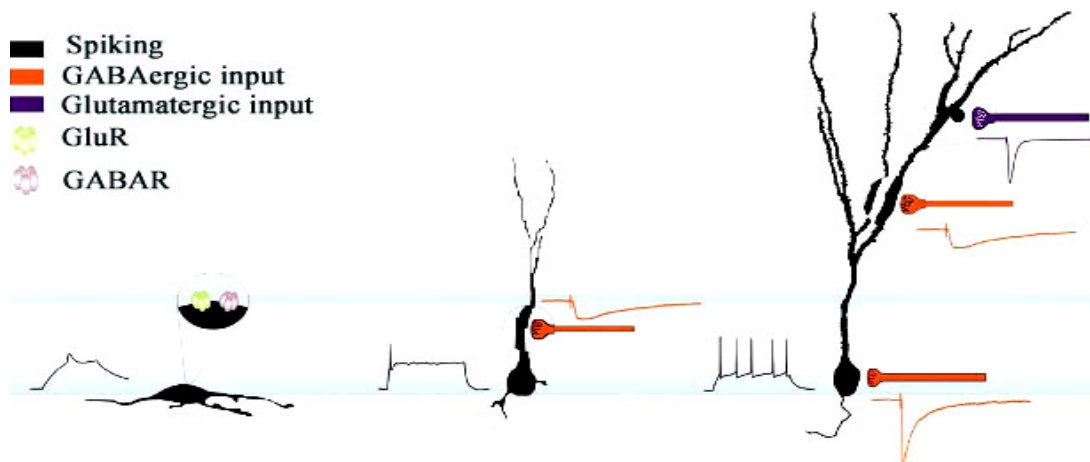


Fig. I.14. Formazione degli input GABAergici e Gluergici durante i processi di morfogenesi delle cellule dei granuli nel DG (modificato da Esposito et al., 2005).

Il processo di maturazione funzionale delle cellule dei granuli finora descritto non rappresenta in realtà una peculiarità dello sviluppo neuronale nell'encefalo adulto, ma descrive perfettamente tutti i processi che si realizzano nell'embrione. A supporto di tale teoria, Tyzio et al. (1999) dimostrarono che i neuroni piramidali dell'area CA1 nell'HIP neonatale possono essere silenziosi, manifestare un'attività GABAergica di tipo lento o ancora attività GABAergica e Gluergica; tale sequenza è stata riscontrata anche nei neuroni piramidali di CA1 nell'HIP di scimmia (Khazipov et al., 2001) e negli interneuroni della stessa area nell'HIP di ratto (Hennou et al., 2002). In aggiunta, studi neuronanatomici hanno riportato come la formazione di sinapsi GABAergiche a livello dendritico preceda quella delle sinapsi perisomatiche, supportando ulteriormente le similitudini tra lo sviluppo pre- e post-natale (Gozlan e Ben Ary, 2003). La conservazione dei meccanismi di maturazione sinaptica sottolinea fortemente la determinazione genica della stessa, escludendo il ruolo primario di una qualsiasi forma di fattori ambientali.

I.8 Funzioni ippocampali: apprendimento e memoria

Tra le funzioni cerebrali complesse, una delle più affascinanti è senza dubbio la capacità di immagazzinare le informazioni scaturite dall'esperienza e di recuperare gran parte di esse in qualsiasi momento. Con il termine apprendimento si intende il processo

attraverso cui nuove informazioni sono acquisite dal sistema nervoso, mentre con il termine memoria si intende il meccanismo di immagazzinamento e/o di richiamo di tali informazioni. Apprendimento e memoria rappresentano quindi fenomeni chiave che sottostanno a tutte quelle capacità cognitive che caratterizzano gli esseri umani.

I.8.1 Definizione di memoria

Nel corso degli ultimi decenni sono stati utilizzati diversi approcci nel tentativo di definire il concetto di memoria. Una definizione abbastanza generale indica la memoria come la conservazione delle esperienze passate per un loro utilizzo nel futuro (Oxford Advanced Learner's Dictionary) o ancora come la capacità di conservare, mantenere e recuperare le informazioni. Riferendoci al processo di conservazione di informazioni di natura diversa all'interno di sistemi biologici, è possibile distinguere diverse forme di memoria, quali la memoria neuronale, immunologica, la memoria delle piante o ancora l'affascinante memoria genetica associata ai processi evolutivi (Rensing et al., 2009).

La memoria neuronale, in particolare, può essere classificata sulla base di due diversi criteri, il criterio qualitativo ed il criterio temporale. Il criterio qualitativo comprende, sulla base della natura dei ricordi, la memoria dichiarativa o esplicita e la memoria procedurale o implicita (fig. I.15). La memoria dichiarativa è la capacità di memorizzare e richiamare alla mente informazioni che sono accessibili alla coscienza e dunque che possono essere espresse mediante il linguaggio, come ricordi di avvenimenti, immagini e suoni. In tal contesto è possibile distinguere ulteriormente una memoria episodica ed una semantica (Wang et al., 2006). Nel primo caso ci si riferisce al ricordo di eventi personalmente vissuti in un determinato momento e luogo. Esempi sono il ricordo di una mela mangiata la sera precedente, o ancora la data di un evento pubblico importante. La memoria semantica corrisponde invece al sistema utilizzato per conservare la propria conoscenza del mondo che ci circonda; esempi di tale forma sono la memoria del significato di un termine, dell'utilità di un oggetto, del suo colore o del suo odore. La memoria procedurale rappresenta, invece, la capacità di memorizzare informazioni che non sono disponibili alla coscienza, ricordi concernenti competenze ed associazioni apprese che, in generale, sono acquisite e rammentate a livello inconsapevole. Alcune forme di "memoria motoria" sono esempi di memoria implicita. Le varie forme di memoria coinvolgono distinte aree del cervello e mostrano caratteristiche diverse, poiché la memoria esplicita ha bisogno del lobo mediale temporale intatto dove risiede l'HIP, mentre le diverse forme di memoria implicita sono

integrate a vari livelli del SNC ed in particolare a livello del cervelletto, dell'AMY e della neocorteccia. Inoltre, le cinetiche d'apprendimento, il consolidamento e il richiamo delle memorie sono abbastanza differenti, in quanto la memoria implicita richiede un determinato periodo di attivazione ma può essere definitiva, mentre la memoria esplicita è più immediata e decade rapidamente in assenza di rievocazione (Kandel e Pittenger, 1999).

Accanto alla classificazione delle diverse forme di memoria definite in base alla natura delle informazioni che vengono acquisite, è anche possibile effettuare una distinzione in base alla durata, ovvero al periodo di tempo in cui rimane efficace. In tal contesto sono state identificate due forme di memoria. In un primo caso distinguiamo la memoria a breve termine (anche detta “*working memory*”), riconosciuta come la conservazione di informazioni soltanto per alcuni secondi o minuti, mentre la memoria a lungo termine coinvolge processi che garantiscono la disponibilità delle informazioni per ore, giorni e diversi anni (Rensing et al., 2009). La memoria a lungo termine può essere quindi considerata un archivio per la conservazione e l'organizzazione del materiale rielaborato dalla memoria a breve termine, presupponendo il trasferimento delle informazioni acquisite in un primo tempo ad un sistema capace di conservarle per un periodo maggiore. Tale processo richiede il coinvolgimento di diverse formazioni encefaliche oltre che il riarrangiamento dell'organizzazione sinaptica, intesa sia in termini di modificazioni persistenti dell'efficacia delle sinapsi esistenti che attraverso la formazione o distruzione delle connessioni sinaptiche.

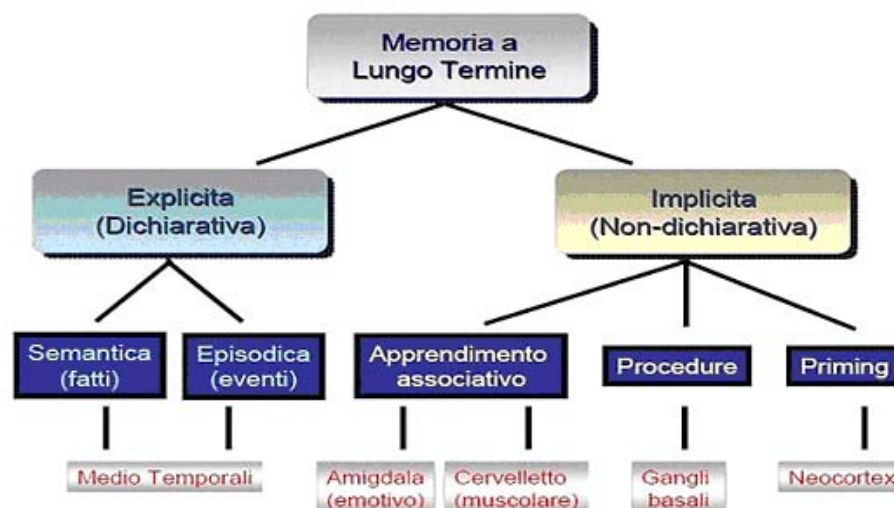


Fig. I.15. Rappresentazione schematica delle diverse forme di memoria e delle principali aree encefaliche coinvolte nella loro elaborazione.

La memoria, così come l'apprendimento, è il frutto di quattro processi diversi (Wang et al., 2006):

1. **codificazione:** processo mediante il quale nuove informazioni vengono immediatamente analizzate non appena si entra in contatto con esse; dall'efficienza della codificazione (attenzione e motivazione) dipende la qualità della conservazione della traccia mnemonica;
2. **consolidamento:** processi di modifica delle nozioni appena acquisite, ma ancora labili, in modo da renderle più stabili e di lunga durata. Il consolidamento richiede variazioni di espressione genica e la sintesi di nuove proteine;
3. **conservazione:** riguarda i meccanismi ed i siti in cui la memoria viene mantenuta per lungo tempo;
4. **recupero:** processi che consentono di richiamare alla mente un ricordo attraverso meccanismi di ricostruzione di tutte le distinte informazioni che sono state "archivate" in zone diverse della neocorteccia.

I.8.2 Il ruolo dell'HIP nella formazione della memoria

Qual è il ruolo che l'HIP riveste nei processi mnemonici? Diversi studi hanno dimostrato come la precisa organizzazione strutturale e funzionale renda l'HIP particolarmente adatto allo svolgimento di attività necessarie per alcune forme di apprendimento e memoria. A differenza delle aree corticali caratterizzate da molteplici connessioni reciproche, l'HIP presenta in primo luogo un circuito unidirezionale, come descritto in precedenza. Brevemente, le informazioni derivanti da una varietà di aree corticali uni- e polimodali raggiungono la EC e da qui sia il DG, attraverso la PP, che le aree CA1 e CA3. Le MF delle cellule dei granuli del DG raggiungono i neuroni piramidali di CA3, da dove originano le SC dirette a CA1 e alcune fibre commisurali dirette all'HIP controlaterale. Le cellule piramidali di CA1 inviano fibre sia alla EC che al S; da quest'ultimo si dipartono fibre che raggiungono ancora la EC. Infine, dalla EC le informazioni ritornano nuovamente a livello delle aree corticali che avevano fornito l'input all'HIP (Kenney e Gould, 2008). Numerosi studi hanno dimostrato che le connessioni HIP-corticali sono alla base dei processi di trasformazione della memoria a breve termine in una più stabile memoria a lungo termine (Debiec et al., 2002), in un processo in cui in seguito al completamento della fase di consolidamento HIP-dipendente, si ha il trasferimento e la conservazione a livello corticale, senza alcun contributo dell'HIP (Wiltgen et al., 2004). A supporto di ciò, prove condotte sia su

pazienti che su modelli animali hanno dimostrato come la distruzione della HF influisca principalmente sulla memoria recente (Wittenberg e Tsien, 2002), mentre lesioni della neocorteccia sembrano concorrere all'indebolimento della memoria remota (Frankland e Bontempi, 2005). In particolare, lesioni a livello di diverse parti della neocorteccia quali la PER, POR e corteccia prefrontale, possono determinare un indebolimento della fase non solo di conservazione ma anche di consolidamento della memoria (Burwell et al., 2004; Frankland et al., 2004). Particolarmente interessante risulta il ruolo della corteccia prefrontale, organizzata in più regioni interconnesse tra di loro quali il cingolo anteriore, la corteccia prelimbica ed infralimbica. Tali regioni risultano a loro volta fortemente connesse con la corteccia sensoriale, motoria e limbica, manifestando quindi la capacità di integrare informazioni provenienti da molteplici fonti (Miller, 1996). Il meccanismo di consolidamento corticale prevede che le nuove informazioni da memorizzare vengano inizialmente processate da loops HIP-corticali, nei quali l'HIP guiderebbe la co-attivazione di diverse regioni o campi corticali. Il rafforzamento della connessione diretta tra tali campi corticali sarebbe accompagnata da un graduale trasferimento dell'attività di integrazione dall'HIP verso la corteccia prefrontale. A tal proposito, alcuni studi suggeriscono come il trasferimento dell'attività integrativa dall'HIP alla COR si realizzi durante alcune fasi del sonno, quali la non-REM, attraverso una modalità definita "offline"; ciò avverrebbe attraverso piccole oscillazioni dell'impulso nervoso, inferiori ad 1 Hz (Born et al., 2006).

Numerose evidenze suggeriscono come le diverse regioni dell'HIP possano svolgere distinte funzioni mnemoniche, quali la memoria episodica, l'apprendimento spaziale, l'apprendimento contestualizzato e la memoria di lavoro (fig. I.16). In particolare, il DG sembra essere coinvolto nella rappresentazione ortogonale di input provenienti dalla EC e, in accordo con questo, lesioni in tale area determinano deficit nella codifica della memoria spaziale (Lee e Kesner, 2002) e nella capacità di differenziare nella localizzazione spaziale (Gilbert et al., 2001). Particolarmente interessante risulta il ruolo che l'area CA3 riveste nei processi di integrazione di input provenienti da diverse fonti (Kenney e Gould, 2008); tale proprietà risulta strettamente associata alle peculiarità dei neuroni piramidali qui presenti, in quanto una vasta porzione dei loro input è rappresentata da fibre collaterali che formano un esteso network auto-associativo.

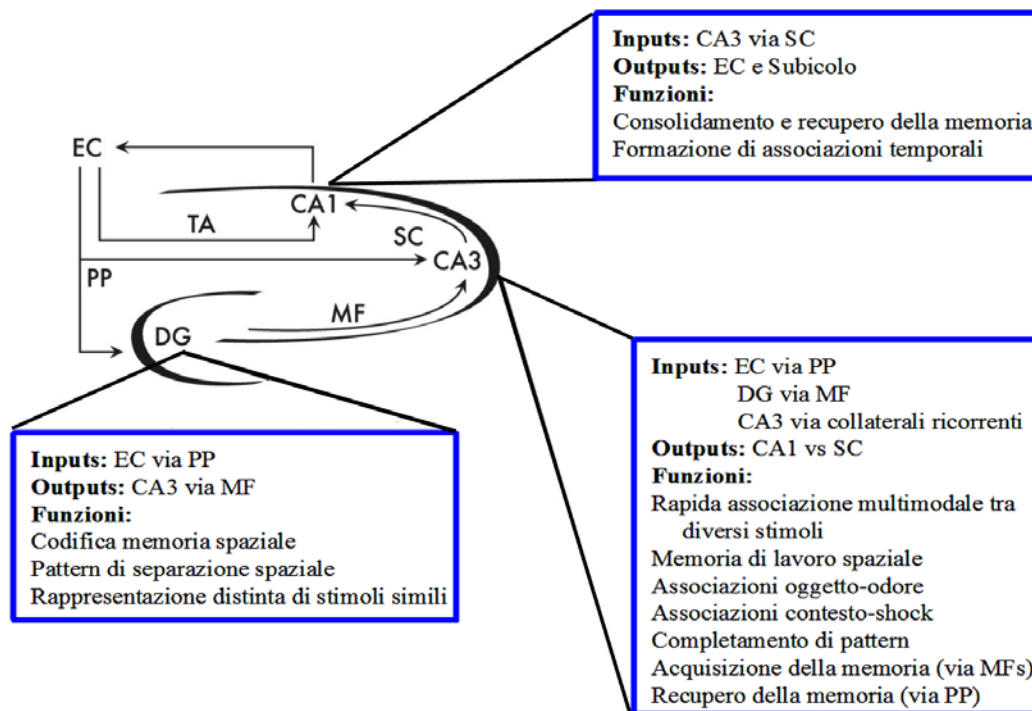


Fig. I.16. Schema riassuntivo del ruolo che tre diverse regioni ipocampali (DG, CA3 e CA1) rivestono in vari aspetti dei processi di apprendimento e memoria (EC-corteccia entorinale, DG-giro dentato, PP-via perforante, TA-via tempoammonica, M-fibre muscoidi, SC-collaterali di Schaffer; modificatola da Kenney e Gould, 2008).

In tal modo, l'area CA3 risulta ad esempio coinvolta nelle associazioni tra particolari oggetti o odori ed un determinato contesto, o ancora nell'associare un determinato contesto ad un evento traumatico (Daumas et al., 2005). Alcune evidenze suggeriscono un ruolo per CA3 anche nei processi di completamento di pattern spaziali (Gold e Kesner, 2005) oltre che nei processi di acquisizione e di recupero di una determinata memoria (Lee e Kesner, 2002). L'area CA1 riveste un ruolo altrettanto importante nel formare associazioni temporali, nel consolidamento e nel recupero della memoria. Accanto a ciò, le numerose connessioni esistenti tra l'area CA1 e le regioni corticali suggeriscono la posizione cruciale di CA1 nei processi di memorizzazione a lungo termine (Remondes e Schuman, 2004).

I.8.3 La memoria neuronale

Come si formano i ricordi, come sono codificati e memorizzati nel cervello? Il cervello non è un passivo registratore di esperienze, in cui le informazioni vengono proiettate su uno schermo mentale, ma è un sistema dinamico che crea informazione. Per elaborare e memorizzare una vita di ricordi, è richiesta una qualche forma di plasticità del cervello che va oltre ciò che notoriamente si verifica durante il primo sviluppo. Oggi si ritiene che i ricordi sono codificati come schemi dinamici spazio-

temporali di una sincronizzata attività cellulare all'interno di un'ampia diffusione di reti neurali e che questa dinamica si traduce in alterati schemi della connettività tra neuroni coattivati (Bruehl-Jungerman et al., 2007). È da tempo noto che questa attività dinamica, di natura transitoria, non può persistere abbastanza a lungo per essere l'effettivo substrato della memoria a lungo termine. In tal senso è stato postulato che esista un secondo stato di memoria codificato come cambiamento a livello cellulare per archiviare queste rappresentazioni. Un processo di stabilizzazione o consolidamento porterebbe a ciò che Hebb definì "traccia strutturale", una traccia di memoria che viene mantenuta in una sorta di stato dormiente, ma ha la capacità di tornare in uno "stato attivo" per evocare un ricordo ogni qualvolta sono disponibili delle informazioni correlate. Sebbene all'inizio si riteneva che, una volta stabilita, la memoria a lungo termine rimanesse stabile e immune da qualsiasi forma di perturbazione, nel 1979 Lewis smentì questa ipotesi. Una memoria cosiddetta stabilita o consolidata, infatti, quando riattivata entra in uno stato dinamico ma fragile, che richiede un'ulteriore stabilizzazione mediante modificazioni sinaptiche per essere ancora disponibile e ricordata, un processo oggi noto come riconsolidamento (Alberini riesaminata nel 2005). Tali considerazioni mettono in evidenza come la memoria a lungo termine non sia in realtà stabile, ma al contrario risulta controllata da un meccanismo di plasticità dinamica che continua per tutta la vita di un ricordo.

Quali sono i meccanismi di plasticità che servono per memorizzare e aggiornare la memoria a lungo termine? Ad oggi, la tesi sostenuta più diffusa è quella del rafforzamento delle sinapsi, processo che si verifica durante l'apprendimento ed in base al quale i ricordi sono stabilizzati ed archiviati come modificazioni della forza sinaptica all'interno di circuiti neuronali esistenti, come originariamente indicato da Hebb (1949). La capacità dei neuroni di subire il potenziamento sinaptico attività-dipendente è stato dimostrato nel 1973 da Bliss e Lomo, i quali per primi descrissero il potenziamento a lungo termine (LTP) nell'HIP. Accanto all'LTP, esistono anche altre forme di plasticità cerebrale ed in particolare quello più investigato è la depressione a lungo termine (LTD), una forma di rimodellamento inizialmente considerata come indebolimento di lunga durata della forza sinaptica attività-dipendente.

I sistemi di neurotrasmissione ippocampali

I sistemi GABAergico e Gluergico

E' ampiamente riconosciuto che lo sviluppo neuronale, inteso come proliferazione, migrazione e differenziamento neuronale, non rappresenta un processo embrionale ma continua a realizzarsi per tutto il corso della vita, seppur manifestando una modesta tendenza a ridursi nei soggetti anziani. In tal modo, la formazione delle diverse componenti neuronali, assone e dendriti, può essere studiata non solo in modelli di sviluppo pre-natale, ma anche e soprattutto peri-natale, in accordo con le numerose evidenze circa il coinvolgimento degli stessi meccanismi molecolari nelle due diverse fasi. Numerosissime prove suggeriscono il ruolo chiave che la trasmissione sinaptica eccitatoria riveste nella maturazione neuronale, sottolineando come questa sia mediata, in un primo momento, da complessi recettoriali di tipo GABAergico e solo successivamente dal sistema Gluergico. Ad ogni modo, già verso il termine della prima settimana di sviluppo post-natale, entrambe le correnti eccitatorie GABAergico/Gluergico-mediate cooperano per assicurare uno sviluppo normale dei neuroni. La co-esistenza di tali forme di trasmissione è mantenuta fino alla seconda-terza settimana di sviluppo, momento in cui in ciascuna regione dell'encefalo si ha uno slittamento dell'azione GABAergica da eccitatoria ad inibitoria; in questi momenti, il GABA diviene il principale neurotrasmettitore ad azione inibitoria presente nell'encefalo adulto.

II.1 Sintesi, metabolismo e secrezione del GABA

Il GABA viene prodotto attraverso una reazione di decarbossilazione dell'acido glutammico operata dall'enzima glutammico decarbossilasi (GAD), altamente specifico e la cui attività richiede la presenza del cofattore piridossal-fosfato. La distribuzione del GAD nel SNC, perfettamente sovrapponibile a quella del GABA, interessa il citoplasma delle terminazioni nervose neuronali, dove lo si ritrova in forma solubile. Il GABA, sintetizzato nel citoplasma, viene successivamente immagazzinato nelle vescicole sinaptiche presenti nella porzione terminale degli assoni grazie all'azione di un trasportatore specifico che utilizza, come fonte di energia, sia il gradiente elettrico che il gradiente chimico, presenti tra il lume vescicolare ed il citoplasma e generati dalla pompa protonica vescicolare. In seguito al suo rilascio ed al suo legame sui terminali postsinaptici, il GABA viene degradato dall'enzima GABA- α -chetoglutarico

transaminasi (GABA-T), che lo deammina a semialdeide succinica (SSA); questa viene ossidata ad acido succinico ad opera di una semialdeide-succinico-deidrogenasi (SSDH) NAD-dipendente ed entra a far parte del ciclo di Krebs. Il gruppo amminico viene trasferito da GABA-T ad una molecola di α -chetoglutarato (α KG) per formare l'acido glutammico, che viene riutilizzato per la sintesi di nuovo GABA. Numerosi studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che il rilascio di GABA può essere sia spontaneo che legato a stimolazione nervosa e, in quest'ultimo caso, opera un meccanismo calcio (Ca^{2+})-dipendente. È noto come, sebbene esistano molteplici proteine trasportatrici (GAT-1, GAT-2, GAT-3 e BGT-1) preposte alla rapida rimozione del GABA dallo spazio sinaptico sia livello delle terminazioni nervose GABAergiche che sulle cellule gliali, il mantenimento delle basse concentrazioni di GABA negli spazi extracellulari è dovuto soprattutto all'attività di tali trasportatori sulle cellule gliali (Paoletti et al., 2004).

Distribuzione dei neuroni GABAergici a livello dell'ippocampo

È stato dimostrato che la distribuzione del GABA e della GAD non è uniforme all'interno del SNC, con concentrazioni massime a livello della *substantia nigra* (SN), nel *globus pallidus*, nell'ipofisi, nei corpi quadrigemini, nella corteccia cerebrale e nell'HIP, e concentrazioni minori caratteristiche di ponte e bulbo. La presenza del GABA è stata riscontrata anche nei bulbi olfattivi, nell'eminenza mediana e nelle regioni ipotalamiche del nucleo arcuato e del nucleo paraventricolare (PVN). I neuroni GABAergici presenti nello striato danno origine alla via GABAergica striato-nigrale, che ha la sua origine nel nucleo caudato e nel *globus pallidus* e proietta alla SN. Da questa prendono, invece, origine le vie nigro-collicolare e nigro-talamica, che dalla *pars reticulata* proiettano agli strati profondi del collicolo superiore e ai nuclei ventromediale, medio-dorsale ed intralaminare del talamo, e la via nigro-tegmentale, che proietta al tegmento ponto-mesencefalico. Nel cervelletto, il GABA è presente principalmente a livello dello strato delle cellule del Purkinje e a livello dei nuclei profondi, dove proiettano gli assoni GABAergici delle cellule del Purkinje stesse; elevate concentrazioni di GABA caratterizzano, inoltre, le cellule basket e stellate, con cui le cellule del Purkinje contraggono collegamenti sinaptici, e nelle cellule del Golgi di tipo II che sono in contatto sinaptico con i dendriti delle cellule granulari (Paoletti et al., 2004).

In riferimento all'HIP, numerosi studi hanno portato alla definizione di 9 marker specifici per l'identificazione di altrettanti tipi di neuroni GABAergici: decarbossilasi 67 dell'acido glutammico (GAD67), 3 proteine che legano il calcio Ca^{2+} [parvalbumina (PV), calretinina (CR) e calbindina D28K (CB)], 4 neuropeptidi [neuropeptide Y (NPY), somatostatina (SOM), colecistochinina (CCK) e proteina intestinale vasoattiva (VIP)] e l'ossido nitrico sintasi (NOS; Jinno e Kosaka, 2006). A livello dell'HIP si riscontra una distribuzione pressochè omogenea che interessa tutti gli strati sia della porzione dorsale (DH) che di quella ventrale (VH). Nell'area CA1 dorsale, in particolare, il 24% dei neuroni GAD67 è localizzato nello SLM, il 17% nello SR, il 32% nello SP e il 27% nello SO; tale pattern di distribuzione laminare è mantenuto nella regione CA3. Nel DG, al contrario, la maggior parte delle cellule positive a GAD67 è localizzata nello strato delle cellule granulari. In aggiunta, nella maggior parte delle aree si riscontra una densità più alta a livello ventrale che non a livello dorsale. Shi et al. (2004), attraverso un confronto diretto della densità delle diverse classi neuronali negli encefali di topo e di ratto, hanno dimostrato che a livello dell'HIP la densità dei neuroni principali è più alta negli encefali di piccole dimensioni, mentre la densità dei neuroni GABAergici, in numero ridotto rispetto a quello delle cellule principali, risulta paragonabile al variare delle dimensioni encefaliche. Tali osservazioni suggeriscono l'esistenza di diversi meccanismi di omeostasi encefalica, volta al mantenimento dell'equilibrio tra eccitazione ed inibizione (Jinno e Kosaka, 2006). Un'altra classe di neuroni GABAergici caratterizzata dall'espressione della PV si identifica principalmente con le cellule basket e le cellule asso-assoniche, sebbene studi recenti dimostrano la presenza di tale proteina anche nelle altre cellule che occupano lo spazio tra lo SO e lo SLM (Klausberger et al., 2003; Ferraguti et al., 2004) oltre che nelle cellule bi-stratificate (Klausberger et al., 2003). I neuroni GABAergici positivi alla CR, coinvolti nel controllo funzionale di altri neuroni GABAergici, danno origine alle MF dell'*hilus* nel VH dei topi, ma non dei ratti. Gli interneuroni che esprimono la CB, al contrario, sono distribuiti nelle cellule granulari del DG e in un sottogruppo dei neuroni piramidali di CA1, da dove forniscono sinapsi sui dendriti distali delle cellule principali esercitando un controllo sugli input afferenti (Jinno e Kosaka, 2006). Molti studi suggeriscono l'esistenza, all'interno dei neuroni GABAergici, di neuropeptidi in grado di agire come neurotrasmettitori o neuromodulatori. I neuropeptidi SOM, NPY, CCK e VIP si trovano, ad esempio, principalmente nei neuroni GABAergici, sebbene la CCK sia stata riscontrata anche in

alcuni sottogruppi di neuroni non-GABAergici nell'HIP di topo (Jinno e Kosaka, 2003). La maggior parte dei neuroni GABAergici positivi alla SOM, in particolare, si identifica con le cellule inibitorie dendritiche, quali, ad esempio, gli interneuroni presenti all'interfaccia SO/*Alveus* (Alv) con arborizzazioni assoniche che raggiungono lo SLM e neuroni associati alla PP dell'*hilus*. In aggiunta, la maggior parte delle cellule che forniscono proiezioni HIP-setto, risultano positive alla SOM (Jinno e Kosaka, 2003). Studi recenti dimostrano l'espressione del NPY nelle cellule bi-stratificate (Klausberger et al., 2003). I neuroni GABAergici positivi alle CCK possono essere classificati sulla base delle caratteristiche morfologiche in vari sottogruppi, quali le cellule basket, le cellule associate alle SC, le cellule associate alla PP, le cellule bi-stratificate (Cope et al., 2005). Nell'HIP, una grande quantità di neuroni GABAergici, le cui caratteristiche anatomiche e funzionali non sono ancora note, esprimono, inoltre, la NOS. È interessante il fatto che anche alcuni neuroni piramidali di CA1 presentano una debole immunoreattività verso la NOS. Sebbene la densità assoluta dei neuroni GABAergici non presenta variazioni significative a livello ippocampale, specifici gradienti dorso-ventrali riguardano, invece, la distribuzione dei vari sottogruppi neuronali. Nell'area CA1, ad esempio, gradienti dorso-ventrali opposti sono riscontrati nello SO e in quello SP.

II.2 Caratteristiche molecolari e funzionali dei recettori GABAergici

Il GABA rappresenta il principale neurotrasmettitore ad azione inibitoria presente nel SNC, dove esplica le proprie azioni attraverso l'interazione con tre distinti sottotipi recettoriali: i GABA_ARs (Olsen e Sieghart, 2008) e GABA_CRs ed il GABA_BRs (Pirker et al., 2000; Olsen e Sieghart, 2008). L'azione inibitoria rapida del GABA, in particolare, è mediata dall'attivazione dei GABA_ARs a livello encefalico (Sieghart e Sperk, 2002; Rudolph e Mohler, 2004) e dei GABA_CRs a livello della retina (Bormann e Feigenspan, 1995), mentre la componente lenta e prolungata della trasmissione GABAergica è mediata dai GABA_BRs (Bettler e Tiao, 2006). I GABA_ARs ed i GABA_CRs sono permeabili agli ioni cloro (Cl⁻) e bicarbonato (HCO₃⁻; Farrant e Kaila, 2007; Trigo et al., 2008), per cui la loro attivazione determina l'iperpolarizzazione del neurone; al contrario, i GABA_BRs determinano l'attivazione a valle di diversi sistemi effettori che dipendono dalla specifica proteina G cui risultano essere accoppiati.

II.2.1 GABA_BRs

I GABA_BRs appartengono alla famiglia dei recettori metabotropici accoppiati alle proteine G e sono costituiti dalle due subunità GABA_B(1) (GB1), presente nelle due isoforme GABA_B(1a) e GABA_B(1b), e GABA_B(2) (GB2), le quali si assemblano in modo omo- o etero-dimerico a formare un recettore funzionale (Bettler et al., 2004). Numerosi studi indicano un ruolo diverso per ciascun tipo recettoriale ed, in particolare, mentre gli autorecettori GABA_B presinaptici provvedono al controllo inibitorio del rilascio di GABA, gli eterorecettori presinaptici sono preposti al controllo del rilascio di altri neurotrasmettitori, quali il Glu, attraverso un comune meccanismo di azione che prevede la riduzione della conduttanza al Ca²⁺ (Galanopoulou, 2008). L'attivazione dei GABA_BR postsinaptici determina, invece, un incremento della conduttanza al potassio (K⁺) attraverso l'apertura di specifici canali detti "*inwardly rectifying*" o GIRKs, responsabili di una prolungata iperpolarizzazione neuronale. Tutti i recettori sono inoltre sensibili all'azione dell'agonista selettivo baclofen. In tal modo, mentre i GABA_ARs ed i GABA_CRs sono responsabili della componente rapida della trasmissione sinaptica inibitoria a livello encefalico, i GABA_BRs mediano, al contrario, la componente lenta. È importante sottolineare come l'esistenza di omo- ed eterorecettori in grado di mediare diverse azioni sia stato proposto sulla base della possibilità di modulare una o l'altra attività, attraverso l'utilizzo di ligandi specifici per il GABA_BR (Cunningham e Enna, 1996). I GABA_BRs rappresentano l'unico esempio di recettore metabotropico nel quale solo la subunità GB1 contiene il sito di legame per il ligando, mentre l'accoppiamento ai sistemi effettori intracellulari è mediato dalla subunità GB2; in tal modo, l'inattivazione casuale di una delle due subunità comporterà in ogni caso l'eliminazione dell'azione del GABA_BR (Gassmann et al., 2004; Thuault et al., 2004).

II.2.2 GABA_ARs

La maggior parte delle funzioni esplicate dal GABA a livello del SNC sono mediate dall'attivazione dei GABA_ARs, altamente sensibili all'azione di ligandi specifici quali muscimol e bicucullina. I GABA_ARs presentano un'ampia distribuzione che interessa sia il SNC che particolari organi periferici; moderati livelli di GABA_ARs sono stati, ad esempio, riscontrati nel pancreas (Borboni et al., 1994), dove sia la funzione che il potenziale farmacologico recettoriale non sono ancora noti (Olsen e Sieghart, 2008). L'abbondanza dei GABA_ARs è in accordo con il ruolo che essi rivestono nella

regolazione di svariate funzioni fisiologiche, suggerendo quindi la possibilità di usarli come target di numerose classi di farmaci (Hevers e Luddens, 1998; Olsen e Homanics, 2000). A tal proposito, è stato dimostrato che l'azione inibitoria rapida del GABA mediata dai GABA_ARs risulta essenziale oltre che per la modulazione dell'eccitabilità encefalica (Olsen e Avoli, 1997; Fritschy et al., 1999), anche per il controllo degli stati d'ansia (Nutt et al., 1990; Pratt, 1992), della fame e della sete, del ritmo circadiano e della cognizione, della vigilanza, della memoria e dell'apprendimento (Izquierdo e Medina, 1991).

Il GABA_AR (fig. II.1) è rappresentato da un canale ionico eteropentamerico che, insieme ai recettori nicotinici dell'acetilcolina (Corringer et al., 2000; Lukas e Bencherif, 2006), della glicina (Gly; Breitinger e Becker, 2002), della serotonina (Ser; Davies et al., 1999; Thompson e Lummis, 2006) ed al canale ionico attivato dallo zinco (Zn²⁺; Davies et al., 2003) rientrano a far parte della superfamiglia dei canali ionici attivati dal ligando (LGIC).

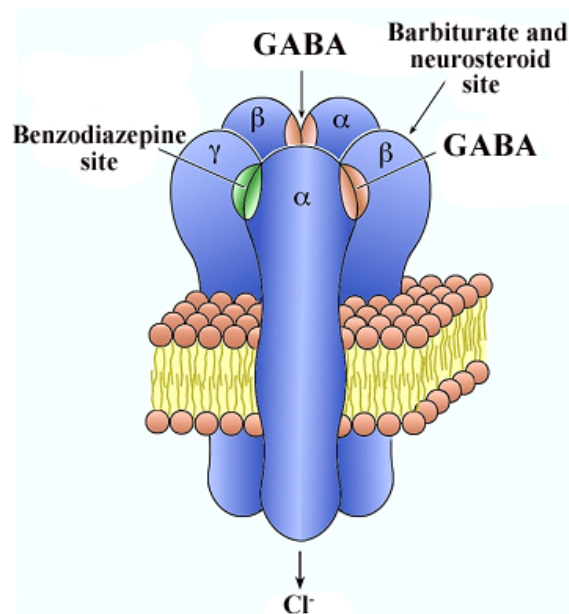


Fig. II.1. Schematizzazione del recettore GABA_A.

In particolare, mentre i recettori per l'acetilcolina e per la Ser, così come quelli attivati dallo Zn²⁺, sono canali selettivi per cationi e, quindi ad azione eccitatoria, il GABA_AR e quello della Gly sono selettivi per anioni per cui mediano un'azione inibitoria (Olsen e Sieghart, 2008). Nonostante il diverso ruolo funzionale, tutte le subunità che

caratterizzano i membri di questa superfamiglia presentano un'omologia di sequenza pari al 30%, responsabile dell'alta similarità riscontrata nelle strutture secondarie e terziarie delle proteine (Collingridge et al., 2009). Tutti i recettori appartenenti a questa famiglia sono organizzati in complessi pentamerici che attraversano la membrana plasmatica, con un poro centrale attraverso cui lo ione può transitare. Numerosi studi hanno dimostrato l'esistenza di diversi sottotipi dei GABA_AR che, nei Mammiferi, nascono dalla combinazione di 20 subunità codificate da altrettanti geni, quali 1-6 α , 1-3 β , 1-3 γ , δ , ϵ , π , θ e 1-3 ρ (Sernagor et al., 2010). Di tutte le subunità descritte, 17 sono espresse nel GABA_AR (Barnard et al., 1998; Costa et al., 2002; Sieghart e Sperk, 2002; Jin et al., 2004; Mohler et al., 2006; Trigo et al., 2008; Olsen e Sieghart, 2009), mentre le restanti subunità ρ rientrano nella costituzione del GABA_CR a livello retinico e si distinguono dalle precedenti in quanto responsabili della formazione di un complesso recettoriale insensibile alla bicucullina (Barnard et al., 1998; Bormann, 2000; Chebib e Johnston, 2000; Johnston, 2002); i GABA_CR, a differenza dei GABA_AR, sono inoltre sensibili ad un analogo del GABA, l'acido cis-aminocrotonico (CACA). Sia negli Uccelli che in altre specie mancano le subunità θ e ϵ , sostituite nel complesso recettoriale dalle subunità β_4 e γ_4 ; tale sostituzione probabilmente è da associare all'elevata omologia di sequenza esistente tra le subunità ϵ e γ e tra θ e β (Olsen e Sieghart, 2008). Tutte le subunità del GABA_AR sono costituite da un grosso dominio N-terminale (ATD) idrofilico nella porzione extracellulare, da quattro domini transmembrana ad α -eliche (M1-M4) N-glicosilati di circa 220 aminoacidi (aa), un grosso loop nella porzione intracellulare tra il terzo e il quarto dominio transmembrana (M3 e M4) ed infine un breve dominio C-terminale extracellulare (Costa et al., 2002). Il dominio M2 forma il rivestimento del canale ionico, con un piccolo contributo anche di M1 (Corringer et al., 2000; Sine e Engel, 2006; Olsen e Sieghart, 2009), mentre il dominio ad α -elica presente all'interno del loop citoplasmatico M3-M4 sembra influenzare la conduzione ionica (Peters et al., 2005). Accanto all'elevata omologia riscontrata tra i membri di questa superfamiglia in riferimento ai domini di membrana è stato evidenziato anche un elevato grado di conservazione di specifici domini funzionali, quali le regioni che contengono i siti di legame (Corringer et al., 2000; Olsen e Sawyer, 2004; Sine e Engel, 2006) del GABA o di altri ligandi. I domini M2, in particolare, sono coinvolti nella definizione della struttura del canale e nella selettività ionica (Keramides et al., 2004), mentre in corrispondenza dei domini extracellulari delle cinque subunità sono state identificate 5 tasche. Due tasche sull'interfaccia β/α

formano il sito di legame per il GABA, mentre la tasca sull'interfaccia α/γ forma il sito di legame per le benzodiazepine (BZD). La tasca che accoglie il GABA è formata dai cosiddetti “loops” A, B e C sul versante β^+ (“principale”) e dai “loops” D, E e F sul versante α^- (“complementare”); Ernst et al., 2003). In aggiunta, i residui aminoacidici responsabili della specificità di tale legame manifestano un elevato grado di omologia non solo con gli stessi siti degli altri componenti della superfamiglia, ma anche con i siti di legame per altri ligandi, quali le BZD (Corringer et al., 2000). A supporto di ciò, il sito di legame per le BZD, localizzato sull'interfaccia β/α , presenta omologhi “loops” indicati come A, B e C su α^+ e D, E e F su γ^- (Ernst et al., 2003).

La maggior parte dei GABA_ARs nasce dall'assemblaggio di due subunità α , due β e una γ (in particolare γ_2) o una δ , le cui varianti si combinano in modo da creare GABA_ARs farmacologicamente definiti (Mohler, 2006). Le subunità α_1 , β_1 , β_2 , β_3 e γ_2 presentano una distribuzione ubiquitaria (Pirker et al., 2000), a livello centrale, mentre le subunità α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , γ_1 e δ sono confinate in specifiche regioni della formazione encefalica. Le subunità cosiddette “minori”, quale la subunità δ , sostituiscono spesso la subunità γ nel pentamero, come ad esempio nella combinazione $\alpha_2/\beta_2/\delta$ (Barrera et al., 2008). In aggiunta, la subunità δ presenta in alcune aree, quali talamo e SM del DG, una co-distribuzione con la subunità α_4 , mentre a livello cerebellare si presenta in associazione con la subunità α_6 (Pirker et al., 2000). Numerosi studi hanno dimostrato, inoltre, che i recettori contenenti la subunità δ comprendono anche le subunità β (Jechlinger et al., 1998; Polti et al., 2003) e possono avere una localizzazione sia perisinaptica che extrasinaptica (Peng et al., 2002; Wei et al., 2003). La subunità γ_2 , d'altra parte, risulta indispensabile per l'assemblaggio del complesso recettoriale a livello sinaptico, attraverso un'interazione specifica con la proteina sinaptica geferina.

Organizzazione dei geni per le subunità del GABA_AR

Gran parte dei geni codificanti per le diverse subunità GABA_Aergiche sono organizzati in gruppi del tipo β - α - α - γ e β - α - γ su vari cromosomi. Studi condotti su diverse ricostruzioni di alberi filogenetici suggeriscono l'organizzazione dei geni del recettore GABA_A in clusters derivati da eventi di duplicazione genica a partire da un singolo gruppo di geni ancestrali β - α - γ (Russek, 1999). Nell'uomo in particolare sono descritti 4 gruppi di geni che codificano per le subunità del GABA_AR; i geni delle subunità β_1 - α_4 - α_2 - γ_1 sono localizzati sul cromosoma 4p14-q12 (Russek, 1999), mentre i geni delle subunità β_1 e α_4 , separati da meno di 60 kb, sono arrangiati in un

orientamento testa-testa (Russek, 1999). Analogamente, il gruppo di geni codificanti per le subunità α_2 , α_4 e β_1 risulta altamente espresso nella HF di ratto adulto, indicando il ruolo di tale organizzazione genica nel garantire una trascrizione genica regione-specifica (Steiger e Russek, 2004). I geni che codificano per altre subunità del GABA_AR sono presenti, ad esempio, nel gruppo β_2 - α_6 - α_1 - γ_2 sul cromosoma 5q31.2-q35 (Russek, 1999); all'interno di tale gruppo, i geni per le subunità β_2 e α_6 sono separati da meno di 60 kb, ed orientati in direzione opposta (Russek, 1999). Il gruppo β_3 - α_5 - γ_3 per il recettore GABA_A, mappato sul cromosoma 15q11-q13 (Russek, 1999), al contrario, non sembra contenere geni codificanti per altre subunità α , fatta eccezione per la α_5 . Similmente a quanto riportato per il gruppo precedente, anche qui i geni per le subunità β_3 e α_5 sono orientati in maniera opposta (Russek, 1999), mentre l'unità trascrizionale del gene per la subunità γ_3 si trova esternamente ai primi due (β_3 e α_5). Un ulteriore gruppo localizzato sul cromosoma Xq28, comprendente i geni che codificano per le subunità θ - α_3 - ϵ , presenta un'organizzazione simile al gruppo localizzato sul cromosoma 15 (Russek, 1999). I geni per la subunità θ sono, infatti, analoghi a quelli per la subunità β , mentre quelli per la subunità ϵ hanno lo stesso orientamento trascrizionale dei geni che codificano per le subunità γ (Steiger e Russek, 2004).

L'esistenza di varianti di splicing alternativo è stata dimostrata solo per alcune subunità, quali γ_2 e $\beta_{2/3}$; le isoforme della subunità γ_2 differiscono per un frammento di 8 aa che contiene un sito di fosforilazione per la proteina chinasi C (PKC), presente a livello del secondo loop intracellulare dell'isoforma lunga γ_2L ed assente in quella breve γ_2S . Entrambe le isoforme sono espresse a livello di diverse aree encefaliche secondo un rapporto che varia con l'età (Olsen e Sieghart, 2008), sebbene presentino una diversa affinità per le BDZ. Analogamente, le isoforme ottenute da fenomeni di splicing alternativo dei geni per $\beta_{2/3}$ contengono siti di fosforilazione riconoscibili da un enzima specifico. Numerosi studi hanno, inoltre, messo in evidenza l'esistenza di siti d'inizio diversi per la trascrizione dei geni codificanti per α_4 , β_2 , ϵ e ρ_1 (Simon et al., 2004).

Pattern di distribuzione delle subunità GABA_Aergiche nell'encefalo adulto

L'elevata eterogeneità delle subunità che costituiscono i GABA_ARs ha spesso portato a credere erroneamente che potesse esistere un numero elevatissimo di complessi recettoriali con altrettanti diversi profili farmacologici. Numerosi studi hanno invece dimostrato come solo un numero ridotto di combinazioni tra le diverse subunità

sia effettivamente riscontrabile a livello cellulare, e il numero si riduce se si considerano le combinazioni funzionali. In particolare, recenti evidenze suggeriscono come recettori pienamente funzionali solo 11 sottotipi; ad essi si aggiungono 6 combinazioni per le quali vi sono forti evidenze, 8 combinazioni che probabilmente tederebbero a formarsi senza divenire attivi ed un sottotipo contenente due subunità α , per un totale complessivo di 26 tipologie (Olsen e Sieghart, 2009). I sottotipi recettoriali che si riscontrano in ciascuna area encefalica sono inoltre strettamente associati alla distribuzione delle distinte subunità nelle stesse aree.

Distribuzione dei sottotipi recettoriali GABA_Aergici nell'ippocampo

La scoperta di correnti inibitorie postsinaptiche cineticamente e farmacologicamente distinte nelle cellule piramidali dell'HIP ha portato a suggerire l'esistenza di diversi sottotipi recettoriali GABA_Aergici a livello postsinaptico (Maccaferri et al., 2000; Thomson et al., 2000). La maggior parte delle subunità GABA_Aergiche è stata riscontrata, sia a livello somatico che dendritico, sui neuroni piramidali ippocampali, sebbene vi siano differenze di ordine funzionale. In tal contesto, una prima importante differenza riguarda la distribuzione della subunità α_2 , ristretta all'albero dendritico, e quella delle subunità α_3 o α_5 , localizzate sulle numerose spine, suggerendo come ogni variante della subunità α sia in effetti in grado di trasferire informazioni specifiche legate alla sua particolare localizzazione subcellulare (Brünig et al., 2002). Le subunità α_6 e δ rappresentano invece sottotipi recettoriali extrasinaptici in grado di mediare una forma di inibizione tonica sia a livello cerebellare che nelle cellule granulari del DG (Brickley et al., 1999, 2001; Mody e Nusser, 2000). Recettori extrasinaptici sono stati riportati anche nelle cellule piramidali di CA1 e CA3, con una composizione in subunità pressochè paragonabile. Da un punto di vista funzionale, i recettori extrasinaptici presentano generalmente un'elevata affinità per il GABA con una bassa cinetica di desensibilizzazione, rivestendo quindi un ruolo importante come "sensori" del GABA riversato a livello sinaptico (Brünig et al., 2002). In riferimento alla diversa distribuzione dei recettori a livello sinaptico o extrasinaptico, è stata dimostrata una distribuzione di questi ultimi abbastanza diffusa, che si oppone alla tipica organizzazione raggruppata dei recettori nei siti sinaptici; recettori con una composizione in subunità identica possono, inoltre, distribuirsi secondo un pattern che dipende dal tipo cellulare considerato. Ad esempio, così come le subunità α_1 , α_2 e α_3 rientrano nella costituzione di GABA_ARs sinaptici ed extrasinaptici in tipi cellulari

diversi, la subunità α_5 contribuisce principalmente, ma non selettivamente, alla formazione dei recettori extrasinaptici nelle cellule piramidali. Diversi studi hanno dimostrato la presenza di α_5 anche nei dendriti delle cellule piramidali di CA1 (Serwanski et al., 2006). Per quanto concerne la subunità α_3 , anche la sua localizzazione sinaptica/extrasinaptica risulta cellula-specifica; nelle cellule “fire-ball” e nelle cellule con dendriti arborizzati la subunità α_3 rientra nei recettori extrasinaptici, mentre nelle piccole cellule multipolari appare spesso legata ad una proteina di ancoraggio postsinaptico per i GABA_ARs (geferina). Secondo tale principio, la subunità α_3 forma recettori postsinaptici nei neuroni del *nucleus reticular* talamico (Baer et al., 1999) e nel Cb (Sassoè-Pognetto et al., 2000), ma recettori extrasinaptici nei neuroni corticali in fase di sviluppo (Hutcheon et al., 2000) e nell’oliva inferiore (Devor et al., 2001).

L’esistenza di GABA_ARs presinaptici è stata dimostrata a livello ippocampale in seguito all’applicazione di muscimol, responsabile della stimolazione del sito del GABA con conseguente attivazione recettoriale. L’applicazione del muscimol in prossimità delle terminazioni assoniche delle MF determina, infatti, una variazione dell’eccitabilità (Ruiz et al., 2003) che si associa ad una variazione della concentrazione sia di Cl⁻ che di Ca²⁺ all’interno del terminale sinaptico (Trigo et al., 2008). Alcuni studi riportano che stimolazioni extracellulari ripetitive dell’HIP si accompagnano ad un incremento del rilascio di GABA a livello di CA3, così come ad una maggiore attività delle MF nell’HIP di ratti giovani, ma non di quelli adulti (Nakamura et al., 2007). Questi risultati confermano che i GABA_ARs presinaptici hanno la capacità di modulare l’eccitabilità delle MF in risposta all’attività ippocampale, anche se non è ancora stato chiarito il loro effetto inibitorio o eccitatorio. L’applicazione di basse concentrazioni di muscimol aumenta le correnti post-sinaptiche eccitatorie (EPSC) nelle sinapsi CA3-CA1 attraverso un aumento sia dell’eccitabilità che della probabilità di rilascio dai terminali di CA3, suggerendo in tal modo la presenza dei GABA_ARs presinaptici nelle cellule piramidali di CA3 (Jang et al., 2005). Complessivamente, la trasmissione GABA_Aergica a livello ippocampale coinvolge solo un determinato set di recettori che nascono dall’assemblaggio delle subunità α_1 , α_2 , α_4 , α_5 , β_1 , β_2 , β_3 e γ_2 , distribuiti in maniera eterogenea nelle diverse aree ippocampali. A livello degli SO e SR delle aree CA1 e CA3, in particolare, si riscontra un’elevata espressione delle subunità α_1 , β_2 e γ_2 a livello dendritico. Solo una debole espressione delle subunità β_1 e δ è rilevata, al contrario, nelle cellule piramidali e granulari, mentre

elevati livelli di α_2 , α_4 e δ sono caratteristici dello SM del DG. A tale livello sono moderatamente espresse anche le subunità α_1 , β_1 , β_2 , β_3 e γ_2 , mentre solo una bassissima espressione è stata riscontrata per α_3 (Sperk et al., 1997). In riferimento alla distribuzione di tali recettori a livello dell'HIP, una prima importante differenza interessa i sottocampi CA1-3. Un'elevata espressione della subunità α_5 è stata riscontrata in CA1, in associazione con la subunità β_3 altamente espressa anche in CA3; al contrario, in CA2 si riscontra un'elevata espressione della subunità β_2 , moderatamente espressa, invece, nelle altre regioni (Sperk et al., 1997). Un diverso pattern di espressione caratterizza il complesso subiculare, dove elevati valori di espressione sono rilevati per le subunità α_1 e β_2 . Di recente è stata dimostrata l'esistenza di un gradiente di distribuzione dei diversi recettori GABA_Aergici lungo l'asse dorso-ventrale dell'HIP. Nella regione CA1 l'espressione dell'mRNA per le subunità α_1 , β_2 , γ_2 risulta infatti essere bassa, mentre l'espressione degli mRNAs per le subunità α_2 e β_1 appare significativamente più alta nel VH che non nel DH. Dal momento che le combinazioni riscontrate maggiormente nell'HIP sono α_1/β_2 e α_2/β_1 (Ramadan et al., 2003), è possibile suggerire una distribuzione differenziale per i sottotipi del GABA_AR $\alpha_1/\beta_2/\gamma_2$ e $\alpha_2/\beta_1/\gamma_2$ tra i due poli ippocampali, ed in particolare, mentre i recettori contenenti α_1 dominano nella parte dorsale, quelli con la subunità α_2 prevalgono nella parte ventrale. In aggiunta, una bassa espressione dei GABA_AR di tipo $\alpha_4/\beta_3/\delta$ è stata riscontrata nel DG così come nelle altre aree ventrali dell'HIP. Analisi condotte sulla distribuzione cellulare delle subunità GABA_Aergiche hanno dimostrato che i recettori contenenti α_2 , localizzati prevalentemente sul segmento iniziale dell'assone e sul soma, ricevono gli impulsi inviati dalle cellule a candelabro e dalle cellule basket esprimenti la CCK (Nyiri et al., 2001), mentre i GABA_AR contenenti la subunità α_1 a livello somatico ricevono impulsi dalle cellule basket positive alla PV e sono maggiormente espressi negli strati dendritici di CA1 (Brunig et al., 2002).

Maturazione funzionale dei GABA_ARs

Lo sviluppo postnatale della maggior parte delle aree encefaliche è caratterizzato da processi di maturazione morfo-funzionale dei circuiti neuronali che forniranno il preciso pattern di connessioni sinaptiche tipico dell'encefalo adulto. Numerosi studi hanno dimostrato l'importanza del sistema GABAergico per tali processi di maturazione, in una fase in cui la neurotrasmissione da esso mediata risulta ancora di natura eccitatoria (Ben-Ari, 2002; Meier et al., 2003; Schlesinger et al., 2004). L'azione

depolarizzante GABA_Aergica nei neuroni immaturi determina l'attivazione dei canali per il Ca²⁺, con conseguente aumento della concentrazione intracellulare di Ca²⁺ ed innesco delle diverse cascate di segnali sensibili a tale ione (Ben-Ari, 2002). I numerosi processi regolati da tali pathways comprendono la sintesi del DNA, la proliferazione, la migrazione ed il differenziamento cellulare, così come la crescita sinaptica ed integrazione neuronale. La completa maturazione della trasmissione GABAergica come principale sistema di neurotrasmissione ad azione inibitoria si realizza solo in una fase successiva dello sviluppo postnatale, legata anche alla particolare area encefalica considerata.

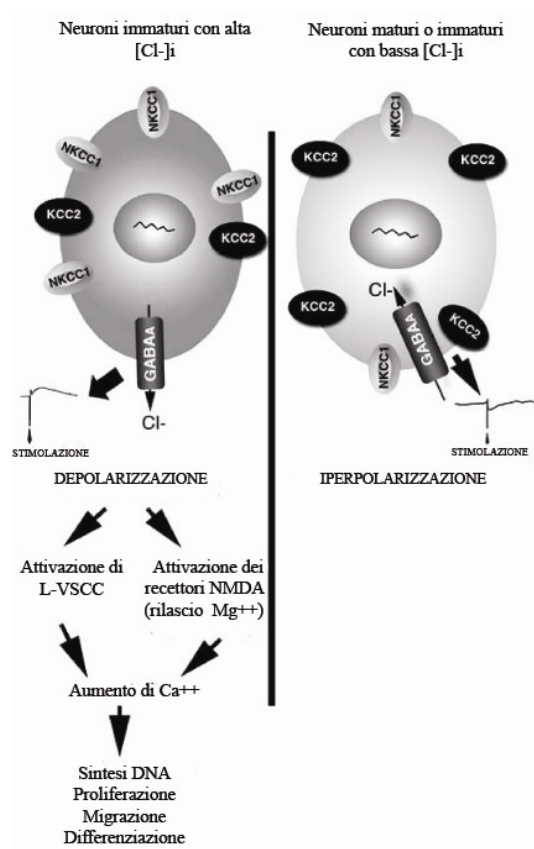


Fig. II.2. Lo switch dello sviluppo del trasportatore del Cl⁻ guida lo switch funzionale del recettore GABA_A dalla depolarizzazione all'iperpolarizzazione (Galanopoulou, 2008).

Diversi studi hanno dimostrato come tale conversione si realizzi al termine della seconda settimana di sviluppo postnatale a livello ippocampale (Romo-Parra et al., 2008). I molteplici meccanismi implicati nello switching dell'attività GABAergica da eccitatoria ad inibitoria sono strettamente legati ad alterazioni nel pattern di espressione di trasportatori di membrana selettivi per gli ioni Cl⁻ e HCO₃⁻, i quali determinano, in collaborazione con altri canali e/o trasportatori, la concentrazione intracellulare di ioni Cl⁻ (Rivera et al., 2005). L'accumulo intracellulare di questi ultimi è favorito quando

nella cellula vi sono alti livelli di espressione del cotrasportatore $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCCs), del cotrasportatore $\text{Na}^+\text{-potassio (K}^+)$ (NKCC) o degli scambiatori anionici Na^+ dipendenti (NDAE). Al contrario, la diminuzione del Cl^- intracellulare si verifica quando si ha un aumento del trasportatore $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ (KCC), degli NDAE o del canale 2 per il Cl^- (Clc2; fig. II.2; Galanopoulou, 2008). Nei neuroni ippocampali immaturi, in particolare, si hanno elevate concentrazioni del cotrasportatore NKCC1, il quale sposta ioni Cl^- verso l'interno della cellula; ne consegue una concentrazione intracellulare di Cl^- molto elevata, responsabile di un valore per il potenziale di equilibrio del Cl^- (E_{Cl^-}) più basso rispetto al restante potenziale di membrana (V_m). L'apertura del canale del GABA_A R in seguito a stimolazione conduce in tal modo ad un efflusso di Cl^- che determina la depolarizzazione del neurone nel tentativo di raggiungere E_{Cl^-} (Ben-Ari et al., 2007). Durante la maturazione neuronale, si registrano, invece, sia una down-regulation del NKCC1 che un'up-regulation del KCC2, cui consegue la fuoriuscita di Cl^- ed un E_{Cl^-} più negativo di V_m (Payne et al., 2006); in tal caso, l'attivazione del sistema GABA_A determina una condizione iperpolarizzante (Rivera et al., 1999). Numerosi studi hanno messo in evidenza le peculiarità dei cambiamenti ionici e della permeabilità che accompagnano la maturazione dei neuroni ippocampali e del sistema GABAergico. In tal contesto, una prima importante evidenza riguarda il gradiente con cui i trasportatori del Cl^- vengono espressi nelle diverse componenti neuronali (Stein et al., 2004; Blaesse et al., 2006). È stata infatti dimostrata l'esistenza di un gradiente subcellulare di KCC2 nei neuroni maturi (Gulyas et al., 2001; Szabadics et al., 2006), per la quale, mentre i dendriti delle cellule piramidali e degli interneuroni esprimono elevati livelli di KCC2, si ha una bassa espressione a livello assonico, in accordo con quanto riportato a livello dell'ilo ippocampale, dove la regione del DG contenente gli assoni delle cellule principali non registra la presenza di tale trasportatore. Recenti studi hanno suggerito come i cambiamenti che si realizzano nella trasmissione GABAergica durante la maturazione ippocampale non siano in realtà associati ad uno switching della sua azione, quanto piuttosto ad un semplice indebolimento dell'effetto depolarizzante; tale evidenza è supportata dal fatto che anche nei neuroni piramidali adulti in CA3, a livello somatico, il GABA mantiene una debole attività depolarizzante grazie all'azione combinata di diversi meccanismi di trasporto degli ioni HCO_3^- e Cl^- (Tyzio et al., 2008). Un ulteriore fattore di complessità in tale processo è fornito dal dimorfismo sessuale riscontrato nei meccanismi di regolazione della maturazione del sistema GABA_A ergico. Nella *pars reticulata* della *substantia nigra* (SNR), l'espressione

dell'mRNA di KCC2 nei neuroni GABAergici è sempre più alta nelle femmine che nei maschi (periodo infantile e giovanile; Galanopoulou et al., 2003), fattore che potrebbe giustificare la comparsa delle risposte GABAergiche iperpolarizzanti prima nelle femmine che nei maschi (Galanopoulou et al., 2003; Kyrozis et al., 2006). Similmente la comparsa del segnale GABAergico iperpolarizzante è vista prima nei neuroni dopaminergici della *pars compacta* della SN delle femmine di ratto (Galanopoulou, 2006).

Le concentrazioni intracellulari di Cl^- e HCO_3^- sono finemente regolati da diversi scambiatori di anioni. I sistemi di trasporto indipendenti dal Na^+ scambiano HCO_3^- per il Cl^- extracellulare, abbassando il pH ed inducendo un aumento del Cl^- intracellulare (Hentschke et al., 2006), mentre gli NDAE ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) funzionano in senso opposto, aumentando il pH intracellulare e riducendo la concentrazione di Cl^- (Virkki et al., 2003). L'espressione di questi ultimi scambiatori precede quella del KCC2 nell'encefalo allo stadio embrionale e, diversamente da questo, è stata identificata nel sistema nervoso periferico e nel tessuto epiteliale non neuronale (Hubner et al., 2004). Infine, uno dei fattori coinvolti nella regolazione della trasmissione GABAergica è rappresentato dal pattern di sviluppo dei canali $\text{Clc}2$ del Cl^- , responsabili di un efflusso di ioni Cl^- , cui consegue una bassa concentrazione intracellulare. I bassissimi livelli di tale trasportatore nell'HIP neonatale supportano ulteriormente l'azione depolarizzante del GABA riscontrata in tale fase (Sik et al., 2000; Haug et al., 2003). Per quanto riguarda il HCO_3^- , l'up-regolazione di una anidraasi carbonica citosolica, che catalizza la produzione di HCO_3^- dalla anidride carbonica (CO_2), è stata osservata nei neuroni piramidali a circa 12 giorni postnatali, promuovendo le risposte GABA_Aergiche depolarizzanti (Rivera et al., 2005).

Alterazioni strutturali e farmacologiche dei GABA_ARs durante lo sviluppo

Accanto ai cambiamenti che interessano la natura della trasmissione GABAergica, numerosi studi hanno dimostrato che nel corso della maturazione dell'HIP, così come della maggior parte delle aree encefaliche, si realizzano numerosi cambiamenti sul pattern di espressione delle diverse subunità GABAergiche. In tal contesto è importante definire gli stadi interessati da tali alterazioni, in quanto potrebbero fornire indicazioni sul loro significato funzionale. Lo stadio infantile dei ratti comprende il periodo PND7-PND21, seguito dallo stadio giovanile a PND32-37: da qui ha inizio lo stadio puberale che termina a PND60, quando è raggiunta la fase adulta (Zapatero-Caballero et al.,

2003). Il GABA è presente nell'encefalo di ratto già nel corso dello sviluppo prenatale (E10), divenendo poi maggiormente concentrato allo stadio E14 nelle zone germinative encefaliche, quali la placca corticale, la regione che si trova sotto di essa e le zone germinale ed intermedia (Haydar et al., 2000). Analogamente, un'espressione precoce dei recettori rispetto alle prime sinapsi GABA_Aergiche caratterizza le fasi iniziali della maturazione, consentendo in tal modo l'esplicitarsi delle funzioni autocrine e paracrine del GABA (Serafini et al., 1998) coinvolte nei processi di proliferazione, migrazione e differenziamento sia neuronale che gliale. In particolare, mentre le subunità α_4 , β_1 e γ_1 sono espresse nei neuroblasti ancora non migrati, le subunità α_2 , α_3 , β_3 e γ_2 sono riscontrati in corrispondenza della placca corticale e sub-corticale (Maric et al., 1997). Numerosi cambiamenti si realizzano nel corso dello sviluppo postnatale, così come nell'invecchiamento per le subunità GABA_Aergiche quali α_{1-5} e γ_{1-2} (Mtchedlishvili et al., 2003; Kanaumi et al., 2006; Liu et al., 2006). Alcuni studi condotti su encefalo di ratto nel corso dello sviluppo postnatale suggeriscono una generale riduzione dell'espressione di $\alpha_{2/3}$ ed un parallelo incremento della subunità α_1 in numerose aree encefaliche, in accordo con quanto riscontrato a livello della corteccia visiva e del collicolo superiore dell'encefalo murino (Henneberger et al., 2005). Tale switch tra le subunità determina un incremento della sensibilità dei recettori GABA_Aergici a numerosi farmaci quali neurosteroidi, zolpidem e BDZ ed un'azione GABAergica di breve durata a livello postsinaptico. Un simile pattern di espressione è stato riscontrato nelle cellule del DG, dove lo switch da α_5 alle subunità α_1 , α_4 e γ_2 ben si accorda con l'incrementata sensibilità dei GABA_ARs alle BDZ (Chugani et al., 2001). È interessante il fatto che anche i processi di trafficking del complesso recettoriale variano nel corso della maturazione encefalica. Infatti, sebbene nei primi stadi di sviluppo i GABA_ARs vengono distribuiti su tutta la superficie cellulare, dove possono essere attivati tonicamente dal GABA presente a livello extracellulare, una distribuzione finemente regolata ed indirizzata a specifici siti postsinaptici diviene attiva durante i processi di sinaptogenesi (Galanopoulou, 2008).

II.3 Le benzodiazepine

Il ruolo chiave che il GABA riveste a partire dallo sviluppo prenatale, così come nelle prime fasi dello sviluppo postnatale e nell'encefalo adulto, è maggiormente sottolineato dalle numerose patologie neurologiche e psichiatriche associate a disfunzioni della trasmissione GABAergica. Tali alterazioni neurologiche

comprendono epilessia, disordini dell'ansia, malattia di Huntington, schizofrenia e stati di dipendenza da droghe. Numerosi studi negli ultimi anni sono stati condotti alla ricerca di farmaci in grado di intervenire e correggere, o almeno migliorare, i sintomi associati, attraverso un'interazione specifica con i meccanismi molecolari che li determinano. In tal contesto, tra le numerose sostanze specifiche per il sistema GABA_A, considerate come farmaci di elezione per la cura delle suddette patologie (Meldrum e Rogawski, 2007), sono compresi quei composti in grado di potenziare od indebolire l'azione del recettore GABA_A attraverso una diretta interazione (BDZ, barbiturici, propofolo, ecc.), così come sostanze che influenzano il rilascio di GABA (Czuczwar e Patsalos, 2001; Quilichini et al., 2006; Meldrum e Rogawski, 2007).

II.3.1 Caratteristiche generali delle benzodiazepine

Il termine BDZ si riferisce ad una componente della loro struttura chimica rappresentata dalla fusione di un anello benzenico ed uno diazepinico. In aggiunta, le BDZ contengono anche un gruppo arilico in posizione 5 dell'anello diazepinico (fig. II.3).

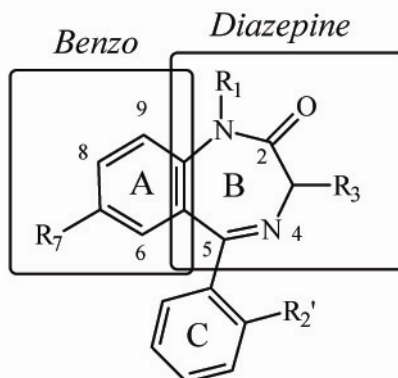


Fig. II.3. Formula generale della struttura delle BDZ.

Una classificazione delle BDZ sul piano funzionale in ansiolitiche, ipnotiche, anticonvulsivanti e miorilassanti è di difficile realizzazione in quanto tutte, sebbene in misura variabile, presentano effetti simili. Al contrario, una classificazione più chiara può essere eseguita tenendo conto delle differenze relative all'aspetto farmacocinetico, quali l'emivita plasmatica, la rapidità di comparsa dell'azione, l'intensità e la durata di azione. È sulla base di tali caratteristiche che le BDZ vengono classificate in: BDZ a lunga durata d'azione, BDZ a intermedia durata d'azione, BDZ a breve durata d'azione

e BDZ a brevissima durata d'azione (Chouinard, 2004). I vantaggi clinici dell'impiego di tali farmaci sono gli elevati livelli di efficacia, la rapida attivazione ed una tossicità minima. Le BDZ si presentano come complessi liposolubili, ma scarsamente solubili in acqua e, grazie a tali proprietà, oltre ad essere ben assorbite a livello gastroenterico, si legano alle proteine plasmatiche raggiungendo e superando la barriera ematoencefalica (Riss et al., 2008). In seguito ad iniezione endovenosa, gli effetti farmacologici compaiono in un tempo che varia dai 15 secondi fino a qualche minuto a seconda della risposta individuale al farmaco, mentre la durata di azione varia in base alla liposolubilità del composto. Le BDZ più liposolubili hanno una durata di azione più breve in quanto la loro struttura chimica ne favorisce una rapida distribuzione nei tessuti periferici, in particolare nel tessuto adiposo e, di conseguenza, una più rapida eliminazione. I composti meno liposolubili, al contrario, si ridistribuiscono più lentamente, restando più a lungo nel SNC ad una concentrazione efficace. Le BDZ vengono metabolizzate principalmente a livello epatico, attraverso processi di ossidazione e di coniugazione con acido glucuronico, dando vita a metaboliti attivi o, come nel caso della coniugazione, a metaboliti inattivi pronti per essere eliminati. L'eliminazione delle BDZ avviene attraverso le urine ed, in minor misura, attraverso le feci (Anderson e Miller, 2002). Sebbene le BDZ sono una classe di farmaci particolarmente ben tollerati, bisogna comunque tenere sempre presente la possibilità di effetti collaterali legati al loro uso. Sonnolenza e confusione, ad esempio, possono indicare un'eccessiva sedazione o un aumento degli effetti sedativo-ipnotici delle BDZ (Salzman, 1999).

Farmacologia

Le BDZ si comportano da modulatori allosterici dei GABA_ARs, determinando un incremento della conduttanza del canale al Cl⁻ con conseguente aumento della trasmissione inibitoria a livello sinaptico (fig. II.4; Atack et al., 2006).

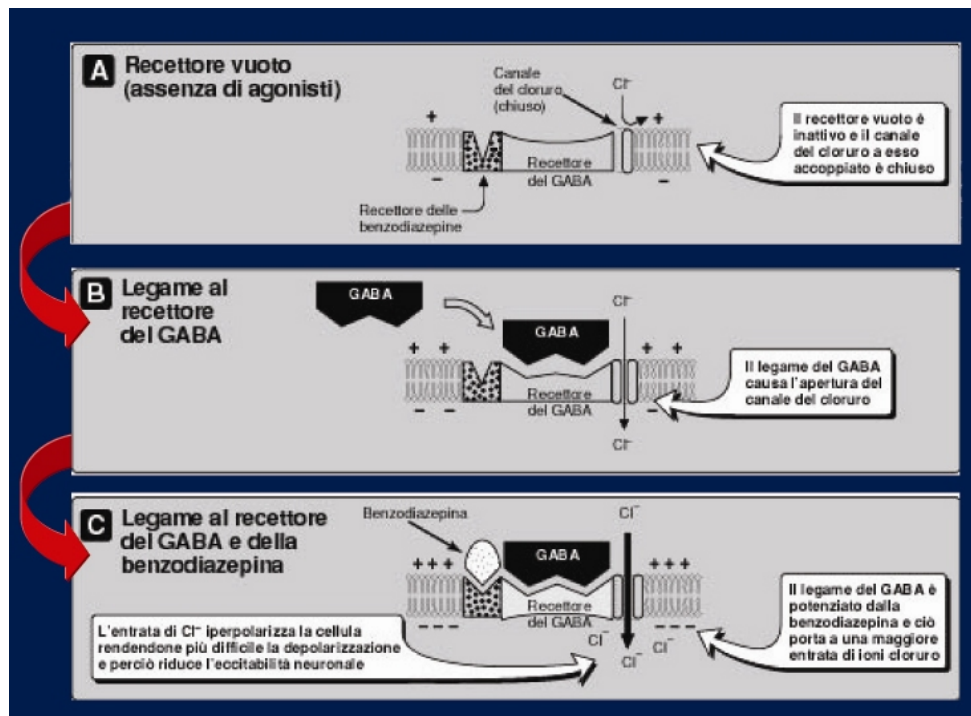


Fig. II.4. Schema illustrativo del meccanismo d'azione delle BDZ sui GABA_ARs .

Numerosi studi hanno ormai portato ad una chiara definizione della struttura del sito di legame delle BDZ, la cui localizzazione sull'interfaccia α^+/γ^- suggerisce che la diversa farmacologia di tali sostanze è legata principalmente alle isoforme α e γ comprese nel complesso GABA_AR . La presenza della subunità γ_2 nel recettore, in particolare, risulta cruciale per l'attività delle BDZ (Mohler, 2006), come supportato dal fatto che la subunità γ_1 non viene mai co-espressa con subunità γ_2 . In aggiunta, i recettori che contengono la subunità γ_1 , oltre a non mediare le azioni delle BDZ, presentano un'umentata sensibilità verso i neurosteroidi. La sostituzione della subunità γ_2 con la δ , al contrario, è seguita dalla perdita di sensibilità alle BDZ, così come verso i neurosteroidi (Pirker et al., 2000). In modo simile a quanto riportato per la subunità γ , la presenza di determinate subunità α , oltre ad essere fondamentale per l'effettivo legame delle BDZ, contribuisce alla sua specificità in associazione con la concentrazione del farmaco. A tal proposito, i siti di legame per le BDZ sono classificati, in base all'affinità con cui avviene il legame, in tre categorie; siti a più alta affinità sono presenti sulla subunità α_1 , ad affinità intermedia sulle subunità α_2 o α_3 e a più bassa affinità su α_5 (Mehta e Ticku, 1999). Le BDZ definite classiche, quali diazepam (DZP) o flunitrazepam, interagiscono prevalentemente con i recettori $\alpha_1\beta\gamma_2$, $\alpha_2\beta\gamma_2$, $\alpha_3\beta\gamma_2$ o $\alpha_5\beta\gamma_2$ (Olsen e Sieghart, 2009). La maggior parte di queste BDZ non distingue tra i siti presenti sui differenti sottotipi del GABA_AR , mentre alcuni composti

che non rientrano nella categoria delle BDZ classiche, quale lo zolpidem, manifestano una preferenza selettiva per i recettori $\alpha_1\beta\gamma_2$ (Möhler, 2006). Analogamente, altri composti, come il TPA023 (Atack et al., 2006) mostrano una certa selettività per i recettori $\alpha_2\beta\gamma_2$ e $\alpha_3\beta\gamma_2$, mentre L-838417 (McKernan et al., 2000) risulta essere selettivo per i recettori $\alpha_2\beta\gamma_2$, $\alpha_3\beta\gamma_2$ e $\alpha_5\beta\gamma_2$.

La specificità con cui avviene il legame per le BDZ classiche è dovuta al residuo aminoacidico omologo a $\alpha_1\text{H101}$, che è un'istidina in α_1 , α_2 , α_3 e α_5 e un'arginina in α_4 e α_6 (Dunn et al., 1999). La selettività della maggior parte di questi farmaci, così come l'applicazione di tecniche di mutagenesi puntiforme, sono spesso sfruttate in studi mirati alla definizione del ruolo dei diversi sottotipi GABA_A Rergici nelle numerose funzioni esplicate dall'area encefalica d'interesse. A tal proposito, basandosi sull'evidenza che la maggior parte delle azioni del DZP sono mediate attraverso recettori composti dalle subunità $\alpha_1\beta\gamma_2$, $\alpha_2\beta\gamma_2$, $\alpha_3\beta\gamma_2$ e $\alpha_5\beta\gamma_2$, attraverso l'introduzione di mutazioni puntiformi nei geni codificanti per le singole subunità α , è stato dimostrato che i recettori con le subunità $\alpha_1\beta\gamma_2$ mediano le azioni sedative, anestetiche e in parte anticonvulsioni del DZP (Rudolph et al., 1999, McKernan et al., 2000), mentre la sua attività ansiolitica è mediata principalmente dai GABA_A Rs composti dalle subunità α_2 (Low et al., 2000) e α_3 (Dias et al., 2005). I recettori $\alpha_2\beta\gamma_2$ sono inoltre coinvolti in alcune risposte muscolari di rilassamento (Low et al., 2000). I recettori $\alpha_5\beta\gamma_2$ sembrano, invece, influenzare i processi di apprendimento e memoria, in accordo con una sua elevata espressione in CA1 (Crestani et al., 2002). I recettori che contengono le subunità α_4 o α_6 associate alle subunità β e γ_2 al contrario non legano i tradizionali agonisti delle BDZ, ma dimostrano un'alta affinità per ligandi di natura diversa, quali l'imidabenzodiazepina Ro15-4513 e flumazenil (FLM; Korpi et al., 2002), che agiscono rispettivamente come agonisti inversi e antagonisti del sito di legame delle BDZ. Accanto alle BDZ classiche, altri modulatori allosterici dei GABA_A Rs, quali barbiturici, steroidi neuro-attivi, etomidate, propofol (Olsen e Sieghart, 2009), sono stati, inoltre, impiegati al fine di identificare i vari sottotipi del GABA_A R (fig. II.5). Mentre il legame delle BDZ ai GABA_A Rs determina una modulazione del flusso degli ioni Cl^- GABA-indotto, sono stati identificati composti che, attraverso il legame al sito per le BDZ, sono capaci di inibire l'azione degli agonisti o degli agonisti inversi, alterando solo indirettamente l'attività recettoriale. In aggiunta, tra tutti gli agonisti o agonisti inversi del sito per le BDZ, vi sono sostanze che comportano un'intensificazione od una riduzione di tipo allosterico meno drastiche delle correnti del

Cl⁻ indotte dal GABA; questi composti sono chiamati agonisti parziali o agonisti inversi parziali (Olsen e Sieghart, 2008).

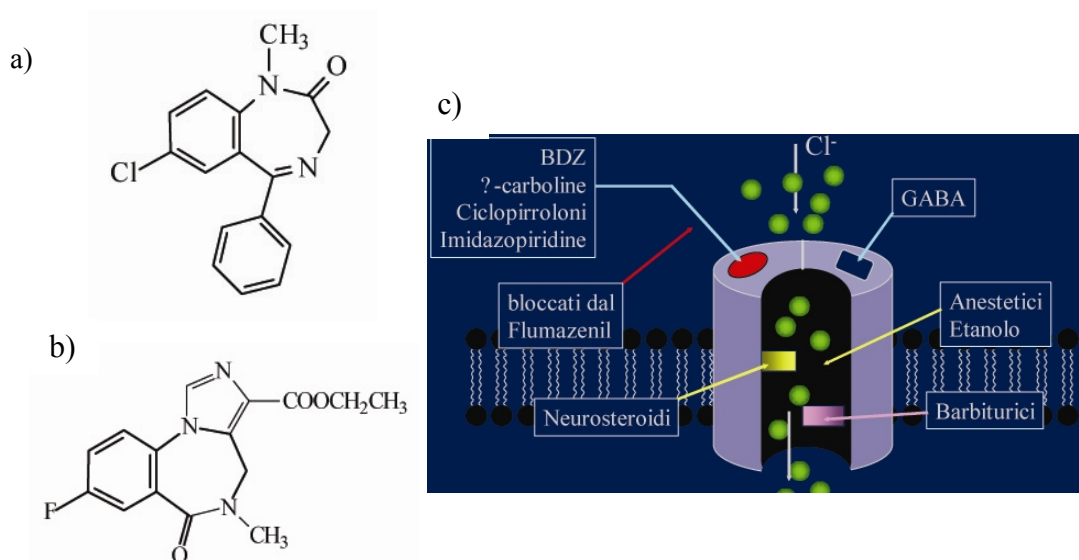


Fig. II.5. Struttura chimica della BDZ classica DZP (a) e dell'imidabenzodiazepina FLM (b). Schema dei siti di legame del GABA_AR (c).

II.3.2 Le benzodiazepine nell'ippocampo

La distribuzione eterogenea dei sottotipi dei GABA_ARs nell'HIP determina un coinvolgimento differenziale delle distinte regioni ippocampali sia nell'esplicarsi delle numerose funzioni complesse che in patologie associate a disordini del corretto equilibrio eccitatorio-inibitorio. In particolare, numerosi studi hanno dimostrato una differente distribuzione dei GABA_ARs lungo l'asse setto-temporale, evidenziando una maggiore attività inibitoria nel DH rispetto al VH (Papatheodoropoulos et al., 2002). A supporto di ciò, alterazioni a carico dell'equilibrio eccitatorio-inibitorio interessano in maggior misura il VH (Borck e Jefferys, 1999). A seguito di un'alterazione dell'attività di due dei principali sistemi di neurotrasmissione a livello encefalico, il sistema GABAergico e quello Gluergico, si ha l'insorgenza di numerosi disturbi, quali insonnia, ansia, epilessia, cui spesso consegue neurodegenerazione principalmente dovuta a fenomeni di eccitotossicità. L'applicazione di numerosi farmaci appartenenti alla famiglia delle BDZ è ormai da anni ritenuta una strategia principale per la cura di tali patologie e, in particolare, composti quali DZP e flunitrazepam sono impiegati per i loro effetti sedativi, ipnotici, ansiolitici e anticonvulsivi. Sulla base delle precedenti considerazioni circa una distribuzione differente dei GABA_ARs nell'HIP, si può suggerire che l'azione delle BDZ si esplica attraverso l'interazione con i sistemi

recettoriali di specifiche aree encefaliche. A tal proposito, uno studio recente di Sotiriou et al. (2005) indica una diversa distribuzione dei GABA_ARs contenente le subunità α_1 e α_2 tra il DH e VH di ratti, con il sottotipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ dominante nella porzione dorsale e il sottotipo $\alpha_2\beta_1\gamma_2$ in quella ventrale, come precedentemente descritto. L'espressione della subunità α_5 è, invece, maggiore nel VH rispetto al DH (Sotiriou et al., 2005). In tal modo, l'azione dello zolpidem, considerato selettivo per la subunità α_1 , si esplicherà principalmente a livello del DH, e solo in minor misura in VH. L'anestetico intravenoso etomidate, che agisce da modulatore allosterico positivo specifico per i GABA_ARs contenenti le subunità β_2 e β_3 , ma non β_1 , è in grado di aumentare l'affinità delle BDZ classiche, quale il flunitrazepam, per il proprio sito di legame (Carlson et al., 2000). L'agonista inverso del sito delle BDZ L-655,708 mostra, invece, un'alta selettività per i GABA_ARs contenenti la subunità α_5 (Casula et al., 2001). Sulla base di tali evidenze, l'etomidate (modulatore allosterico positivo selettivo della subunità β_2) si legherà meno nel VH rispetto a DH, in accordo con risultati precedenti secondo cui il sottotipo $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ domina nella porzione dorsale (Sotiriou et al., 2005). Al contrario, L-655,708 (agonista selettivo inverso del sottotipo α_5) si legherà maggiormente nella porzione ventrale rispetto a quella dorsale. In aggiunta, i siti di legame per le BDZ nel VH presentano un'affinità di legame per il flunitrazepam più bassa rispetto alla porzione dorsale, mentre il numero dei siti di legame per le BDZ è simile a entrambi i poli dell'HIP. Poichè la subunità γ_2 conferisce un alto grado di sensibilità per il legame delle BDZ (Wafford et al., 2004) e il flunitrazepam non manifesta selettività per le varie subunità α , la bassa affinità di legame del flunitrazepam osservata nel VH rispetto a quello dorsale è dovuta alla bassa espressione delle subunità γ_2 nella regione ventrale (Sotiriou et al., 2005). Analogamente, la maggiore espressione di α_2 nel VH giustifica il fatto che gli effetti ansiolitici delle BDZ sono più efficienti nel VH rispetto a DH (Sarantis et al., 2008).

Accanto alle questioni di tipo farmacologico finora descritte, l'espressione di sottotipi di GABA_ARs specifici nelle varie regioni dell'HIP, così come in determinati circuiti neuronali, giustifica il diverso ruolo che il VH e il DH rivestono nei processi di apprendimento e memoria. È particolarmente interessante sottolineare come le azioni esplicate dalle BDZ attraverso i GABA_ARs non si limitano ad una semplice modulazione della trasmissione GABAergica, ma determinano alterazioni sull'intero network neuronale. A supporto di ciò, l'effetto anticonvulsione del DZP è anche associato ad una significativa riduzione dei livelli di Glu extracellulare a livello

dell'HIP (Khan et al., 1999). I possibili meccanismi con cui il DZP attenua il rilascio del Glu includono in primo luogo un aumento dell'inibizione GABAergica, mediata da recettori pre- e post-sinaptici, e inoltre una riduzione delle correnti ioniche voltaggio-dipendenti. Da qui deriva il coinvolgimento dei canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti nell'azione delle BDZ. In realtà, i meccanismi che sottendono tali effetti sono stati chiariti attraverso l'applicazione dell'antagonista dei GABA_ARs Flunitrazepam, il quale inverte completamente l'azione anticonvulsiva e l'attenuazione del rilascio di Glu, mentre sembra non avere effetti sull'attività dei canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti. In tal modo, quindi, l'azione del DZP sulla quantità di Glu rilasciato dipende esclusivamente dalla quantità di recettori che lega il DZP.

II.4 Il sistema Gluergico: ruolo nello sviluppo neuronale

Il Glu rappresenta il principale neurotrasmettitore eccitatorio nell'encefalo adulto, dove svolge un ruolo chiave nella regolazione dello sviluppo, sopravvivenza e morte dei neuroni, così come della plasticità neuronale. Analogamente a quanto riportato per il GABA, anche il Glu esplica le proprie funzioni interagendo con due categorie principali di recettori: ionotropici e metabotropici. I recettori ionotropici del Glu sono canali ionici catione-specifici e possono essere ulteriormente classificati in recettori per l'N-metil-D-aspartato (NMDARs), recettori per l' α amino-3-idrossi-5-metil-4-acido izoxazole propionico (AMPArs) e recettori kainato (Nicodemo et al., 2010). I recettori metabotropici (mGluRs), al contrario, sono costituiti da proteine a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G, la cui stimolazione determina la regolazione di canali ionici posti in prossimità del recettore stesso. Attualmente sono stati identificati otto diversi mGluRs (mGluR1-8) classificati in tre gruppi (gruppi I, II e III) sulla base delle omologie di sequenza e delle vie di traduzione del segnale che attivano sul versante citoplasmatico (Lau e Tymianski, 2010).

II.4.1 Recettori ionotropici del Glu: NMDAR

Struttura degli NMDARs

Gli NMDARs derivano dall'assemblaggio tetramerico di due eterodimeri, ognuno dei quali è costituito da una subunità NR1 e da una delle quattro possibili subunità NR2 (NR2A-D; Cull-Candy et al., 2001); queste ultime possono, inoltre, essere sostituite da una delle subunità NR3A-B (Mayer, 2005). Ciascuna subunità comprende un dominio extracellulare N-terminale, tre regioni transmembrana (M1, M3, e M4) e un loop

rientrante (M2) che formano il poro centrale, e un dominio intracellulare C-terminale. I domini N-terminali, in particolare, contengono il sito di legame per il Glu, mentre il dominio C-terminale interagisce con proteine intracellulari aventi la funzione di messaggeri o semplici proteine di ancoraggio, quali le MAGUK (proteine che legano la guanilato chinasi associate alla membrana), attraverso un dominio di legame PDZ (fig. II.3). Numerosi studi hanno consentito di individuare una serie di proteine *scaffold* ed enzimi che si legano al dominio C-terminale (Mishra et al., 2006) determinando la formazione di complessi macromolecolari di segnale con dimensioni di circa 1-2 MDa noti come NRC (Complesso recettore NMDA) o MASC (complessi di segnalazione associato a MAGUK; Husi et al., 2000; Husi et al., 2001). Sebbene la presenza della subunità NR1 nel recettore sia indispensabile per il riconoscimento del Glu così come di altri ligandi, le subunità NR2 svolgono un ruolo altrettanto importante, in accordo con le numerose aberrazioni fenotipiche osservate in seguito alla mancata espressione di una di queste subunità. In topi knock-out per NR2A si osservano infatti deficit nell'apprendimento spaziale ed in generale nella realizzazione dell'LTP, confermando l'importanza di tale subunità nell'HIP (Sakimura et al., 1995). Analogamente, la mancata espressione di NR2B determina morte neonatale a P0, associata tra l'altro ad un'anomala formazione del nucleo trigeminale del tronco cerebrale (Kutsuwada et al., 1996). La mancata espressione di NR2C causa invece una diminuzione delle correnti NMDAR-mediate nelle cellule granulari del cervelletto e, infine, la doppia deplezione NR2A/NR2C determina una ridotta coordinazione motoria (Ryan et al., 2008). Tali risultati sono da interpretare alla luce sia del ruolo che le subunità NR2 giocano nel mediare le interazioni del complesso recettoriale con proteine intracellulari, che del loro pattern di espressione spazio-temporale durante lo sviluppo pre- e post-natale. In tal contesto, numerosi studi hanno riscontrato un'espressione ubiquitaria di NR2A e NR2B in tutto il proencefalo, compreso l'HIP; l'espressione di NR2C è limitata al cervelletto mentre NR2D si trova prevalentemente nel mesencefalo. Inoltre, mentre NR2B è espresso sia durante il periodo embrionale che dopo la nascita, NR2D è principalmente espresso durante lo stadio embrionale; al contrario, NR2A e NR2C sono espressi esclusivamente nella fase post-natale. E' interessante notare come i quattro geni codificanti le subunità NR2A-D presentino un'elevata omologia di sequenza, suggerendo una loro derivazione da eventi di duplicazione genica a partire da un unico gene. A supporto di tale ipotesi, negli Invertebrati è stato identificato un singolo gene NR2 (fig.II.6).

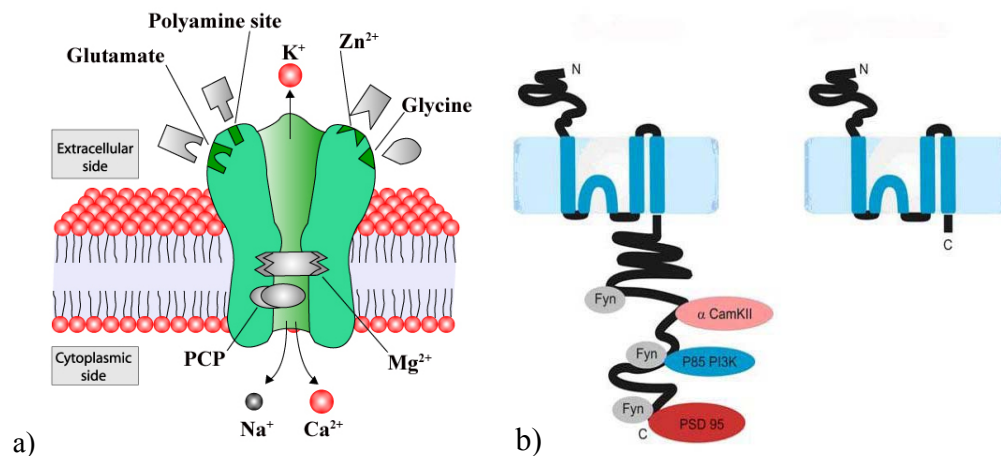


Fig. II. 6. Modello dell'NMDAR con siti di legame per i diversi ligandi a); subunità NR2 b): A sinistra uno schema della subunità NR2A o NR2B dei Vertebrati, che presentano un lungo dominio C terminale intracellulare. A destra la subunità NR2 degli Invertebrati che invece presenta un breve dominio intracellulare C terminale (modificato da Ryan et al., 2008).

Meccanismi di azione degli NMDARs

Come anticipato nel paragrafo precedente, l'attivazione del sistema Gluergico segue quella del sistema GABAergico durante la maturazione neuronale embrionale e dell'encefalo adulto. A differenza dei GABA_ARs, la cui attivazione è indotta dal legame del GABA, la stimolazione degli NMDARs richiede la compartecipazione di due meccanismi, il legame del ligando e la depolarizzazione della membrana post-sinaptica. In condizioni di riposo, infatti, gli NMDARs si presentano in forma associata agli ioni magnesio (Mg²⁺) i quali esercitano un controllo negativo sul recettore. In questa configurazione, anche in seguito all'arrivo di un potenziale d'azione ed al rilascio di Glu non si ha alcuna attivazione dell'NMDAR. La sua funzionalità viene ripristinata, invece, in seguito ad un aumento del potenziale di membrana determinato dall'afflusso di ioni Na⁺ e K⁺ mediato dall'AMPA, e conseguente rimozione del Mg²⁺. A questo punto, la rimozione del blocco operato dal Mg²⁺, il legame del Glu ed il legame di un co-ligando, quale la glicina, consentono l'attivazione degli NMDARs, con ingresso di Ca²⁺ (Wu et al., 2001; Lee et al., 2003) e stimolazione di secondi messaggeri responsabili delle diverse forme di plasticità sinaptica (Bear et al., 1994; Cull-Candy et al., 2001). La stretta dipendenza funzionale degli NMDARs dagli AMPARs è stata dimostrata in numerosi studi, nei quali sinapsi che esprimevano l'NMDAR ma non l'AMPA risultavano elettrofisiologicamente silenti. Un altro esempio in tal senso è fornito dalle "sinapsi silenti" che si formano nelle fasi iniziali dello sviluppo neuronale le quali, esprimendo solo NMDAR, non sono in grado di avviare potenziali d'azione in risposta

al rilascio di Glu pre-sinaptico. Tuttavia, a causa di un'elevata affinità per il neurotrasmettitore eccitatore, e della temporanea insensibilità agli ioni Mg^{2+} , i neo NMDARs possono essere facilmente attivati permettendo l'afflusso spontaneo di ioni Ca^{2+} . La stimolazione intracellulare interna, sebbene debole, è comunque sufficiente ad indurre il targeting sinaptico degli AMPARs, creando connessioni funzionali tra cellule neuronali (Punnoose et al., 2004). Numerosi studi genetici e farmacologici hanno dimostrato che gli NMDARs sono necessari per il normale apprendimento del territorio, così come nell'induzione di numerose forme di LTP (Bear et al., 1994; Cull-Candy et al., 2001) ed inoltre sono fondamentali per lo sviluppo attività-dipendente del cervello, in particolare nella corteccia somatosensoriale e visiva degli adulti (Dickson et al., 2003).

II.4.2 Recettori ionotropici del Glu: AMPAR e KAR

Nel SNC dei Mammiferi, la neurotrasmissione eccitatoria rapida è principalmente mediata dagli AMPARs, mentre i KAR svolgono ruoli importanti nella regolazione sia eccitatoria che inibitoria della neurotrasmissione. Entrambi i tipi di recettore sono coinvolti in meccanismi di plasticità sinaptica, e la loro disfunzione è stata associata a diverse patologie neurodegenerative (Feligioni et al., 2006). Gli AMPARs, in particolare, caratterizzati da struttura tetramericata formata da una combinazione di quattro subunità (GluR1-4; fig.II.4), richiedono per l'attivazione l'interazione con il Glu. Sebbene tali recettori siano principalmente permeabili agli ioni Na^+ e K^+ , la specificità dell'influsso dicationico è variabile, ed è determinato principalmente dalla composizione in subunità. GluR1, GluR3 e GluR4 mostrano, infatti, una forte rettificazione interna di corrente e risultano permeabili al Ca^{2+} , mentre GluR2 risulta impermeabile a tale ione (Burnashev et al., 1995; Geiger et al., 1995). Recenti evidenze suggeriscono tuttavia l'esistenza di un'isoforma di GluR2 Ca^{2+} -permeabile. Il ruolo fisiologico degli AMPARs, ben descritto nel paragrafo precedente, consiste essenzialmente nel modulare la velocità di eccitazione necessaria per rimuovere il blocco di Mg^+ sugli NMDARs, e una funzione simile viene svolta anche dai KAR presenti nei siti post-sinaptici. Quest'ultimi sono costituiti dalle subunità GluR5-7 (o GluK5-7) e KA1-2 (o GluK1-2), e la loro attivazione in seguito al legame con il Glu determina il passaggio di molti ioni escluso il Ca^{2+} . In aggiunta, mentre gli AMPARs sono localizzati prevalentemente sulla membrana post-sinaptica (Lau e Tymianski,

2010), i KARs possono essere localizzati sia nei siti *pre*-sinaptici (Chittajallu et al., 1996) che *post*-sinaptici (Castello et al., 1997; Vignes e Collingridge, 1997).

L'espressione degli AMPARs

I geni che codificano per le quattro subunità dell'AMPAR risultano estremamente correlati, con un'omologia di sequenza pari al 70% circa (Collingridge et al., 2004). Studi di ibridazione *in situ* ed immunostochimica hanno rivelato il pattern di espressione spazio-temporale delle subunità recettoriali dell'AMPAR, sottolineando, in particolare, la sua espressione nelle cellule gliali (Lin e Bergles, 2004). Dai risultati ottenuti è emersa un'elevata espressione delle subunità GluR1-GluR3 negli strati esterni della corteccia cerebrale, nell'HIP, nella regione olfattiva, nei gangli della base, nel setto laterale e nell'AMY (Beneyto e Meador-Woodruff, 2004). La subunità GluR4, al contrario, presenta un'espressione molto più bassa nel CNS, fatta eccezione per i nuclei reticolari del talamo e del cervelletto dove è abbondantemente espressa (Spreafico et al., 1994). In aggiunta, l'espressione delle subunità dell'AMPAR è regolata durante lo sviluppo neuronale (Talos et al., 2006). È interessante notare la peculiare distribuzione dei trascritti di ciascuna subunità dell'AMPAR a livello neuronale; i risultati ottenuti da studi di ibridazione *in situ* hanno infatti evidenziato la presenza di mRNA endogeno che codifica per le subunità GluR1 e GluR2 nei dendriti prossimali e distali dei neuroni ippocampali, oltre che di mRNA per GluR2 nei siti sinaptici (Grooms et al., 2006). La presenza nei dendriti dell'intero apparato per la sintesi proteica e dei vari trascritti suggerisce l'esistenza di una regolazione locale sia della concentrazione che della composizione dei recettori (Grooms et al., 2006). A supporto di ciò, l'attività persistente dell'AMPAR blocca l'incremento della sintesi di GluR1 nei dendriti, mentre l'attivazione acuta degli mGluRs di gruppo I o la depolarizzazione acuta indotta con KCl aumentano la sintesi sia di GluR1 che di GluR2 (Ju et al., 2004). Analogamente, l'attivazione dei recettori della dopamina endogena è stata associata al trasporto di mRNA, compresi quelli di GluR1 e GluR2, nei neuroni dell'HIP (Smith et al., 2005).

Il sistema di regolazione appena descritto coinvolge in realtà una quantità molto elevata di proteine neuronali, in accordo con la presenza di mRNAs (negli strati dendritici dell'HIP *in vivo* e *in vitro*) che codificano per proteine coinvolte nella regolazione delle sinapsi eccitatorie, come la proteina associata ai microtubuli 2 (MAP2), la subunità α della proteina chinasi II Ca^{2+} calmodulina-dipendente (CaMKII- α), il BDNF, proteine associate al citoscheletro con attività- regolata (Arc), il recettore

TrkB, recettore inositolo-1,4,5- trifosfato (Ins (1,4,5) P₃), la proteina chinasi atipica M ξ , la subunità NR1 dell'NMDAR, e la subunità α del recettore glicina (Martin e Zukin, 2006; Schuman et al., 2006).

Struttura dell'AMPA

Analogamente a quanto riportato per altri recettori, quali GABA_AR ed NMDAR, anche il corretto funzionamento degli AMPARs dipende fortemente dall'assemblaggio delle diverse subunità secondo un rapporto stechiometrico ben preciso. Dalla combinazione delle subunità GluR1-4 e delle forme di splicing alternativo che da esse derivano dipendono, infatti, le proprietà funzionali degli AMPARs, quali la cinetica di desensibilizzazione/risensibilizzazione e le proprietà di conduttanza (Ozawa et al., 1998). Al contempo, un rapporto stechiometrico preciso è richiesto nelle interazioni tra le subunità suddette e specifiche proteine (stargazina e proteine transmembrana (TM) che regolano gli AMPARs, o TARPS) di ancoraggio alla membrana, o al citoscheletro o, ancora, a sistemi di traduzione del segnale. Tali associazioni proteiche sono ritenute indispensabili soprattutto per il corretto *trafficking* e *targeting* dei recettori (Korber et al., 2007; Ziff, 2007). Ciascuna subunità dell'AMPA comprende circa 900 aa e ha un peso molecolare di circa 105 kDa. Le subunità GluR1-GluR4 presentano una porzione di amminoacidi con il 68-74% d'identità (Collingridge et al., 2004) e contengono quattro domini idrofobici. I primi tre sono trasversali rispetto alla membrana (TM1, TM3, e TM4), mentre M2 si volta dal citoplasma come un loop rientrante per formare parte del canale del poro (fig. II.4). Il segmento N-terminale è omologo alla proteina batterica legante la leucina-isoleucine-valina (LIVBP), mentre il dominio che lega il ligando (LBD), adiacente al primo, è omologo alla proteina legante la glutammina (Madden, 2002). LBD è suddiviso in S1 e S2 e, in seguito al legame con il ligando induce cambiamenti conformazionali che sono trasdotti ai segmenti TM, provocando l'apertura del canale (Mayer, 2005). Una regione C-terminale della S2 non è direttamente coinvolta nel legame dell'agonista e, a causa dello splicing alternativo dell'mRNA, si esprime in due forme, flip e flop (fig. II.7), che differiscono solo di pochi aa, ma che risultano in differenti recettori con diversa desensibilizzazione e cinetica di esportazione dal reticolo endoplasmatico (Coleman et al., 2006). Infine, l'estremità C-terminale delle subunità AMPAR è intracellulare e mostra varie differenze tra le stesse subunità. Ad esempio GluR1, GluR4, e una forma alternativa di GluR2 (GluR2L) hanno una coda citoplasmatica più lunga con elevata omologia. Al contrario,

la forma predominante di GluR2, GluR3, e la forma alternativa di GluR4 (GluR4c) hanno code citoplasmatiche omologhe più brevi. Numerose evidenze suggeriscono che recettori costituiti da subunità con brevi estremità C-terminali citoplasmatiche (GluR2/3) circolano continuamente dentro e fuori la sinapsi, con una costante di tempo di circa 15 minuti (Passafaro et al., 2001; Shi et al., 2001), mentre i recettori contenenti lunghi C-terminali (GluR1/2 e GluR2/4) sono aggiunti nelle sinapsi in modo attività-dipendente (Shi et al., 2001).

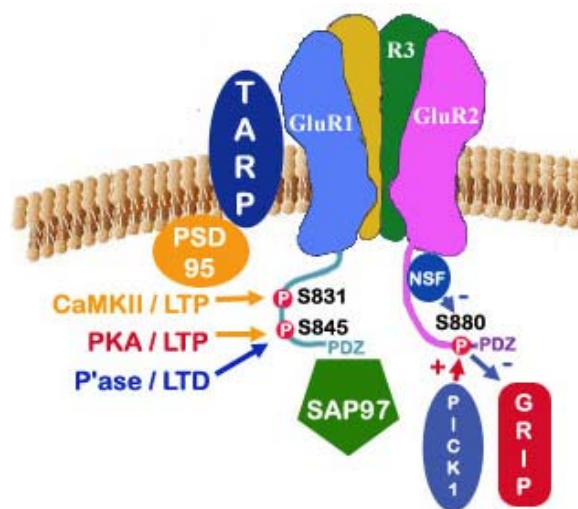


Fig. II.7. Struttura AMPAR.

Regolazione dell'AMPA

Sulla base della fine funzione che gli AMPARs giocano in processi quali l'LTP o LTD e di conseguenza nei processi di apprendimento e memoria, si comprende bene la necessità di regolare il turnover degli AMPARs a livello sinaptico. Nell'HIP, gli AMPARs sono composti principalmente da eterodimeri comprendenti le combinazioni GluR1-GluR2 o GluR2-GluR3 (Dykens et al., 1987). Essi mediano la maggior parte delle EPSCs (correnti eccitatorie post sinaptiche) nelle sinapsi Gluergiche e variazioni dell'attività o del numero di questi recettori determina cambiamenti della forza sinaptica. L'attività degli AMPARs è regolata da un meccanismo di fosforilazione della subunità GluR1, mediata dalla proteina CaMKII e responsabile di un incremento della conduttanza dei singoli canali AMPARs (Enari et al., 1998). In seguito alla fosforilazione, infatti, i recettori si ridistribuiscono all'interno della cellula e al di sotto della membrana post-sinaptica, contribuendo in tal modo alla regolazione dell'LTP (Farahani et al., 2005). Alcune evidenze hanno dimostrato che mentre il trasferimento

sinaptico di AMPARs contenenti GluR1 è indotto dall'attivazione di NMDARs e CaMKII, con conseguente potenziamento sinaptico (Fici et al., 1997), l'incorporazione sinaptica di GluR2 è, al contrario, un meccanismo attività-indipendente, e si verifica attraverso uno scambio con i già presenti AMPARs, senza provocare alcuna variazione netta della forza sinaptica (Fix et al., 1993). L'esocitosi di GluR2 appare quindi costitutivamente rapida (Cao et al., 2007) rispetto a quella di GluR1. Il diverso comportamento manifestato nel trafficking da GluR1 e GluR2 è determinato dalle loro estremità C-terminale citoplasmatiche, con il ruolo dominante di GluR1 su GluR2 nei recettori eteromerici costituiti dal complesso GluR1-GluR2 (Cao et al., 2007). Pertanto, la distribuzione sinaptica degli AMPARs è determinata, almeno in parte, dall'esocitosi regolata dai compartimenti intracellulari. I meccanismi molecolari attraverso i quali l'attivazione degli NMDARs stimola l'esocitosi degli AMPARs (GluR1-mediata) non sono ancora chiari, ma coinvolgono CaMKII e la fosfoinositide 3-chinasi PI3K (Cao et al., 2007). In aggiunta ai meccanismi di fosforilazione ed inserimento degli AMPARs a livello sinaptico, alcuni studi hanno suggerito il coinvolgimento di un processo di traslocazione laterale nelle sinapsi, da siti extra-sinaptici verso siti sinaptici, per giustificare la modulazione della forza sinaptica (Cao et al., 2007). Tale meccanismo coinvolge principalmente la stargazina, la quale interagisce con l'AMPA attraverso il proprio C-terminale, e secondariamente la proteina di ancoraggio PSD-95 (proteina associata alla densità sinaptica-95) la quale, in seguito a palmitolazione (Frerking et al., 2001), acquista la capacità di interagire con la stargazina (Frederickson, 1989) regolando il movimento laterale degli AMPARs.

II.4.3 mGluRs

Gli mGluRs sono proteine costituite da sette domini transmembrana legate a proteine G intracellulari. Sebbene in passato si ritenesse che tutti gli mGluRs impiegassero proteine G come molecole di traduzione a valle, è stata oggi riconosciuta una via di traduzione indipendente dalla proteina G (Heuss et al., 1999). I tre gruppi di mGluRs finora identificati comprendono complessivamente otto distinte subunità (Lau e Tymianski, 2010). La stimolazione degli mGluR1s ed mGluR5s (Gruppo I), in particolare, determina l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) β mediata dalla proteina $G_{\alpha_{q/11}}$, con conseguente produzione dell'inositolo trifosfato (IP_3) e del diacilglicerolo. L' IP_3 è coinvolto nel successivo rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari, il quale, insieme al diacilglicerolo regola l'attivazione della proteina chinasi C (PKC; fig. II.8;

Nicodemo et al., 2010). L'attivazione di questo gruppo di mGluRs modula gli EPSCs nelle sinapsi dell'HIP anche attraverso la tirosina chinasi, in una via del tutto indipendentemente dalla proteina G (Heuss et al., 1999). Gli mGluRs di gruppo II includono mGluR2s e mGluR3s, e sono responsabili della riduzione del pathway intracellulare mediato dall'adenilato ciclasi, con conseguente inibizione a valle dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (VDCC fig. II.8; Chavis et al., 1994). Sebbene questi recettori siano stati ritrovati sia in siti pre-sinaptici che post-sinaptici (Ohishi et al., 1994), la capacità di modulare i VDCCs è stata descritta nei siti pre-sinaptici. Anche gli mGluRs di gruppo III, comprendenti mGluR4s, mGluR6s, mGluR7s e mGluR8s, agiscono attraverso la regolazione dell'attività dell'adenilato ciclasi e degli VDCCs (Tanabe et al., 1993), distribuendosi sia in siti pre-sinaptici che post-sinaptici (Bradley et al., 1996).

Negli ultimi 2 decenni, l'intensificarsi degli studi sui processi molecolari che sottendono i fenomeni di eccitotossicità, hanno attribuito un ruolo chiave in tali processi anche agli mGluRs di gruppo I espressi nei siti post-sinaptici. La loro stimolazione determina, infatti, il potenziamento dell'afflusso di Ca^{2+} mediato dall'NMDAR (Bruno et al., 1995). Un ruolo opposto e potenzialmente neuroprotettivo è stato invece riconosciuto agli mGluRs di Gruppo II e III, la cui attivazione determina al contrario una riduzione dell'afflusso di Ca^{2+} mediato dall'NMDAR (Bruno et al., 1995). Tali dati supportano la nozione che mutazioni nelle sequenze aminoacidiche degli mGluRs potrebbero alterare la permeabilità neuronale al Ca^{2+} e, di conseguenza, determinare il peggioramento di una condizione di eccitotossicità stabilita (Lau e Tymianski, 2010).

Regolazione degli mGluRs di gruppo I

Il dinamismo degli mGluRs di Gruppo I è finemente regolato dall'attività di proteine chinasi che operano disaccoppiando i recettori dalle proteine G eterotrimeriche sia attraverso meccanismi dipendenti che indipendenti dalla fosforilazione (Dhami et al., 2004). I principali fattori coinvolti in tale meccanismo sono la PKC e il recettore chinasi

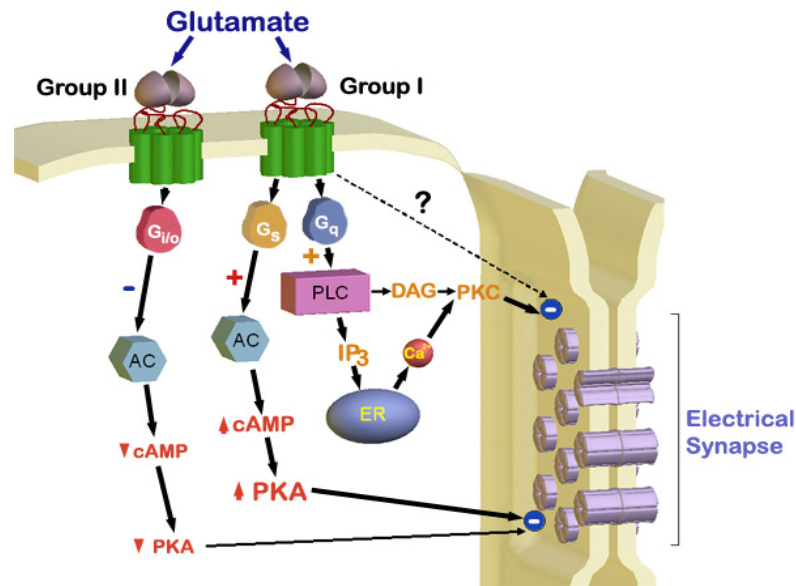


Fig.II.8. Meccanismo intracellulare mediato dagli mGluRs.

4 legato alla proteina G (GRK4), i quali operano il disaccoppiamento degli mGluRs di Gruppo I attraverso la fosforilazione dei residui di serina e di treonina localizzati a livello del loop intracellulare e del dominio C-terminale dei recettori (Gereau et al., 1998; Mundell et al., 2004). Al contrario, GRK2 media l'attenuazione del segnale mediato da mGluR1 ed mGluR5, attraverso un meccanismo indipendente dalla fosforilazione, ma che coinvolge l'interazione tra un dominio di omologia N-terminale della GRK2 e la proteina $G_{\alpha_{q/11}}$, provocando lo spostamento della proteina G eterotrimerica dal recettore (Dhami et al., 2004; Ribeiro et al., 2009). Recentemente, è stato dimostrato che a questo meccanismo di attenuazione contribuiscono anche le proteine inibitorie *optineurin* e *calcineurin* (CAIN; Anborgh et al., 2005; Ferreira et al., 2009). Studi diversi hanno provato il coinvolgimento di un'attività tirosina chinasi nella regolazione dell'attività degli mGluRs di gruppo I. A supporto di ciò, gli inibitori della fosforilazione tirosina chinasi-dipendente migliorano la conduttanza dei canali ionici, permeabili ai cationi e mediata da mGluR1, nelle fibre parallele che sinaptano con i neuroni del Purkinje nel cervelletto del ratto (Canepari et al., 2003). Al contrario, le correnti interne dipendenti dalle proteine G e attivate da mGluR1 nei neuroni dopaminergici del mesencefalo sono antagonizzate dagli inibitori della tirosina chinasi (Tozzi et al., 2001). Un potenziale candidato coinvolto nella regolazione tirosina chinasi degli mGluRs di gruppo I è la tirosina chinasi 2 ricca di prolina (*proline-rich* Pyk2), recentemente riscontrata in forma complessata ad mGluR1 e all'NMDAR (Husi et al., 2000). Numerose sono le evidenze sperimentali che supportano il coinvolgimento

della Pyk2. Innanzitutto, la sovraregolazione delle correnti dell'NMDAR, mediata da mGluR1 nei neuroni corticali, comporta l'attivazione di Pyk2 (Heidinger et al., 2002). In aggiunta, Pyk2 può co-immunoprecipitare sia con mGluR1 che con mGluR5 nei lisati di cervello di ratto, e ciò dimostra che Pyk2 interagisce direttamente con gli mGluRs di gruppo I, probabilmente per il tramite del loro secondo loop intracellulare e del dominio C-terminale (Nicodemo et al., 2010). L'insieme di tali meccanismi co-opera in modo ordinato nel tempo e nello spazio, per assicurare il corretto svolgimento dell'attività modulatoria degli mGluRs di gruppo I.

II.4.4 Ruolo dei recettori del Glu nella neurogenesi

Sebbene sia ormai stabilito che la maturazione del sistema GABAergico precede quella del sistema Gluergico (discussione nel Capitolo I), la proliferazione, migrazione e maturazione neuronale, nell'encefalo sia pre- che post-natale, sono fortemente influenzate dal Glu. Uno dei campi più ampiamente investigati riguarda la maturazione neuritica, intesa come protrusione neuritica e loro differenziamento in assone e dendriti. Nella regolazione di tali processi giocano un ruolo importante, accanto ai chemioattrattanti e i chemiorepellenti, alcuni neurotrasmettitori tra cui il Glu (Kuo et al., 2010) il quale controlla, in particolare, la motilità dei filopodi attraverso l'attivazione dei suoi recettori (Chang e De Camilli, 2001; Schenk et al., 2003). Dati a supporto di tale ipotesi derivano da studi condotti sia *in vivo* che *in vitro*. Gli NMDARs e gli AMPARs giocano ad esempio un ruolo importante nella ramificazione assonica ed arborizzazione dendritica attività-dipendente in *Xenopus laevis* (Haas et al., 2006; Ewald et al., 2008). In colture organotipiche di corteccia visiva di ratto ai primi stadi di sviluppo, l'attivazione degli AMPARs promuove invece la ramificazione assonica nei neuroni degli strati 2/3 (Uesaka et al., 2005). In studi condotti su topi knockout per la subunità NR1 dell'NMDAR è stata riscontrata un'alterazione delle terminazioni assoniche, delle arborizzazioni neuritiche e del patterning dendritico dei neuroni nel nucleo principale del trigemino (Lee et al., 2005a).

In riferimento ai meccanismi con i quali il sistema Gluergico interviene nella maturazione neuritica, attualmente tutte le prove sostengono che si tratti di una modulazione attività neuronale-dipendente. Tuttavia, a parte il Ca^{2+} , la CaMKII e la piccola GTPasi (Takemura et al., 2009), i particolari meccanismi molecolari che permettono la crescita dei neuriti sono ancora in gran parte sconosciuti. In studi recenti, è stato osservato che nel linfoma delle cellule B il fattore 11A-Long (Bcl11A-L), un

fattore trascrizionale “*zinc finger*”, regola negativamente la ramificazione degli assoni e la crescita dei dendriti nelle colture di neuroni ippocampali immaturi (Kuo et al., 2009). In tale sistema, la riduzione di Bcl11A-L promuove la ramificazione e la crescita degli assoni ma incrementa il numero e la lunghezza dei dendriti. Al contrario, l'iper-espressione di Bcl11A-L inibisce la neuritogenesi (Kuo et al., 2009). In aggiunta, Bcl11A-L interagisce con una proteina chinasi serina Ca^{2+} /calmodulina-dipendente (CASK), prodotto proteico di un gene associato alla demenza X-linked (Hsueh, 2009; Kuo et al., 2010), e tale interazione contribuisce a limitare la neuritogenesi (Kuo et al., 2010) oltre che a regolare l'espressione della proteina associata ai microtubuli (MAP)1b (Kuo et al., 2009). In conclusione, questi studi dimostrano che Bcl11A-L è un importante effettore a valle dei recettori del Glu per la regolazione dello sviluppo assonico e dell'arborizzazione dendritica. Nei neuroni giovani, l'attivazione dei recettori del Glu down-regola l'espressione di Bcl11A-L e MAP1b; al contrario, l'over-espressione di Bcl11A-L contrasta l'effetto dei recettori del Glu sulle ramificazioni assoniche e la crescita dendritica. Di particolare interesse è la capacità dei recettori del Glu di regolare i livelli della proteina MAP2c; tuttavia, *map2* non è un gene target di Bcl11A-L (Kuo et al., 2009). Questo risultato suggerisce quindi l'esistenza di almeno due vie NMDAR-mediate coinvolte nella regolazione della morfogenesi degli assoni e dei dendriti (Kuo et al., 2010).

II.5 Citotossicità del Glu

Sebbene l'azione eccitatoria mediata dal Glu sia indispensabile per la corretta maturazione neuronale, è ampiamente riconosciuto come un'eccessiva trasmissione eccitatoria possa determinare la morte neuronale con conseguenti disordini neurologici (Benveniste, 2009; Shijie et al., 2009). Numerosi studi hanno riscontrato elevate concentrazioni (mM) di Glu in una serie di disturbi neurodegenerativi tra cui il morbo di Alzheimer (Lipton e Rosenberg, 1994) l'ischemia cerebrale, l'ipossia, malattie autoimmuni ed encefalomielite (Benveniste, 2009; Shijie et al., 2009). L'azione tossica del Glu può esplicarsi attraverso l'attivazione di due diversi pathways cellulari: eccitotossicità e ossitosi (Herrera et al., 2007). Nel primo caso, l'abnorme attivazione di diversi tipi di recettori ad azione eccitatoria comporta un massiccio afflusso di Ca^{2+} dallo spazio extracellulare all'interno dei neuroni (Bleich et al., 2003). L'ossitosi, al contrario, deriva dall'inibizione competitiva della captazione di cistina, responsabile di una significativa diminuzione del glutatione cellulare e privazione di anti-ossidanti

necessari per combattere lo stress ossidativo. Anche in questo caso si registra, inoltre, un forte incremento del Ca^{2+} intracellulare cui consegue l'attivazione di enzimi Ca^{2+} -dipendenti (Zablocka e Janusz, 2008). L'incremento esponenziale sia dello stress ossidativo che dei livelli intracellulari di Ca^{2+} provocano apoptosi e necrosi delle cellule neuronali (Tan et al., 2001). Numerosi studi, condotti *in vitro* sulla linea cellulare ippocampale di topo HT22, priva dell'enzima caspasi-3, hanno infatti dimostrato che il Glu causa la frammentazione ordinata del DNA scatenando l'evento apoptotico attraverso down ed up-regulation di Bax e Bcl-2, rispettivamente (Zhang et al., 2003). Nelle cellule corticali primarie, al contrario, l'eccitotossicità è strettamente associata all'attivazione della cascata enzimatica delle caspasi che culmina con la produzione di caspasi-3 (Zhang et al., 2005). Quali sono i meccanismi molecolari che sottendono tali cascate? Recenti evidenze riportano che sia la calpaina, una proteasi Ca^{2+} -dipendente, che il fattore di induzione dell'apoptosi (AIF), una flavoproteina ubiquitariamente espressa, possono giocare un ruolo importante nella morte cellulare programmata NMDAR-mediata (fig.II.6; Cande et al., 2002). Brevemente, l'incremento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} determina l'attivazione di diversi enzimi, tra cui l'ossido nitrico sintasi (NOs), e proteasi come le calpaine, spesso coinvolte in disfunzioni mitocondriali (Atlante et al., 2001). La riduzione del potenziale transmembrana mitocondriale è, a sua volta, causa del rilascio della proteina AIF e quindi dell'apoptosi precoce (Brustovetsky et al., 2002). In questa fase si realizza la migrazione della proteina AIF nel citosol e in seguito nel nucleo, dove determina la condensazione della cromatina nucleare e la rottura in frammenti di DNA ad elevato peso molecolare, attraverso un meccanismo caspasi-indipendente (Yu et al., 2002; Zhang et al., 2002). Sebbene siano stati identificati diversi targets subcellulari per il clivaggio operato dalla calpaina, tra cui la spettrina, proteine associate ai microtubuli (MAP), tau e neurofilamenti, l'esatto ruolo fisiologico svolto da questa proteasi rimane sconosciuto (Rami, 2003). E' invece nota la possibilità di ridurre i danni neuronali calpaina-mediati in seguito all'inibizione della sua attività in una fase precoce (Debiasi et al., 1999). Alcuni studi condotti *in vitro* hanno rivelato la capacità degli estrogeni di agire da antiossidanti in condizioni di stress ossidativo, svolgendo quindi un ruolo neuroprotettivo (Zhang e Bhavnani, 2005). I dati ottenuti hanno solo parzialmente rivelato i meccanismi alla base della neuroprotezione da essi mediata, suggerendo come processi chiave la modulazione dell'espressione di alcuni geni appartenenti alla famiglia

Bcl-2, alle proteine caspasi-3, all'inibizione del rilascio del citocromo c dai mitocondri nel citosol, e la prevenzione della frammentazione del DNA (Zhang e Bhavnani, 2005).

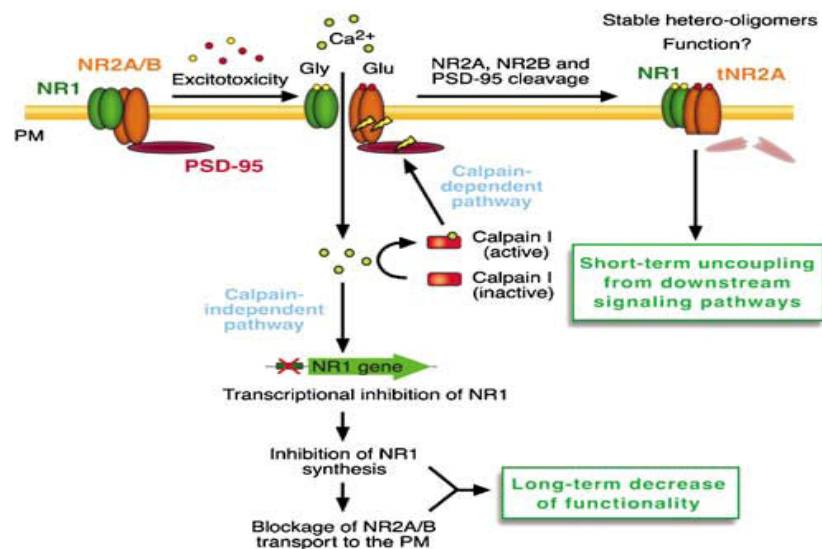


Fig.II.6. Regolazione dell'NMDAR durante l'eccitotossicità e l'ischemia. L'eccessiva attivazione degli NMDARs, che contengono le subunità NR2B, porta ad un sovraccarico di Ca^{2+} nei neuroni post-sinaptici e determina l'attivazione della calpaina proteasi Ca^{2+} -dipendente. Queste proteasi tagliano la regione C-terminale delle subunità NR2A e NR2B, la PSD-95 e la proteina citoscheletrica del cervello spectrina. Il complesso, formato dalla subunità NR1 e i frammenti N-terminale di NR2A (t NR2A), privo di sequenze importanti per le interazioni con il sistema del segnale intracellulare e la proteine scaffold, diventa stabile nei neuroni over-attivati. L'elevata concentrazione di Ca^{2+} è anche responsabile del blocco trascrizionale della subunità NR1 del NMDAR, oltre che della downregulation di NR2, tali meccanismi influenzano NMDAR (modificato da Gascón et al., 2008).

II.6 Altri fattori coinvolti nel differenziamento neuronale

I neuroni estendono due tipi di processi citoplasmatici quali assoni e dendriti, guidati nel loro sviluppo da un cono di crescita composto da filipodi e lamellipodi entrambi caratterizzati da movimenti ameboidi. Gli assoni ed i dendriti differiscono sia funzionalmente che morfologicamente, poichè gli assoni spesso percorrono lunghe distanze per raggiungere i loro bersagli, ove sviluppano branche terminali, ed i loro coni di crescita sono convertiti in terminazioni presinaptiche. I dendriti, invece, non si estendono per lunghe distanze ma sono capaci di arborizzare sviluppando in superficie le spine dendritiche, importanti siti di sinapsi eccitatorie, il cui turnover è coinvolto nei processi di apprendimento e memoria. Lo sviluppo di tutte le componenti neuronali è strettamente associato all'actina citoscheletrica preposta alla modulazione del processo di crescita, coordinamento dell'organizzazione assonica, morfogenesi dei dendriti e delle spine dendritiche e formazione e stabilizzazione delle sinapsi (Luo, 2002).

Le molecole di adesione cellulare (NCAMs) svolgono un ruolo importante nello sviluppo neuronale, nella rigenerazione e nei processi di plasticità (Hinsby et al., 2004). Le loro tre principali isoforme (120, 140, 180 kDa) sono generate dallo splicing alternativo di un mRNA codificato da un singolo gene. La NCAM180 ed la NCAM140 sono proteine transmembrana e le uniche espresse dai neuroni, mentre la NCAM120 è legata alla membrana plasmatica. Le NCAMs possono promuovere l'estensione del neurite attraverso interazioni omofile (NCAM-NCAM) oppure eterofile (NCAM-Fibroblast growth factor receptor; FGFR; Kiselyov et al., 2003, 2005; Soroka et al., 2003). In particolare il complesso NCAM-FGFR promuove la fosforilazione del recettore che guida l'attivazione di una fosfolipasi specifica $C\gamma$, fino all'attivazione di secondi messaggeri a valle che provocano l'influsso di Ca^{2+} nel citoplasma e inducono l'estensione del neurite (Walmod et al., 2004; Kiryushko et al., 2006). Anche le interazioni omofile danno inizio a processi di trasduzione del segnale attraverso una tirosin-chinasi (Fyn) e attraverso una chinasi di adesione focale (Fak; Walmod et al., 2004). Le NCAMs interagiscono anche con i principali elementi del citoscheletro, in quanto sia la NCCAM140 che la NCAM180 possono associarsi con α - e β -tubulina (Buttner et al., 2003) e la NCAM180 si lega anche alla spectrina cerebrale che a sua volta può interagire con multipli bersagli quali i filamenti di actina, canali Na^+ voltaggio-dipendenti ed acidi fosfolipidici (Leshchyn'ska et al., 2003).

Le proteine efrine ed i loro recettori (Eph) sono proteine ancorate alla membrana, che mediano il contatto cellula-cellula svolgendo un ruolo determinante nei processi di sviluppo del SNC, soprattutto nella migrazione cellulare e assonica e nella formazione delle sinapsi (Martinez and Soriano, 2005). Sia i ligandi che gli Eph vengono classificati in un gruppo A ed in un gruppo B; in particolare il genoma dei Vertebrati codifica 15 tipi di recettori, 6 tipi di ligandi A e 6 tipi di ligandi B (Gale et al., 1996; Menzel et al., 2001). Gli Eph in seguito al legame con il ligando attivano piccole proteine GTPasi appartenenti alla famiglia Rho; in particolare EphA5 attiva RhoA ed il fattore Rac, stimolando la contrazione del cono di crescita e la retrazione dei lamellipodi e dei filopodi (Shamah et al., 2001; Fournier et al., 2003; Tanaka et al., 2004). Anche i recettori EphB interagiscono con proteine della famiglia Rho ed in particolare EphB2, in seguito all'interazione con intersectina e calirina, attiva il processo di morfogenesi delle spine (Irie and Yamaguchi, 2002; Penzes et al., 2003). Oltre all'effetto sulla regolazione delle proteine Rho, l'interazione efrina/Eph modula anche l'attività delle proteine appartenenti alla famiglia Ras, che sono coinvolte in

diversi processi di sviluppo quali la guida dell'assone e l'adesione cellulare (Elowe et al., 2001; Forcet et al., 2002). La proteina efrina e gli Eph sono espressi nell'HIP a livello embrionale a diversi stadi dello sviluppo postatale (Liebl et al., 2003). Per quanto riguarda invece i ligandi, l'espressione di efrina-A3 prevale nell'HIP perinatale (Stein et al., 1999), mentre l'espressione di efrina-A5 è presente in tale regione subito dopo la nascita e rimane espressa a bassi livelli nell'adulto (Yun et al., 2003). Sebbene la coespressione di distinti mRNA di efrina-A e dei Eph può avvenire nelle stesse cellule principali dell'HIP, la localizzazione delle proteine è differenziata. Anche gli EphB ed i loro ligandi sono espressi nell'HIP ed in particolare gli mRNA di EphB1/B3 si esprimono dagli stadi embrionali fino agli stadi adulti (Liebl et al., 2003), mentre i ligandi efrina-B1/B3 si esprimono moderatamente nelle prime fasi dello sviluppo. Nel differenziamento ippocampale, infine, mentre il tipo A è coinvolto in processi che avvengono durante le fasi perinatali e subito dopo la nascita, il tipo B svolge un ruolo chiave nei processi tardivi dello sviluppo ippocampale, come nei processi di maturazione e plasticità sinaptica (Martinez e Soriano, 2005).

Anche la proteina associata ai microtubuli del tipo 1B (MAP1B) è una delle principali proteine del citoscheletro associate alla crescita nelle cellule neuronali e gliali; è importante nello stabilizzare i microtubuli durante l'allungamento dei dendriti e degli assoni, viene modulata mediante fosforilazione ed influenza la stabilità di microtubuli e microfilamenti, regolando la motilità del cono di crescita. Considerando le sue grandi dimensioni (peso molecolare compreso tra 320-330 KDa), essa risulta coinvolta in numerose interazioni proteiche che oltre a contribuire alla stabilità del citoscheletro sono anche coinvolte in alcune patologie neurodegenerative (Riederer, 2007). Altre proteine, appartenenti alla famiglia SNARE, sono coinvolte nel processo di allungamento del neurite oltre che nel meccanismo di fusione delle vescicole a livello sinaptico. La famiglia delle proteine SNARE comprende le proteine VAMP, SNAP-25 e la syntaxina. È stato osservato che se VAMP-2 è espressa in grande quantità si ha l'induzione dell'allungamento del neurite, a differenza degli effetti derivanti dall'overespressione di SNAP-25 che si traducono nel fenomeno dello sprouting neuritico (Kimura et al., 2003).

I segnali modulatori estrinseci sono essenziali nel controllo dello sviluppo assonico e dendritico. Tra essi, i fattori trofici peptidici, quali le neurotrofine, sono i segnali estrinseci più forti nella promozione della crescita assonica e dendritica, mentre molecole della matrice extracellulare come la laminina, l'eparina solfato e i

proteoglicani, e molecole di adesione cellulare come le caderine promuovono la crescita assonica sia *in vivo* che *in vitro* (Markus et al., 2002; Goldberg et al., 2003). Il processo di regolazione della crescita dei prolungamenti neuronali mostra anche una significativa componente intrinseca che comprende numerosi fattori di trascrizione quale ad esempio Brn3b, importante nello sviluppo delle cellule retinali gangliari (Wang et al., 2000) ed il fattore di trascrizione nucleare CREST, Ca^{2+} -dipendente, che è importante nel processo di maturazione dendritica a livello corticale e ippocampale (Aizawa et al., 2004). Pathways di segnale intracellulare, mediati dall'ingresso di Ca^{2+} , attivano le CaMKs stimolando la crescita dendritica ed assonica in colture ippocampali o corticali (Redmond et al., 2002; Fink et al., 2003). Tra le CaMKs, in particolare la CaMKII- β è in grado di aumentare la velocità dell'estensione dei dendriti e le loro diramazioni nell'HIP, mentre CaMKI è responsabile dell'estensione dell'assone e della motilità del cono di crescita (Wayman et al., 2004). Per quanto riguarda la CaMKII, essa attiva mediante fosforilazione un altro fattore di trascrizione Neuron D che è coinvolto nella regolazione della crescita dendritica (Gaudillier et al., 2004).

Marcatori strutturali dello sviluppo neuronale

Lo studio del differenziamento cellulare si avvale dell'utilizzo di alcuni marker neuronali che possiedono caratteristiche ben precise, in quanto sono abbondantemente espressi in tutta la cellula neuronale e la loro espressione può essere non solo confinata a specifiche porzioni strutturali (dendriti e assoni) ma anche seguire un tipico pattern durante lo sviluppo. I marcatori strutturali più comunemente utilizzati per la caratterizzazione neuronale appartengono alla famiglia delle proteine citoscheletriche note come β -tubuline, che comprende sette classi di geni che codificano per le diverse tubuline, ma solo una, quella di classe III, è considerata un marker esclusivamente neuronale. La localizzazione della proteina nucleare NeuN è ampiamente utilizzata nella ricerca e nella diagnosi per identificare i neuroni postmitotici, poiché essa è un marker della capacità proliferativa ed i suoi livelli d'espressione possono essere indicativi degli stati fisiologici dei neuroni postmitotici (Lind et al., 2005). Alcuni marcatori sono comunemente utilizzati nello studio di svariate patologie neurodegenerative, quali la calcineurina, un marcatore neuronale dei tumori cerebrali; NSE (neuron-specific-enolase), quale marker specifico di cellule endocrine e nervi enterici oltre ad essere un indicatore del danno neuronale *in vitro*; TGF-beta (transforming growth factor-beta), un marker endogeno dello stress neuronale (Ali et

al., 2001). Alcuni marcatori sono localizzati in maniera specifica in alcune porzioni strutturali del neurone, quale ad esempio la MAP2, un marker del differenziamento neuronale che stabilizza i microtubuli nei dendriti dei neuroni postmitotici e risulta essenziale nei processi iniziali dello sviluppo morfogenetico neuronale e nel mantenimento della morfologia neuronale negli stadi di sviluppo più avanzati (Soltani et al., 2005). Ad oggi, sono state identificate venti isoforme di MAP (Maccioni et al., 1995), ciascuna in grado di svolgere la propria funzione modulatoria attraverso il legame agli elementi citoscheletrici quali microfilamenti (actina) e microtubuli (tubulina). La MAP2 in particolare, rappresenta una delle isoforme maggiormente espresse a livello neuronale (Matsunaga et al., 2002). La MAP2 è caratterizzata da tre o quattro domini all'estremità C-terminale, coinvolti nel legame ai microtubuli, e da un dominio in prossimità della regione N-terminale responsabile dell'interazione con la subunità regolatoria II (RII) di una PKA c-AMP dipendente, ampiamente coinvolta nei processi molecolari che sottendono la formazione della memoria a lungo termine (Malleret et al., 2001). Nell'HIP, l'espressione della MAP2 decresce con l'età e tale variazione potrebbe essere associata all'indebolimento delle funzioni menmoniche correlate all'età (Di Stefano et al., 2001). La MAP2 è considerata un importante marker di integrità strutturale grazie al suo coinvolgimento nel rimodellamento dei processi dendritici (fig. II.7). Nel corso dello sviluppo postnatale, l'espressione della MAP2 coincide, infatti, con le diverse fasi di maturazione dei processi neuronali, quali lo sprouting e branching dendritico (Johnson e Jope, 1992). Tale dato è in accordo con la ridotta densità e lunghezza dei microtubuli, osservate a livello dendritico, in seguito ad una delezione del gene della MAP2, in un meccanismo che coinvolge l'attività della PKA in colture di neuroni ippocampali (Harada et al., 2002).

La proteina GAP43 è una fosfoproteina specifica neuronale la cui espressione è usata come indicatore della crescita assonica e della formazione di nuove sinapsi (Casoli et al., 2001). La GAP43 è ancorata sul versante interno della membrana plasmatica attraverso due cisteine palmitoilate in posizione 3 e 4 (Laux et al., 2000; He and Meiri, 2002) e può essere fosforilata dalla caseina chinasi II (CKII) a livello dei residui di serina 191 e 192. E' stato anche dimostrato che la GAP43 interagisce con la F-actina stabilizzando i lunghi filamenti di actina ed è in grado di legare la proteina spectrina cerebrale che a sua volta interagisce con la NCAM180. Ne consegue che la GAP43 e la NCAM possono coesistere in complessi a livello della membrana plasmatica e avere funzioni interdipendenti (Korshunova et al., 2007).

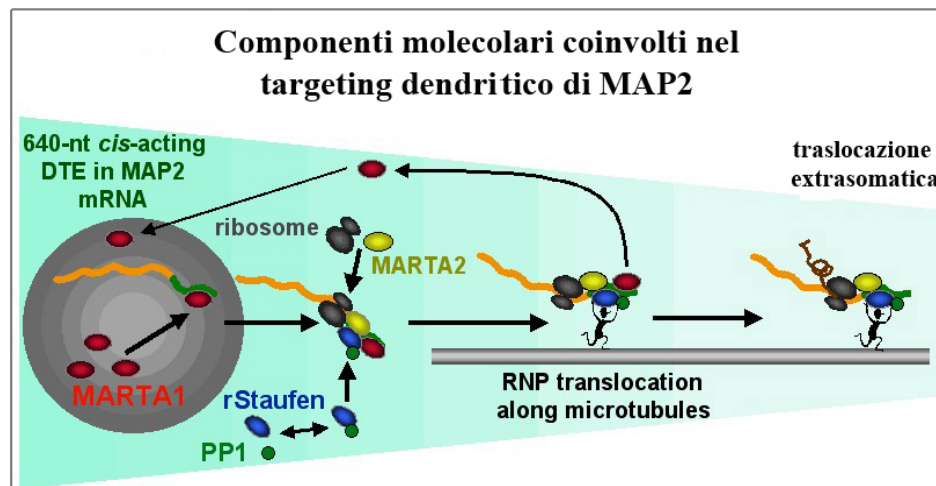


Fig. II.7. Meccanismo responsabile del targeting dendritico della MAP2. L'mRNA della MAP2 comprende l'elemento di targeting dendritico (DTE) localizzato all'UTR 3' del trascritto; due proteine, di 90 e 65 kDa, MARTA1 e MARTA2 rispettivamente legano il DTE regolando il trasporto del trascritto verso i dendriti e la sua traduzione (modificato da Rehbein et al., 2000).

La GAP43 può essere fosforilata anche dalla PKC (Shen et al., 2002), processo che risulta determinante per la stabilizzazione dei filamenti di actina e può essere stimolato da molecole di adesione cellulare appartenenti alla superfamiglia Ig (IgSF-CAMs; Demyanenko et al., 1999). La funzione cellulare della GAP43 risulta strettamente dipendente da Ca^{2+} , poiché la GAP43 si lega alla calmodulina quando i livelli di Ca^{2+} sono bassi, mentre la rilascia quando i livelli di tale ione aumentano. Questa regolazione dose-dipendente suggerisce che la calmodulina possa agire come un regolatore negativo durante i periodi di bassa attività per i neuroni (Neve et al., 1998).

Negli ultimi anni, il complesso programma molecolare che sottende gli eventi della sinaptogenesi nell'encefalo immaturo, ha rappresentato uno dei principali campi di investigazione per i neurobiologi. A tale scopo, numerose evidenze sperimentali suggeriscono l'utilità della sinaptofisina (Syn) come marker di maturazione neuronale (Viberg, 2009), oltre che come indicatore di neurodegenerazione in seguito a situazioni di stress (Eastwood e Harrison, 1999). La Syn, appartenente alla famiglia delle proteine integrali MARVEL (Sanchez-Pulido et al., 2002), è una glicoproteina di 38 kDa coinvolta nel *trafficking* e secrezione delle vescicole sinaptiche; questa, insieme alla sinapsina, rappresentano le maggiori proteine espresse a livello delle terminazioni sinaptiche. Da un punto di vista strutturale presenta quattro α -eliche transmembrana, due loops intravescicolari ed estremità N- e C-terminale citoplasmatici; quest'ultima regione comprende, inoltre, un motivo di legame per il Ca^{2+} (fig. II.8; Evans e Cousin, 2005).

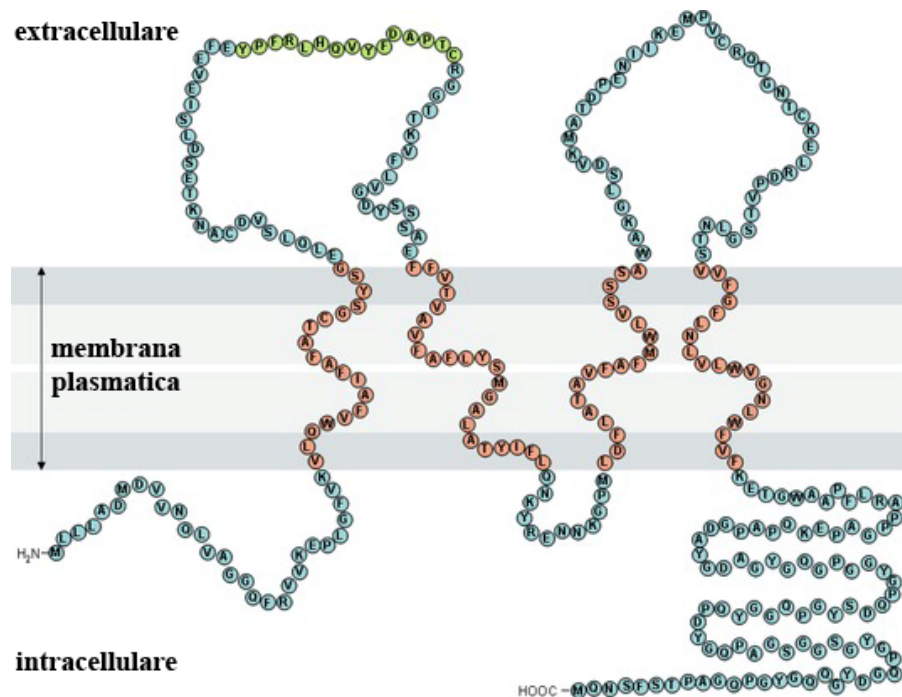


Fig. II.8. Rappresentazione schematica della sinaptofisina.

Nel corso dello sviluppo embrionale, l'espressione della Syn inizia a E18, raggiungendo subito dopo un plateau a P14 (Li et al., 2009). Altri studi riportano, invece, che i livelli di Syn nell'HIP postnatale aumentano lievemente nella prima settimana, per poi subire un incremento pressochè costante fino al termine del primo mese di sviluppo (Viberg, 2009). Tali variazioni sono in accordo con il diverso pattern temporale dei processi di sinaptogenesi tra le aree encefaliche. Nelle sinapsi dello SLM del DG dei ratti, in particolare, a P11 è presente già il 5% della concentrazione adulta di sinapsi. Tuttavia, il numero delle sinapsi aumenta di cento volte fino a P25, mentre non si registrano ulteriori aumenti fino a P90 (Marrone e Petit, 2002). Numerosi studi riportano una relazione tra la riduzione dei livelli di Syn a livello sinaptico e l'età; si nota, infatti, come la densità delle proteine associate alle vescicole sinaptiche aumenti durante la fase adulta mentre si riduce notevolmente con l'età (Rutten et al., 2005). Un simile decremento è osservato nel corso di fenomeni neurodegenerativi (Eastwood e Harrison, 1999), sottolineando ulteriormente l'utilità della Syn come marcatore di danno sinaptico.

MATERIALI E METODI

Materiali e Metodi

III.1 Modello sperimentale

Caratteristiche biologiche di *Mesocricetus auratus*

Per il presente lavoro di tesi si è deciso di utilizzare criceti Siriani dorati (*Mesocricetus auratus*) appartenenti all'ordine dei Roditori (tab. III.1.). Questi piccoli Mammiferi sono utilizzati come modello sperimentale al pari di topo e ratto grazie ad alcune loro peculiarità: scarsa suscettibilità alle malattie spontanee, rapido sviluppo con ciclo vitale breve e capacità di entrare in ibernazione, più o meno facilmente, in particolari condizioni sperimentali. Il ciclo di ibernazione rappresenta, inoltre, una condizione stato-specifica particolare per tali animali, in quanto alcune sue fasi ed in particolare il risveglio presenta delle caratteristiche simil-ischemiche che costituiscono un ottimo modello per gli studi neurodegenerativi (Canonaco et al., 2005).

Tipo	CORDATI
Sezioni	VERTEBRATI
Classe	MAMMIFERI
Sottoclasse	TERI
Ordine	RODITORI
Sottordine	SIMPLICIDENTATI (MIOMORFI)
Superfamiglia	MUROIDEI
Famiglia	CRICETIDI
Sottofamiglia	CRICETINI DEL VECCHIO MONDO
Genere	MESOCRICETUS
Specie	<i>Mesocricetus auratus</i>

Tabella III.1. Classificazione sistematica di *Mesocricetus auratus*.

In genere, la femmina è leggermente più grande del maschio, pesa infatti dai 150 ai 180 grammi contro i 120-170 grammi del maschio. Il criceto dorato ha pelliccia folta e rossiccia, più chiara inferiormente, testa di colore dorato, mentre i fianchi sono grigio-gialli. Viene infatti definito "dorato" in relazione alla colorazione dorata e marroncina (fig. III.1). La coda è corta e pelosa ed il corpo presenta una forma tozza e robusta, con

una grossa testa in cui nasconde delle tasche guanciali. Il muso è ottuso, le orecchie grandi, occhi vivacissimi e scuri di forma arrotondata e labbra con un gran numero di vibrisse. Le zampe sono brevi, quelle anteriori tetradattili, quelle posteriori pentadattili e munite di forti unghie. Sui fianchi, all'altezza dell'ultima costola, i criceti dorati hanno delle ghiandole scure che usano per marcare il territorio. Il cranio possiede archi zigomatici molto evidenti, e presentano tasche guanciali per immagazzinare e proteggere la prole; tra i sensi presentano udito ed olfatto, un senso del tatto molto fine esercitato dalle vibrisse della regione della labbra, ed anche un senso della vista molto evoluto; il criceto dorato è infatti in grado di percepire i colori.



Fig. III.1. Esemplare di *Mesocricetus auratus*.

Di indole scontrosa ma non paurosa, irascibili vivono in genere per proprio conto; crepuscolari e notturni ma capaci di svolgere piena attività anche di giorno, agili nei movimenti, buoni corridori. Il carattere che contraddistingue questo ordine di Mammiferi è la dentatura: mancano del tutto i canini e i premolari mentre gli incisivi, molto pronunciati e a crescita continua, sono foggianti a scalpello taglientissimo che gli animali utilizzano non solo per tritare il cibo, ma anche come arma di difesa. Il criceto dorato ha una vita media di 2 anni, in natura vive fino a 4 anni, ma in cattività massimo fino a 2-3. A causa della loro breve vita, crescono rapidamente e diventano sessualmente maturi a partire dall'età di 30 giorni. L'accoppiamento ha luogo al termine di vivaci duelli. I criceti si riproducono solo in dati periodi dell'anno, basando i loro periodi di attività sessuale sulla durata gestazionale della specie, in modo che la nascita avvenga durante la primavera o l'estate quando le risorse di cibo sono molte e le richieste energetiche per i processi omeostatici quali la termoregolazione sono basse, aumentando in tal modo il numero di calorie disponibili per supportare l'allattamento.

La gestazione dura 18 giorni ed è la più breve tra i Mammiferi, fatta eccezione per i Marsupiali. Il periodo riproduttivo ha inizio all'età di appena due mesi e mezzo e la femmina può partorire da 6 a 12 piccoli per 7-8 volte l'anno. I piccoli di colore rosa alla nascita sono ciechi, ma hanno già i denti; non hanno il pelo, e hanno un peso di soli 2g, che aumenta progressivamente fino a raggiungere il peso dell'adulto dopo circa 2 mesi (fig. III.2). A 2 giorni esibiscono uno strato di peluria, a 5 il pelo è totalmente formato, a 10 giorni i piccoli aprono gli occhi e incominciano a girare per la gabbia, a circa 15 giorni iniziano a mangiare anche cibo solido ma hanno ancora bisogno di essere allattati. Dopo tre settimane circa la cucciolata può definirsi svezzata.



Fig. III.2. Piccoli di *Mesocricetus auratus*.

Il criceto dorato rappresenta un ottimo esempio di Mammifero ibernante facoltativo a breve termine, con periodi di ibernazione che vanno dai tre giorni alle tre settimane per anno. L'ibernazione è una condizione biologica in cui le funzioni vitali sono ridotte al minimo, il battito cardiaco e il respiro rallentano, il metabolismo si riduce e la temperatura corporea si abbassa. L'animale entra in tale condizione fisiologica in condizioni ambientali non favorevoli, come temperature rigide, scarsità di cibo e mancanza di ossigeno. La temperatura è un fattore molto importante nell'esistenza di questo piccolo animale, soprattutto perché non essendo dotato di ghiandole sudoripare è a rischio in condizioni di ipertermia. La sua temperatura ideale è compresa fra 18°C ed i 21°C. L'encefalo dell'animale ibernante si trova in una condizione di profonda depressione fisiologica ma la sua integrità funzionale viene mantenuta: il sistema nervoso centrale (SNC) ibernante garantisce infatti il controllo posturale e la sensibilità agli stimoli interni ed esterni. Il periodo di ibernazione viene interrotto da piccoli intervalli di eutermia (24-48h), durante i quali gli animali si risvegliano, considerati come una transizione tra due distinti stadi omeostatici del SNC, rispettivamente lo stato non ibernante (stato eutermico) e quello ibernante. L'ibernazione rappresenta una

strategia adattativa il cui obiettivo principale è garantire la sopravvivenza dell'organismo in condizioni ambientali estreme, attraverso l'alterazione fisiologica di diversi parametri che al momento opportuno vengono ristabiliti entro i limiti della normalità; molte delle variazioni osservate sembrano avere lo scopo ultimo di ridurre al massimo il dispendio energetico. Importanti caratteristiche sono costituite dallo slittamento del metabolismo dei carboidrati a quello degli acidi grassi, dall'inibizione dell'attività glicolitica e dalla capacità di mobilitare le riserve lipidiche, anche quando il metabolismo è ridotto all'1%, per far fronte alla bassa temperatura corporea (Buck et al., 2000). Gli ibernanti, inoltre, sono gli unici a resistere all'aritmia cardiaca, tipica della condizione ipotermica, soprattutto grazie alla capacità di mantenere l'equilibrio di calcio (Ca^{2+}).

III.2 Colture cellulari ippocampali

Animali

Per questo studio sono stati utilizzati criceti (Charles River Calco, Italia) allo stadio di sviluppo PND1-3, mantenuti in condizioni di fotoperiodo 12h:12h. Essi sono stati sacrificati per effettuare il prelievo dell'encefalo e procedere alla dissezione della formazione ippocampale. Il mantenimento degli animali e tutte le procedure sperimentali sono stati condotti in accordo con le Linee-Guida per la Cura e l'Uso degli Animali da Laboratorio, secondo il Consiglio Direttivo della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/EEC). Gli esperimenti sono stati effettuati cercando di ridurre al minimo il numero e la sofferenza delle cavie usate.

Dissezione dell'ippocampo

Un'adeguata qualità dell'ippocampo (HIP) al momento del prelievo si rivela fondamentale per la resa cellulare al momento dell'allestimento delle colture. A tal fine, risulta estremamente importante concludere la fase del prelievo nel più breve tempo possibile. I piccoli di *Mesocricetus auratus*, negli stadi compresi tra PND1-3, vengono decapitati e successivamente l'encefalo è prelevato dalla scatola cranica, rimuovendo accuratamente le meningi che lo avvolgono. In seguito all'isolamento dell'encefalo, si procede con la dissezione dell'ippocampo (HIP) mediante stereomicroscopio (10X), attraverso l'ausilio di materiale e strumenti per la dissezione rigorosamente sterili (fig. III.3).

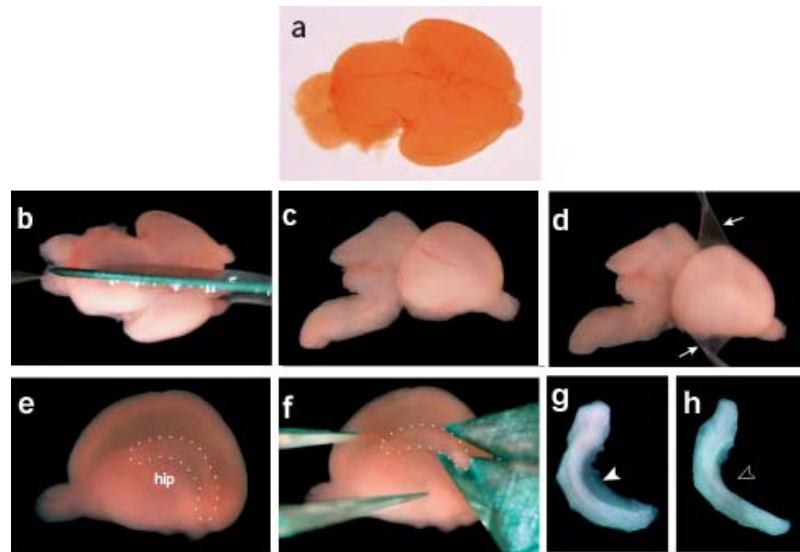


Fig. III.3. Metodo di dissociazione dell'HIP dall'encefalo di cricetini (PND1-3), in cui è possibile visualizzare in basso l'HIP al termine del prelievo (h).

Poiché il margine interno dell'HIP si presenta libero ed il ventricolo laterale giace sul suo profilo laterale, per separare l'HIP dal tessuto circostante sono richiesti dei tagli solo sul versante esterno ed all'estremità anteriore e posteriore dello stesso. Una volta isolato, l'HIP viene rapidamente immerso in **soluzione 1** (*Neurobasal Medium A* e BSA 0,02%), che ne preserva l'integrità e la vitalità fino alla fase di dissociazione.

Protocollo di isolamento e messa in coltura di cellule ippocampali

Una coltura di cellule *in vitro* consiste nella fase di isolamento delle cellule da un tessuto e nella loro crescita in presenza di tutti i fattori e i metaboliti necessari. A tale scopo, è stato utilizzato un protocollo, precedentemente ottimizzato presso il Laboratorio di Neuroanatomia Comparata, in grado di fornire una buona resa cellulare ed un'apprezzabile vitalità. I campioni di HIP, che sono stati prelevati secondo la modalità sopra descritta e mantenuti in **soluzione 1**, vengono processati secondo le seguenti fasi sperimentali:

- 1) per la fase di digestione: dalla Falcon da 15 ml si rimuove la **soluzione 1** e si aggiunge la **soluzione 2** (*Neurobasal Medium A* + Papaina 0,1% + BSA 0,02%) per 20 min a 37°C;
- 2) al termine della digestione, quando i tessuti sono sedimentati, rimuovere gentilmente i sopranatanti contenenti papaina ed aggiungere la **soluzione 3** (mezzo di coltura: *Neurobasal medium A* + Supplemento B27 + Antibiotici + glutammina 0,5 mM + β -FGF 5 ng/ml) al sedimentato a temperatura ambiente;

- 3) per la fase di triturazione: spipettare 40 volte con pipette di plastica monouso per dissociare gli aggregati, quindi lasciare riposare per 5 min. Rimuovere i sopranatanti e aggiungere la **soluzione 4** (Neurobasal medium + inibitore della tripsina 1% + BSA 1% + Antibiotici). Spipettare 10 volte con Pasteur di vetro e lasciare riposare per 10 min. Aspettare che gli aggregati sedimentino, prelevare con pipette Pasteur di vetro ad apertura piccola e trasferire i campioni in tubi da centrifuga da 15 ml;
- 4) centrifugazione: 1300 rpm per 10 min a temperatura ambiente;
- 5) analisi della vitalità: le cellule pellettate sono risospese in mezzo di coltura (**soluzione 3**). A questo punto viene effettuata la conta cellulare secondo il metodo del Trypan Blue, per il quale il numero di cellule vive/ml = media cell vive x 100.000;
- 6) piastramento: una volta effettuata la conta cellulare e determinato il numero di cellule, esse vengono pilastrate con una densità di piastramento di 16×10^3 cell/cm² in mezzo di coltura (**soluzione 3**). Ciascuna piastra, con un diametro di 1,8 cm e una superficie totale di 2,5 cm², è stata in precedenza condizionata con mezzo di coltura. Per ridurre la proliferazione gliale si può aggiungere Ara C al secondo giorno di coltura e rimuoverlo al 4 giorno di coltura.
- 7) mantenimento delle colture cellulari: il mezzo di coltura delle cellule ipocampali primarie è cambiato 4 giorni dopo il terzo giorno, sostituendo metà del mezzo di coltura, avendo cura di non sostituire mai completamente il mezzo. Per quanto riguarda il fattore di crescita β -FGF, la sua concentrazione di utilizzo è di 5ng/ml fino al 4° giorno e 10 ng/ml dopo il 4° giorno. Le cellule in coltura crescono su piastre multiwell polilisiniate all'interno di un incubatore in cui l'atmosfera è mantenuta a concentrazioni fisse di anidride carbonica (5%), ad un'umidità del 90% e ad una temperatura di 37°C.

III.3 Caratteristiche morfologiche dei neuroni su due sistemi di coltura (in collaborazione con l'ITM-CNR)

Supporti a membrana

In seguito all'ottimizzazione del protocollo per l'allestimento delle colture neuronali da HIP si è deciso di confrontare due diversi sistemi di coltura. Sebbene la tradizionale piastra Petri garantisca infatti la sopravvivenza neuronale, essa non è in grado di mimare le condizioni di adesione cellulare necessarie per una corretta

maturazione neuronale. Al contrario, recenti evidenze suggeriscono la forte applicabilità di particolari membrane al fluorocarbonio (FC; fig. III.4) permeabili all'ossigeno, all'anidride carbonica (CO₂) ed al vapor acqueo, le cui proprietà risultano vantaggiose in quanto una diretta ossigenazione delle cellule consente loro di aderire strettamente alla superficie della membrana (De Bartolo et al., 2007). Entrambi i sistemi di coltura sono stati trattati con poli-L-lisina, disciolta in una soluzione di acido borico:tetraborato di sodio (1:1) ad una concentrazione finale di 0,1 mg/ml che nel caso della membrana FC garantisce una densità di distribuzione dei gruppi funzionali pari a 40 µg/cm². Tutti i passaggi sono realizzati in un incubatore con CO₂ 5% e a 37°C.

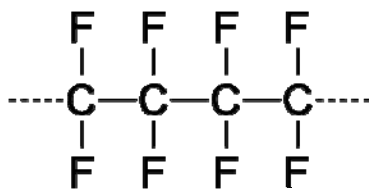


Fig. III.4. Struttura molecolare del politetrafluoroetilene (nome commerciale: teflon). E' un polimero composto da una catena di unità più piccole che si ripetono. Queste ultime contengono due atomi di carbonio e quattro di fluoro. La presenza degli atomi di fluoro tutto intorno al carbonio rende tale materiale insolubile in ogni solvente, non infiammabile e resistente a un calore di circa 300 °C.

Caratterizzazione delle membrane FC (ITM-CNR)

La caratterizzazione morfologica delle membrane è stata mirata alla valutazione delle dimensioni medie dei pori, la distribuzione degli stessi, lo spessore e la rugosità. A tal fine, campioni essiccati di membrana sono stati tagliati e ricoperti con uno strato metallico, per renderli analizzabili al microscopio a scansione (De Bartolo et al., 2008).

III.3.1 Saggi metabolici

Il mezzo di coltura ricavato dalla sostituzione con mezzo fresco, secondo il protocollo ottimizzato, è stato conservato in tubi da 1,5 ml a -80°C fino ai successivi saggi metabolici. Sono stati valutati in particolare il consumo di glucosio, la produzione di lattato e di BDNF dei neuroni cresciuti su membrane FC e confrontati con i medesimi parametri di neuroni cresciuti su piastra Petri.

Consumo di glucosio

Nel primo caso, la concentrazione di glucosio è stata valutata attraverso il kit Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, Monza, Italy), un metodo molto rapido che richiede una bassa quantità di mezzo (2-4 µl). Il kit consiste in una serie di strisce reattive, un *chip* codificatore ed uno strumento elettronico di misurazione, che consente di valutare

la concentrazione di glucosio presente nel campione attraverso la rilevazione di un piccolo segnale di corrente elettrica. Il volume necessario di mezzo di coltura viene depositato sulla striscia reattiva sulla quale è immobilizzato l'enzima glucosio deidrogenasi. Quest'ultimo, in presenza del coenzima pirrolochinolidina chinone (PQQ), è in grado di catalizzare la conversione del glucosio in gluconolattone, reazione che genera una debole corrente continua, rilevata dallo strumento ed espressa in termini di concentrazione di glucosio in mg/dl. Lo strumento consente di determinare i valori di [glucosio] compresi in un range di 10-600 mg/dl.

Produzione di lattato

La concentrazione di lattato in coltura, considerata un ottimo indicatore del grado di anaerobiosi in cui vivono le cellule, è stata invece determinata attraverso il metodo colorimetrico enzimatico Lactate Dry-Fast (Sentinel, Milan, Italy), basato sulla reazione catalizzata dall'enzima lattato-ossidasi. Il lattato viene prodotto nel ciclo di Cori, per conversione anaerobia del glucosio. In presenza dell'enzima lattato-ossidasi, esso viene ossidato a piruvato con conseguente produzione di perossido d'idrogeno (H_2O_2). L' H_2O_2 così liberato nell'ambiente di reazione, reagisce per intervento dell'enzima perossidasi (POD) con un composto cromogeno, l'N-etil-N-(2-idrossi-3-sulfopropil)-3-metilnilina o TOOS, ossidandolo e determinandone la trasformazione in un prodotto di colore violetto, capace di emettere radiazioni elettromagnetiche alla lunghezza d'onda di $\lambda = 550$ nm. L'assorbanza del campione viene rilevata attraverso analisi spettrofotometriche: la stechiometria della reazione è tale per cui la concentrazione di prodotto colorato sarà proporzionale al substrato di partenza e dunque l'intensità della colorazione proporzionale alla concentrazione di lattato presente nel campione in esame. Il test consente di determinare valori di [lattato] compresi in un range di 1-150 mg/dl con una sensibilità di 1 mg/dl.

Dosaggio del BDNF

La crescita, lo sviluppo e il differenziamento neuronale sono stati monitorati attraverso il dosaggio del BDNF, grazie ad un metodo di analisi immunologia, il BDNF Emax Immunoassay System (promega Corporation, Madison, USA). Il dosaggio rispecchia un test ELISA (l'acronimo dell'espressione inglese Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) di tipo non competitivo e diretto, definito anche DAS-ELISA. Sono di seguito riportate le fasi sperimentali:

- Immissione della soluzione di coating (1:1 Sodio Bicarbonato/Sodio Carbonato e 0,05% tween 20), contenente l'Ab primario monoclonale specifico per l'antigene (BDNF) da individuare, nei 96 pozzetti di una apposita piastra da saggio in polistirene. La piastra viene conservata a 4°C over-night. L'eccesso di Ab primario non legato viene eliminato dopo l'incubazione attraverso un lavaggio con il buffer di lavaggio TBST (Tris-HCl ed NaCl).
- Aggiunta della soluzione Block-Sample buffer 1X, al fine di bloccare i siti aspecifici dell'Ab primario. Dopo un'ora di incubazione a T ambiente, si effettua un ulteriore lavaggio con TBST per la rimozione della soluzione di bloccaggio.
- Preparazione di una curva standard (nel range di 7,8-500 pg/ml) per ogni piastra, realizzata attraverso diluizione 1:2 dello standard con Block-Sample buffer 1X. Si procede con il rapido caricamento dei campioni da analizzare in ciascun pozzetto e con la successiva incubazione a T ambiente per 2 h sotto costante agitazione (400±100 rpm). Al termine della fase di incubazione, nei pozzetti in cui è presente il BDNF si sarà creata una struttura a sandwich: Ab primario legato al fondo del pozzetto, BDNF legato sia all'Ab primario monoclonale che a quello secondario policlonale.
- Aggiunta di un Ab terziario coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (HRP). L'Ab terziario è un Ab anti IgY specie-specifico, che riconosce l'Ab secondario e di conseguenza l'intera struttura a sandwich. La piastra è nuovamente incubata sotto agitazione (200±100 rpm) per 1 h a T ambiente e successivamente lavata una volta con TPBS. Nel caso in cui il BDNF sia assente, l'Ab terziario non si legherà e sarà allontanato con tale lavaggio.
- Aggiunta di TMB One Solution, soluzione che contiene un substrato cromogeno di colore azzurro, il p-nitrofenilfosfato. In presenza dell'enzima HRP, questo cromogeno viene trasformato in p-nitrofenolo, il quale emetterà una colorazione gialla. Dopo 10 minuti si blocca la reazione attraverso l'aggiunta di 100 µl di HCl 1 N per well (fase di stopping).

- Lettura spettrofotometrica (450 nm) del prodotto della reazione enzimatica tra la HRP e il p-nitrofenilfosfato. L'assorbanza si misura entro 30 minuti dalla fase di stopping.

La retta che si ottiene ponendo in un sistema di assi cartesiani i valori di assorbanza ottenuti per i campioni della curva standard in funzione della loro concentrazione in BDNF (nel range di 7,8-500 pg/ml) ci permetterà, attraverso interpolazione, di risalire alla concentrazione di BDNF presente in ogni campione sotto esame, caricato nella piastra.

III.3.2 Analisi strutturale delle colture cellulari ippocampali

Doppia immunofluorescenza

La tecnica di doppia immunofluorescenza sfrutta l'utilizzo di due anticorpi primari e due secondari marcati con sostanze fluorescenti (fluorofori o fluorocromi) che rendono visibili gli immunocomplessi antigene-anticorpo mediante strumenti appositi quali spettrofluorimetri, microscopia a fluorescenza o microscopia confocale. In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati alcuni anticorpi primari che sono diretti in maniera selettiva verso marcatori strutturali delle cellule ippocampali: la GAP43 (Sigma) quale marcatore della crescita assonica, la MAP2 (Sigma) specifica per la componente dendritica, la β -tubulina (Sigma) marcatore di tutto il citoscheletro cellulare; il DAPI (Sigma) che si lega alla doppia elica di DNA ed è un marcatore del nucleo. Gli anticorpi secondari usati per la rivelazione sono stati la TRITC (Zymed Laboratories INC) e la FITC (Zymed Laboratories INC). In tabella III.2 sono state riportate le concentrazioni usate. Attraverso l'applicazione dei suddetti anticorpi e procedura sperimentale è stato possibile in primo luogo analizzare la crescita dei neuroni ippocampali su supporto biosintetico (membrana FC) rispetto alla piastra Petri e, in una fase successiva, evidenziare le differenze morfologiche dei neuroni trattati con specifici farmaci rispetto a cellule non trattate. Nella prima parte, solo alcune piastre (n=6; 3 piastra Petri e 3 FC) sono state sottoposte a doppia immunofluorescenza con GAP43 + β -tubulina.

CONCENTRAZIONE ANTICORPI PRIMARI	CONCENTRAZIONE ANTICORPI SECONDARI	CONCENTRAZIONE DAPI
GAP43 15µl/ml	TRITC 10 µl/ml	DAPI 20 µl/ml
β-TUBULINA 8,5µl/ml	FITC 10 µl/ml	
MAP2 10 µl/ml	TRITC 10 µl/ml	

Tabella III.2 Concentrazioni degli anticorpi primari e secondari utilizzati nella doppia immunofluorescenza.

Il protocollo di doppia immunofluorescenza prevede i seguenti passaggi:

- 1) FISSAZIONE: dopo aver rimosso il mezzo di coltura, le cellule ippocampali sono fissate in paraformaldeide al 4% in PBS 1X (pH 7.4) per 15 min a temperatura ambiente e successivamente lavate in PBS 1X freddo per due volte;
- 2) PERMEABILIZZAZIONE: i campioni sono incubati per 10 min in una soluzione di PBS 1X contenente Triton X-100 (0.25%) a temperatura ambiente e successivamente lavati per 3 volte in PBS 1X, 5 min per ciascun lavaggio. La concentrazione di Triton viene ridotta a 0.1% per antigeni di membrana quali GAP43;
- 3) BLOCCAGGIO: i campioni sono incubati con una soluzione di BSA 1% in PBS cui è aggiunto Tween (PBST) per 30 min, al fine di bloccare il legame aspecifico degli anticorpi;
- 4) INCUBAZIONE SIMULTANEA: le cellule sono ricoperte di una soluzione contenente una miscela dei due anticorpi primari in una soluzione di BSA 1% in PBST, overnight a 4°C. La miscela dei due anticorpi è allontanata per decantazione ed i campioni lavati 3 volte in PBS 1X, 5 min per ciascun lavaggio. I campioni sono successivamente incubati con la miscela dei due anticorpi secondari in una soluzione di BSA 1% in PBST 1X per 1h, a temperatura ambiente. Una volta allontanata la miscela dei due anticorpi secondari, le cellule sono lavate 3 volte in PBS 1X, 5 min per ciascun lavaggio e successivamente incubate con DAPI per 20 min. Dopo aver effettuato gli ultimi lavaggi in PBS 1X, 3 da 1 min, le cellule sono conservate al buio a 4° C. Per l'osservazione microscopica, i campioni sono ricoperti con un coprioggetto,

interponendo un montante per fluorescenza e le osservazioni realizzate mediante microscopia confocale (60 X).

5)

III.4 Caratterizzazione molecolare

Numerose evidenze sperimentali riportano un'espressione dinamica e sequenziale per le diverse subunità dei GABA_AR nei primi stadi di sviluppo. Durante la prima settimana di sviluppo dei neuroni ippocampali si osserva, infatti, la sola espressione delle subunità α_2 , $\beta_{2/3}$, mentre quella della subunità α_1 appare scarsa (fig. III.5). Verso il termine della seconda settimana di sviluppo si ha la comparsa della subunità α_5 seguita, solo al termine della terza settimana, dalla subunità α_1 .

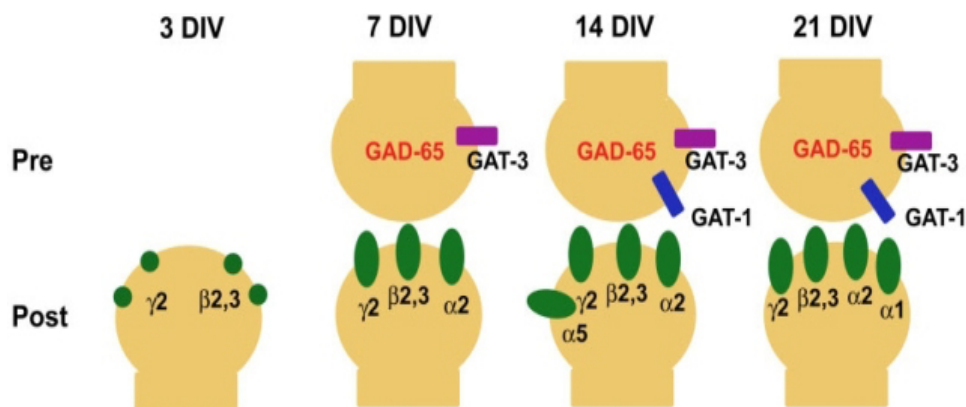


Fig. III.5. Sinaptogenesi GABAergica nei neuroni ippocampali (Swanwick et al., 2006).

Appare interessante sottolineare come l'aumento della subunità α_1 e la concomitante diminuzione di α_2 , in una fase della maturazione neuronale durante la quale il processo di sinaptogenesi è ancora pienamente attivo, coincidano con lo switch dell'azione GABAergica da eccitatoria ad inibitoria. Nello stesso periodo l'espressione della subunità $\beta_{2/3}$ rimane invariata. In aggiunta, la subunità γ_2 risulta essere altamente espressa già nelle prime fasi, in accordo con il suo ruolo essenziale nel clustering recettoriale (fig. III.4; Essrich et al., 1998). Le subunità α_5 e δ , al contrario, sembrano avere un ruolo nel mantenimento dell'attività tonica GABAergica registrata durante lo sviluppo precoce (Farrant e Nusser, 2005).

Sulla base di tali evidenze ed in seguito alla determinazione del ruolo di una trasmissione GABAergica aspecifica, cioè mediata dall'insieme dei complessi

recettoriali espressi a tale stadio, è stato necessario verificare l'espressione di alcune subunità GABAergiche, quelle maggiormente espresse nelle prime fasi dello sviluppo neuronale ippocampale in altre specie, anche in *Mesocricetus auratus*. L'attenzione è stata rivolta in modo particolare alle subunità α_2 , α_4 ed α_5 , ed i risultati ottenuti hanno dimostrato un'espressione precoce di α_2 ed α_5 nella prima settimana di maturazione *in vitro*, mentre la subunità α_4 comincia ad essere espressa solo nelle fasi successive. Allo stesso tempo si è proceduto con l'identificazione molecolare di 2 marcatori strutturali, impiegati allo scopo di valutare la maturazione dei neuroni nelle diverse condizioni sperimentali. In particolare sono stati scelti la MAP2 e la sinaptofisina (Syn), marcatori dendritico e sinaptico rispettivamente. Al fine di ottenere una quantizzazione reale dell'mRNA di tali geni è stato inoltre introdotto un gene housekeeping (β -actina), la cui espressione è stata utilizzata per normalizzare i dati ottenuti in Real-Time PCR.

Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale è una particolare tecnica sperimentale che necessita di massima sterilità e del mantenimento di una temperatura ottimale. La procedura sperimentale in questione consiste in una serie di passaggi che iniziano con la raccolta delle cellule poste in coltura a differenti stadi di differenziamento (DIV3 e DIV7) mediante tripsinizzazione. La concentrazione ottimale dell'enzima tripsina (0,025%) è stata scelta in maniera tale da consentire il totale distacco delle cellule dal supporto senza peraltro causare danni alla membrana cellulare dei neuroni adesi. In seguito alla rimozione del mezzo di coltura le cellule sono state preventivamente sottoposte ad uno sciacquo in DPBS 1X e quindi coperte con una soluzione di tripsina-EDTA e poste in incubatore a 37°C per 2 min. Al termine dell'incubazione si è proceduto col dare dei colpetti alle wells per favorire l'azione enzimatica mentre l'avvenuto distacco è stato successivamente confermato al microscopio ottico. In seguito al processo di tripsinizzazione le cellule, presenti in sospensione e di forma rotonda, sono state immediatamente trattate con mezzo per inibire altra attività catalitica della tripsina. A tal punto le cellule sono state risospese aspirando gentilmente in modo da staccarle completamente dal substrato e trasferite in una falcon da 15 ml. Avendo precedentemente stimato il numero di cellule presenti nel campione in esame, per ogni $5-10 \times 10^6$ cellule è stato aggiunto 1 ml di buffer di estrazione "TRIreagent" (Sigma), una soluzione costituita da fenolo e da guanidina isotiocianato 4M che denatura le proteine. Al tessuto omogeneizzato è stato aggiunto cloroformio e, mediante

centrifugazione a 14.000 rpm (4°C), la fase acquosa contenente l'RNA è stata così separata da quella organica. L'aggiunta di isopropanolo alla fase acquosa ha consentito di precipitare l'RNA in modo che nel campione, al termine della centrifugazione, fosse eliminato il sovrannante. Il pellet rimanente è stato quindi lavato con etanolo 75%, asciugato al flusso di una cappa da laboratorio per 30 min e disciolto in H₂O contenente dietilpirocarbonato (DEPC), un agente alchilante che agisce sui residui di istidina, fondamentali per l'attività catalitica dell'RNAsi. L'RNA estratto è stato, infine, conservato a -80°C.

Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto

La valutazione dell'integrità dell'RNA estratto è stata accertata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'0,8% in presenza di etidio bromuro per consentirne la visualizzazione ai raggi ultravioletti. L'esito della corsa, evidenziato al transilluminatore, ha messo in evidenza la presenza di due bande nette relative alle due subunità, maggiore (28s) e minore (18s) dell'RNA ribosomiale, che ha così confermato la buona qualità del materiale estratto. Successivamente è stata eseguita un'analisi qualitativa e quantitativa dello stesso attraverso l'ausilio dello spettrofotometro NanoDrop ND-3300 (*software*: ND-1000 v. 3.2.1), il quale, grazie all'efficienza del sistema di ritenzione, consente di effettuare misurazioni entro un largo range di lunghezze d'onda usando quantità relativamente molto piccole (1-2 µl) di campione. Il *software* utilizzato per le misurazioni fornisce, accanto alla concentrazione in ng/µl del campione, anche informazioni circa la qualità dello stesso attraverso la valutazione dei parametri: OD_{260/280} ed OD_{260/230}. Valori di OD_{260/280} prossimi a 1,8 e di OD_{260/230}, compresi nell'intervallo 1.8-2.2, garantiscono circa la purezza del campione di RNA rispetto ad eventuali contaminazioni sia da DNA e proteine che da agenti fenolici.

Trascrizione inversa

La retrotrascrizione (RT) permette di ottenere una singola elica di DNA (cDNA) da uno stampo di RNA per azione dell'enzima trascrittasi inversa. In questa reazione viene usato come *primer* un oligo-dT (deossitimina) che si appaia in maniera complementare all'estremità 3' dell'mRNA, caratterizzato in tutti gli mRNA eucariotici da una coda di poliA. La trascrittasi inversa più comunemente usata è quella del virus della leucemia murina di Moloney (M-MuLV), che catalizza la reazione portando alla formazione di un temporaneo eteroduplex mRNA-cDNA. L'mRNA viene successivamente

allontanato o mediante l'utilizzo di un'RNasi H che digerisce in modo specifico l'RNA legato al DNA nell'ibrido mRNA-DNA, oppure sottoponendo l'RNA a trattamento alcalino al fine di ottenere un singolo filamento di cDNA. L'estremità 3' del cDNA a singolo filamento tende a ripiegarsi formando una sorta di piccola forcina che può essere usata per innescare la sintesi di un secondo filamento ad opera della DNA polimerasi, mentre la piccola ansa che connette i due filamenti viene eliminata dalla nucleasi S1, che taglia specificamente le regioni del DNA a singolo filamento e distrugge l'enzima. In questo studio, per la reazione di RT a partire dall'RNA totale di neuroni ippocampali di *Mesocricetus auratus* è stato utilizzato il Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Per la preparazione della Mix di reazione, a 10µl di RNA totale estratti dalle cellule sono stati aggiunti 2 µl di 10X RT Buffer, 0.8 µl di 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µl di 10X RT Random Primers, 1 µl di MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 9.2 µl di H₂O Nuclease-free. I campioni così preparati sono stati sottoposti ad uno specifico programma (termociclatore) organizzato in tre step: 1) 25°C per 10'; 2) 37°C per 120'; 3) 4°C al termine della reazione di retrotrascrizione. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C ed un'aliquota è stata prelevata e fatta correre su gel d'agarosio all'1,5% al fine di valutarne la concentrazione.

La reazione a catena della DNA polimerasi

La reazione a catena della DNA polimerasi (RT-PCR) è una tecnica efficace che permette di amplificare *in vitro* grandi quantità di una determinata sequenza genica a partire da piccole quantità di uno specifico stampo. I requisiti essenziali della PCR sono due inneschi oligonucleotidici di sintesi (*primers*) complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza del DNA bersaglio e che, dopo l'ibridazione con il DNA stampo, abbiano le proprie estremità ossidriliche 3' orientate l'una verso l'altra; una sequenza bersaglio nel campione di DNA che si collochi tra l'uno e l'altro innesco; i quattro desossiribonucleotidi ed, infine, una DNA polimerasi termostabile capace di resistere a 95°C. La tipica reazione di PCR consiste nella ripetizione di un certo numero di cicli, ognuno dei quali si suddivide in tre fasi: una fase di denaturazione generalmente a 94°C per separare le due eliche di DNA, una fase di ibridazione (*annealing*) dei *primers* alla sequenza bersaglio ed una fase di sintesi detta anche estensione del DNA. In condizioni saline opportune ed in presenza di appropriate concentrazioni di deossinucleotidi trifosfati, la DNA polimerasi catalizza, a temperature

elevate, la sintesi di nuove molecole corrispondenti alle sequenze al 3' rispetto agli inneschi e ad ogni ciclo i frammenti neosintetizzati servono a loro volta da stampo per la sintesi di nuove molecole. Dopo pochi cicli di amplificazione il prodotto predominante è un frammento di DNA di lunghezza corrispondente alla distanza tra i due oligonucleotidi di innesco. Ogni ciclo raddoppia la quantità di DNA sintetizzato nel ciclo precedente, permettendo di ottenere in 30 cicli 10^5 - 10^6 volte la sequenza bersaglio. Un maggior numero di cicli non aumenta, tuttavia, la quantità di prodotto finale in quanto si raggiunge un *plateau* con amplificazione sempre meno efficiente. La DNA polimerasi generalmente utilizzata è la *Taq polimerasi*, un enzima del batterio *Thermophilus aquaticus* che risulta essere stabile ad alte temperature e che, dunque, può essere sottoposto a ripetuti cicli di denaturazione senza perdere la propria attività. L'azione della Taq polimerasi dipende dalla concentrazione di ioni magnesio (Mg^{2+}) che ne potenziano la reattività, per cui occorre evitare elevate concentrazioni di questo ione che diminuiscono la specificità dell'enzima e possono determinare l'amplificazione di frammenti aspecifici.

Uno dei requisiti fondamentali per la buona riuscita della reazione è ovviamente la scelta dei *primers* che devono essere complementari al frammento di cDNA da amplificare. I *primers* devono pertanto possedere requisiti specifici quale la lunghezza, che non deve essere superiore ai 25 nucleotidi per sequenze bersaglio di DNA appartenenti a genomi complessi, al fine di diminuire la probabilità di appaiamento con regioni che presentano una sequenza simile ma non di interesse (inefficienza dell'*annealing*), e non deve essere inferiore ai 16 nucleotidi (al fine di non pregiudicare la specificità del processo). I *primers* non devono contenere sequenze tra loro complementari, sequenze ripetute od invertite, per evitare che si formino dimeri o strutture a forcina che riducano l'efficienza dell'amplificazione; il contenuto in GC degli stessi deve essere compreso tra il 50-60% per dare maggiore stabilità. Un altro importante parametro da tenere in considerazione è la temperatura di *melting* (T_m ; valore di temperatura cui il DNA è parzialmente svolto) che deve essere simile per entrambi i *primers*; generalmente si preferisce una temperatura di ibridazione di 5° inferiore rispetto alla T_m .

I *primers* utilizzati in questo lavoro, disegnati sulle rispettive sequenze geniche in *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* (α_2) sono riportati in Tabella III.3, mentre i programmi ottimizzati per la fase di amplificazione sono riportati in Tabella III.4.

Tabella 1 Sequenze dei primers per i geni studiati.

<u>Gene</u>	<u>Forward primer (5'-3')</u>	<u>Reverse primer (5'-3')</u>	<u>Ac. number</u>
α_2	GGACGGGAAGAGTGAGTCAATG	TTTGGAAATGGTAGAGAGACAGG	NM_008066.3
α_4	AGCAGCAAAGAGGTCCTTCGTC	AGAAGGTGGTG GAGCAGAGG	NM_080587.3
α_5	CCATCCTCCAAACATCCCAAG	CGATCTTGCTG ATGCTGCTGCAGG	NM_017295.1
map2	TGACTTTGGACAGATGGCTTC	CCACCTTCTCTTTGACTTCTG	NM_013066
syn	GCCTGTCCGATGTGAAGATGG	CCTGICTCCTTGAACACCGAACC	NM_012664.2
actb	TATCGGCAATGAGCGGTTCC	AGCACTGTGTTGGCATAAGAGG	NM_031144.2

Tabella III.3. Primers utilizzati per l'identificazione genica delle subunità GABAergiche e dei marcatori strutturali impiegati in tale studio.

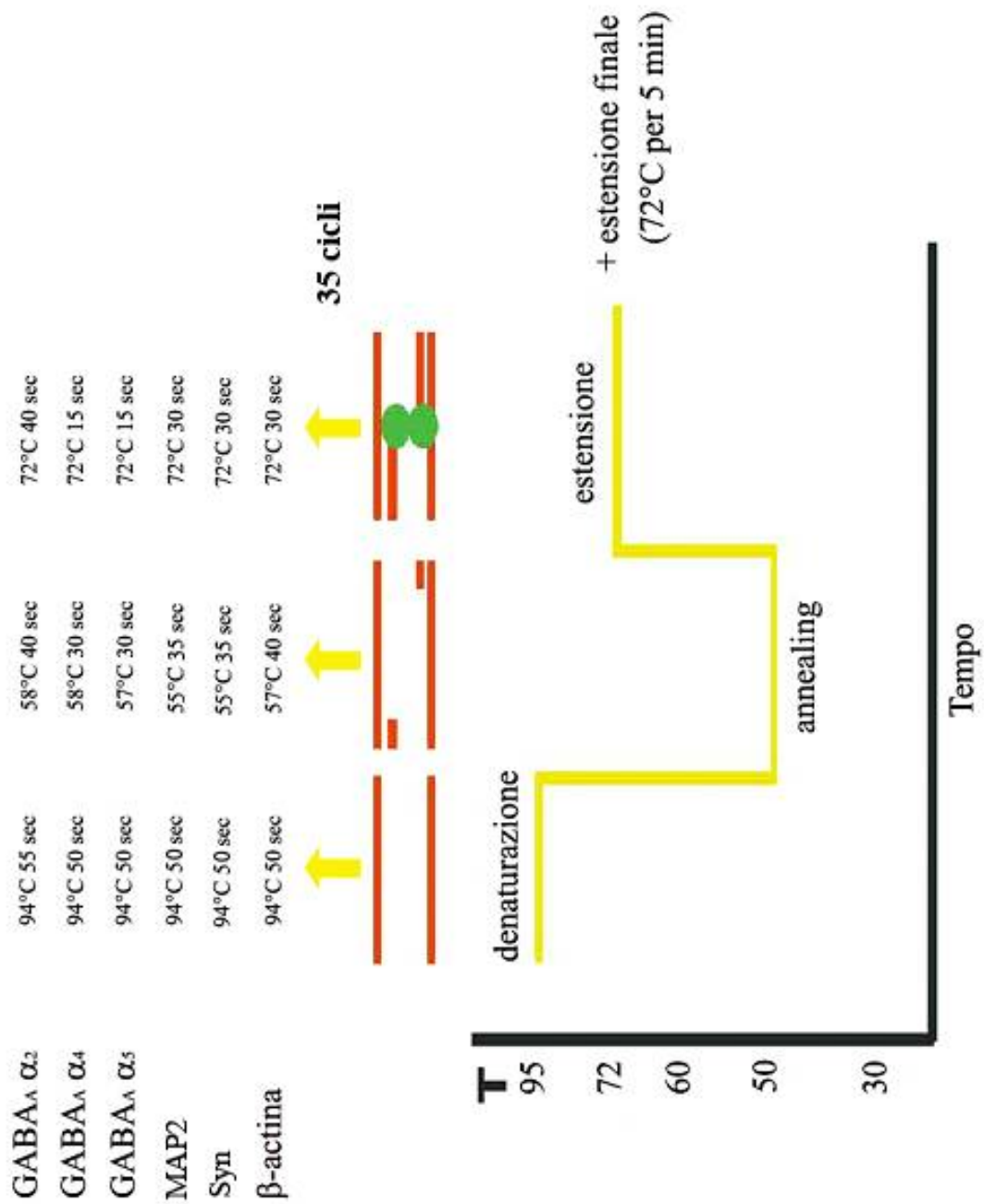


Tabella III.4. Programmi di PCR impiegati per l'amplificazione delle subunità GABAergiche e dei marcatori strutturali impiegati in tale studio.

Purificazione del prodotto di PCR

Prima di procedere con la fase successiva di sequenziamento è stato necessario realizzare la purificazione del frammento genico ottenuto. Per questa parte è stato usato il kit Wizard SV gel and PCR *clean up system*, che permette di estrarre e purificare frammenti di DNA della lunghezza compresa tra 100bp e 10kb da gel di agarosio mediante l'azione di tris acetato (TAE) o tris-borato (TBE). Completata la corsa elettroforetica, la banda prelevata da gel è stata trasferita in un'ependorf e quindi disciolta in guanidina isotiocianato (*membrane binding solution*; 10 μ l di soluzione sono sufficienti per sciogliere 10 mg di gel di agarosio) a 50°C. La miscela ottenuta è stata trasferita in una SV minicolonnina ed il campione è stato sottoposto a lavaggi successivi con una soluzione di *membrane wash solution*, precedentemente diluita con etanolo 95%, per favorire la rimozione dei sali. Al termine di una serie di centrifugazioni, il DNA purificato è stato diluito in 50 μ l di H₂O nucleasi free e conservato a -20°C. Successivamente è stata effettuata la precipitazione del purificato, aggiungendo 1/10 di volume di acetato e due volumi di etanolo 100% freddo. Dopo tre centrifugazioni successive, seguita ognuna dalla rimozione del sovrantante, in fase finale il pellet di DNA è stato risospeso in H₂O *nuclease free*, essiccato al termociclatore e quindi spedito alla Ditta **BMR Genomics**, che ha provveduto al sequenziamento del campione in esame.

III.5 Studio d'espressione: Real-Time PCR

Nonostante il largo impiego per valutazioni quantitative di campioni di DNA od RNA, la tecnica di RT-PCR presenta dei limiti associati alla natura esponenziale dell'amplificazione stessa. La possibilità di ottenere dei falsi risultati ha portato inizialmente allo sviluppo di una tecnica di valutazione semiquantitativa nella quale i livelli di mRNA ottenuti per il messaggero target vengono normalizzati rispetto ad un gene di riferimento usato come housekeeping, del quale viene considerata la quantità presente nella fase di amplificazione esponenziale (Chen et al., 1999). Negli ultimi 10 anni, tuttavia, anche la PCR semiquantitativa è stata spiazzata dalla tecnica Real Time PCR detta anche PCR quantitativa o più brevemente qPCR. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato come gene housekeeping, per la valutazione quantitativa del pattern di espressione di MAP2 e Syp, il fattore citoscheletrico β -actina per il quale non sono state riportate variazioni sul pattern di espressione nel corso della maturazione ippocampale (Tanic et al., 2007). I primers impiegati per la reazione di amplificazione

della β -actina, disegnati su regioni altamente conservate della sequenza di *Rattus norvegicus*, sono riportati in Tabella II. I primers utilizzati per Syp e MAP2 sono identici a quelli utilizzati nella precedente fase di identificazione genica.

La quantificazione del numero di copie di DNA tramite qPCR si basa sulla conoscenza della cinetica dell'amplificazione che almeno inizialmente dovrebbe produrre da ogni singola copia di frammento di DNA un'ulteriore copia alla fine di ogni ciclo della PCR (caratterizzato dalle fasi di denaturazione, annealing ed estensione) con un tasso di crescita di ciclo in ciclo pari a 2. Trattandosi di un meccanismo che si ripete ciclicamente, è caratterizzato da una crescita geometrica o esponenziale per cui idealmente si può scrivere:

$$X = X_0 \times 2^C$$

X=numero di copie del frammento

X_0 = numero di copie prima della PCR

C=numero di cicli

Tale cinetica è teorica per almeno due motivi. In primo luogo difficilmente per ogni ciclo partendo da un frammento otteniamo sempre un ulteriore nuovo frammento ma in media se ne ottiene una proporzione variabile tra 0 e 100%. Ciò equivale a dire che l'efficienza della PCR è spesso minore del 100% teorico ovvero in termini matematici:

$$X = X_0 \times (1 + E)^C$$

dove E=efficienza della PCR (compresa tra 0 e 100%)

In secondo luogo, la crescita esponenziale dei frammenti in una PCR avviene normalmente solo nei primi cicli, dopochè la diminuzione dei reagenti e l'aumento dei prodotti residui (es. pirofosfato) inibisce la sintesi (fig. III.6):

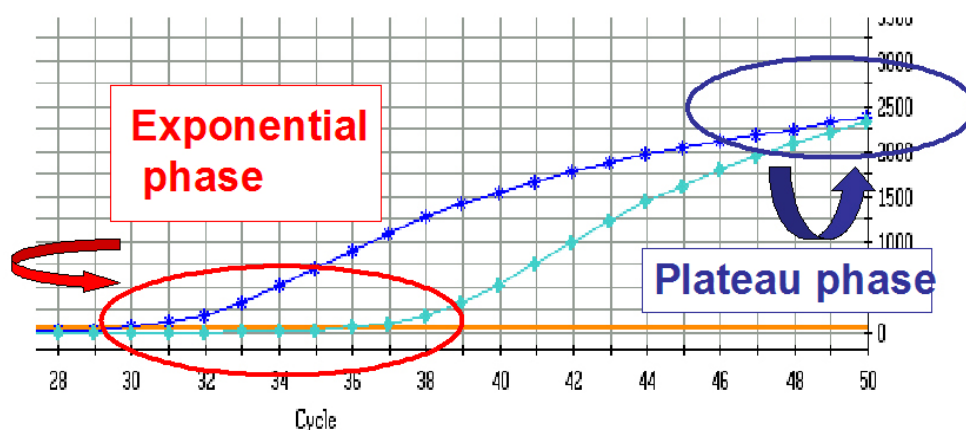


Fig. III.6. Curva di amplificazione di una PCR.

La presenza di metodi di rilevamento per la quantità di DNA sempre più efficaci permette comunque di studiare la PCR grazie a strumenti “real-time” nella sua fase esponenziale, mediante l’impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo, a livello del prodotto di reazione, segue la stessa cinetica della PCR. In questo lavoro è stato utilizzato lo strumento Bio-Rad. I campioni di cDNA ottenuti sono stati analizzati mediante qPCR utilizzando il SYBR Green (Quiagen) come indicatore di fluorescenza e verifica della specificità dei prodotti amplificati mediante curva di melting (fig. III.7). Il Syber green emette una fluorescenza 200 volte maggiore quando intercalato al DNA a doppia elica, quindi, con il procedere dei cicli di amplificazione, si assisterà ad un continuo aumento della fluorescenza (Morrison, 1998). Il ciclo raggiunto il quale la fluorescenza supera il valore base (threshold) viene indicato come Ct (Cycle threshold).

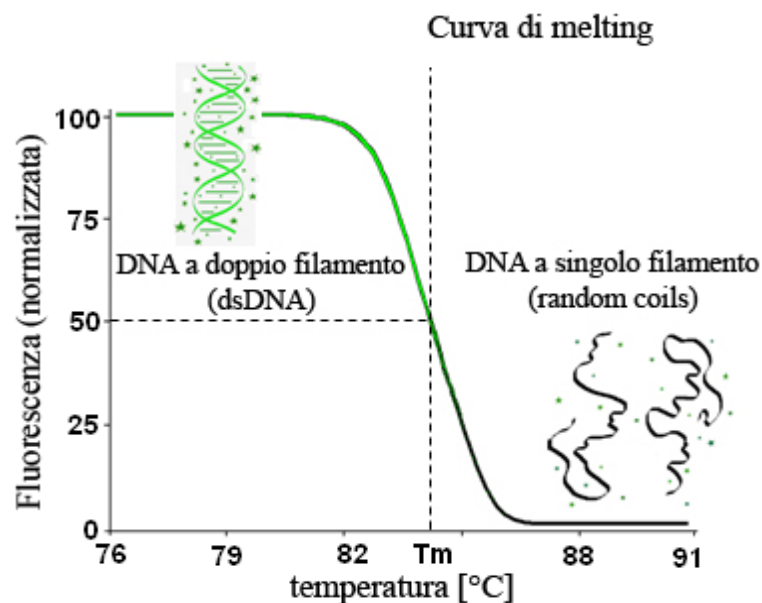


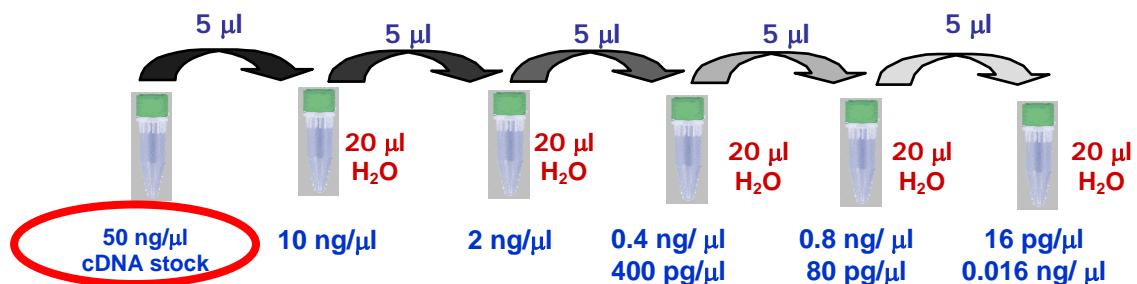
Fig. III.7. Curva di melting. Il colorante Syber si lega alle molecole di DNA a doppio filamento, intercalandosi nei solchi minori. La denaturazione del DNA che consegue all’aumento della temperatura ad ogni ciclo di amplificazione determina il distacco del colorante.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il metodo di quantificazione relativa dell’algoritmo della derivata seconda. Tale metodo consente di valutare le differenze nei livelli di espressione di un gene tra un campione ed il relativo controllo. Per poter effettuare tale confronto è necessario disporre di uno “standard interno”, di un riferimento, comune sia al campione trattato, sia al controllo ed espresso costitutivamente in entrambi. Tali geni costitutivi, denominati appunto housekeeping, sono caratterizzati dal fatto che la loro espressione segue l’attività trascrizionale della cellula: ne consegue che la quantità di RNA e quindi di cDNA utilizzato come template

è ad essa proporzionale. Affinché tale valore possa essere utilizzato per ricavare l'entità dell'espressione differenziale del gene d'interesse tra il campione ed il suo controllo devono realizzarsi alcune condizioni. Una prima condizione riguarda l'efficienza della reazione di amplificazione per entrambi i geni, che dovrà essere quanto più possibile prossima al 100%. Tale parametro dovrà inoltre essere paragonabile tra il gene target e lo standard. Il metodo comunemente impiegato per il calcolo dell'efficienza di amplificazione è il seguente:

$$\text{Efficienza } (\eta) = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$$

dove "slope" si riferisce alla pendenza della curva standard. La curva standard di un campione mette in relazione il numero di cicli di amplificazione con la fluorescenza emessa da un campione o, in modo più specifico, con la quantità di campione di partenza. Per la determinazione della curva standard (per ciascuna coppia i primers) si è proceduto con una diluizione seriale del template a concentrazione nota:



La mix di reazione per ciascun campione è stata successivamente allestita tenendo conto se trattasi di un gene di riferimento o di un gene target. Nel primo caso si è preparata una mix costituita da:

- iQ SYBR Supermix 2X : 12.5 μl
- Primer for (10 μM): 0,25 μl
- Primer rev (10 μM): 0,25 μl
- H₂O_{nf}: 10 μl
- cDNA: 2 μl
- Volume totale: 25 μl

Rispettando quindi le condizioni generali riportate nella seguente Tabella III.5:

Condizioni di reazione per gene housekeeping	
Volume finale per singola PCR o replica	25 μl
Concentrazione finale primers gene di riferimento	0.1 μM per ciascuno
Quantità cDNA template per singola PCR o replica	2 μl
Nr repliche per campione	3

Tabella III.5. Condizioni generali di reazione in qPCR per un gene di riferimento.

Per i geni target è stato necessario impiegare una concentrazione maggiore dei primers, variabile tra 200-400 nM. In tal caso, le condizioni generali di amplificazione sono state le seguenti:

- iQ SYBR Supermix 2X : 12.5 μ l
- Primer for (10 μ M): 0,5-1 μ l
- Primer rev (10 μ M): 0,5-1 μ l
- H₂O_{nf}: 9,5-8,5 μ l
- cDNA: 2 μ l
- Volume totale: 25 μ l

Rispettando quindi le condizioni generali riportate nella seguente Tabella III.6:

Condizioni di reazione di un gene target	
Volume finale per singola PCR o replica	25 μl
Concentrazione finale primers gene di riferimento	0.2-0.4 μM per ciascuno
Quantità cDNA template per singola PCR o replica	2 μl
Nr repliche per campione	3

Tabella III.6. Condizioni generali di reazione in qPCR per un gene target.

Nel controllo negativo sono stati utilizzati 2 µl di acqua RNAsi free al posto del cDNA. L'amplificazione è stata condotta con i seguenti programmi: 15 minuti a 95°C per attivare la Taq DNA polimerasi; 20 secondi alla temperatura di appaiamento che dipende dalla coppia di primers utilizzati; 15 secondi a 95°C per la denaturazione; 10 secondi a 72°C per l'estensione. Tali cicli sono stati ripetuti in media 40 volte. Per verificare che la reazione di amplificazione dei frammenti genici attesi fosse avvenuta correttamente, aliquote del prodotto di PCR sono state sottoposte a corsa elettroforetica su gel d'agarosio (1,5%).

I dati sono stati analizzati mediante il metodo di quantificazione relativa dell'algoritmo della derivata seconda. Brevemente, per ogni campione (analizzato in triplicato) è stato individuato il valore di Ct del gene di interesse e di quello housekeeping. È stata quindi calcolata la loro differenza che rappresenta il ΔCt in modo tale che la quantità di ogni messaggero codificante il gene di interesse sia normalizzata rispetto al gene housekeeping. Per ogni gruppo (trattamento) è stato calcolato il ΔCt medio e la deviazione standard. La differenza tra il ΔCt di un qualsiasi gruppo di trattamento ed il ΔCt del gruppo controllo rappresenta il $\Delta\Delta Ct$, derivandone che il $\Delta\Delta Ct$ del gruppo controllo è pari a zero. L'espressione matematica $2^{-\Delta\Delta Ct}$, che per il gruppo dei campioni controllo sarà quindi uguale ad 1, rappresenta il numero di volte (in più o in meno) in cui il gene di interesse è espresso rispetto all'espressione basale (quella riscontrata nei campioni non trattati). Con tale metodo, per ogni campione la quantità del gene di interesse analizzato è quindi espressa come n-volte rispetto alla quantità presente nelle cellule ipocampali non trattate. Tutti i dati sono espressi come media \pm errore standard. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA two-way seguita dal test Neuman-Keul's. I risultati ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di $p < 0.05$.

III.6 Trattamenti farmacologici *in vitro*

I risultati ottenuti da queste prime fasi sperimentali hanno portato in primo luogo alla conferma delle membrane FC come supporto biosintetico la cui applicazione per la crescita neuronale risulta estremamente vantaggiosa, in accordo sia con i saggi metabolici che con l'analisi morfologica (immunofluorescenza e qPCR). In aggiunta, l'identificazione dell'espressione solo di determinate subunità α del GABA_AR durante la prima settimana di sviluppo neuronale ha portato alla scelta di farmaci specifici per la fase successiva del lavoro, mirata alla modulazione della trasmissione GABAergica e

allo studio degli effetti sulla maturazione morfo-funzionale dei neuroni ippocampali. Sia nella prima parte, in cui è stata valutata la trasmissione GABAergica totale che nella seconda, in cui si è provveduti allo studio della trasmissione mediata da specifici complessi recettoriali, sono stati impiegati farmaci appartenenti alla famiglia delle benzodiazepine e imidabenzodiazepine, le cui concentrazioni d'impiego sono state determinate avvalendosi di studi precedentemente effettuati nel Laboratorio di Neuroanatomia Comparata o riportati in letteratura e quindi confermati attraverso screening effettuati direttamente nelle colture di neuroni ippocampali. Per ciascun farmaco è stata applicata la concentrazione ritenuta ottimale per la saturazione di circa il 100% dei siti GABAergici, senza peraltro causare riduzione della vitalità cellulare (Tabella III.7).

FARMACO	CONCENTRAZIONE FARMACO	Riferimento bibliografico
Flunitrazepam (Flu)	100 nM	Facciolo et al., 2000; Canonaco et al., 2002
RY-080	50 nM	Facciolo et al., 2000; Canonaco et al., 2002
Diazepam (DZP)	1 μM	Tietz et al., 1999
Flumazenil (FLM)	10 μM	Canonaco et al., 2002

Tabella III.7. Farmaci impiegati e concentrazioni di utilizzo.

In una prima fase, il ruolo della trasmissione GABAergica sulla maturazione neuronale durante la prima settimana di sviluppo *in vitro* è stato valutato su HIP intero. In questo caso, alcune piastre (n=16) sono state utilizzate per il trattamento farmacologico con l'agonista GABAergico DZP e l'antagonista competitivo FLM. Il FLM lega quindi in modo competitivo il sito delle benzodiazepine sui GABA_ARs ma non attiva cascate a valle. La scelta delle concentrazioni si basa su dati precedenti, ottenuti nel Laboratorio di Neuroanatomia Comparata mediante analisi di affinità recettoriale su tessuto ippocampale (Canonaco et al., 2002) per quanto riguarda il FLM, mentre la concentrazione del DZP è stata ricavata dalla letteratura. Il DZP 1 μ M è infatti in grado di incrementare in modo significativo (150-275%) la trasmissione GABAergica del

campo CA1 (Tietz et al., 1999). Entrambe le concentrazioni sono state confermate nel nostro sistema mediante screening. I farmaci sono stati preparati in dimetil solfossido (DMSO) alla concentrazione finale di 45 μM in 700 μl di mezzo di coltura. I farmaci sono aggiunti alle colture al tempo DIV0, subito dopo il piastramento, ed il trattamento continua per tutta la prima settimana di sviluppo, aggiungendo tali farmaci ogni 48 ore agli stadi DIV1, DIV3, DIV5 e DIV7. In particolare, i farmaci sono stati aggiunti con l'intenzione di osservare gli effetti indotti dalla stimolazione dei recettori GABA_A (GABA_AR) espressi a tale stadio indotta dal DZP e verificare, attraverso il blocco della trasmissione GABA_Aergica indotto dal FLM, la specificità degli stessi. Per tale motivo, un primo trattamento ha previsto la somministrazione del solo DZP, mentre in seguito è stato realizzato un co-trattamento DZP+FLM alle concentrazioni prestabilite. Contemporaneamente un certo numero di piastre (n=8) sono state utilizzate quali cellule controllo, nelle quali è stato aggiunto il DMSO 45 μM con le stesse modalità e agli stessi tempi delle cellule trattate. Le cellule sono state costantemente monitorate mediante microscopia ottica durante tutto il trattamento.

Nella fase successiva, la scelta dei farmaci è stata effettuata tenendo conto di dati ricavati dalla letteratura circa l'espressione di specifiche subunità GABA_Aergiche in tale periodo dello sviluppo postatale, dati confermati dall'identificazione del trascritto codificante per tali geni già a DIV0 nella nostra specie. Per tale motivo sono stati applicati la benzodiazepina Flu e l'agonista inverso RY-080 diretti, in questo studio, alla modulazione dei recettori contenenti α_2 o α_5 rispettivamente. Sebbene il Flu manifesti affinità nei confronti dei recettori GABA_Aergici contenenti α_1 , α_2 , α_3 , nel nostro studio l'assenza di α_1 ed α_3 rende tale farmaco specifico per α_2 . Analogamente, RY-080 si comporta da agonista inverso, riconoscendo il sito benzodiazepinico ma svolgendo un ruolo opposto a quello dell'agonista (rende difficile la trasmissione GABA_Aergica). RY-080 manifesta specificità d'azione nei confronti della subunità α_5 . I farmaci sono stati preparati in una soluzione salina 0.9% tenendo presente che le suddette concentrazioni rappresentano le dosi finali applicate in 800 μl del mezzo di coltura. I farmaci sono aggiunti alle colture (n=4/trattamento+stadio) al tempo DIV0, subito dopo il piastramento, ed il trattamento continua per tutta la prima settimana di sviluppo, aggiungendo tali agonisti ogni 48 ore agli stadi DIV1, DIV3, DIV5 e DIV7. Contemporaneamente un certo numero di piastre (n=8) sono state utilizzate quali cellule controllo, nelle quali è stata aggiunta soltanto la soluzione salina 0.9% con le stesse modalità ed agli stessi tempi delle cellule trattate. Anche in questo caso, le

cellule sono state costantemente monitorate mediante microscopia ottica durante tutto il trattamento. Le alterazioni morfologiche indotte dai trattamenti su citati sono state monitorate attraverso la valutazione del pattern di distribuzione dei marcatori strutturali GAP43 e β -tubulina mediante microscopia confocale e dell'espressione dei marcatori MAP2 e Syn mediante qPCR, a DIV3 e DIV7. In aggiunta, parte delle colture sottoposte a trattamento o appartenenti al gruppo dei controlli sono state sacrificate a due stadi di sviluppo diversi, DIV3 e DIV7, per l'analisi di espressione mediante ibridazione *in situ* (ISH). Questi due stadi rappresentano tappe cruciali per la maturazione dell'assone e dell'arborizzazione dendritica, rispettivamente.

III.7 Ibridazione *in situ* non radioattiva

Le sonde oligonucleotidiche antisense per GluR2 ed NR1 utilizzate in questo studio sono le seguenti:

GluR2: 5' TTCACTACTTTGTGTTTCTCTTCCATCTTCAAATTCCTCAGTGTG 3'

NR1: 5' GCATTGGTGC GGGAGTCGCATTCATGATACCGAACCCATGTCTTA 3'

Il procedimento sperimentale per l'ISH su cellule ippocampali è riportato di seguito:

- Marcatura della sonda. La sonda è stata marcata con la DIG aggiungendo ad 1 μ l di oligonucleotide 100pmol, 4 μ l di buffer TdT (potassio cacodilato 1M, Tris-HCl 125 mM pH 6.6), 4 μ l di CoCl₂, 2 μ l di DIG, 1 μ l di TdT e acqua distillata, fino ad un volume di 20 μ l. Successivamente, l'oligo è stato incubato per 30 min a 37°C e per bloccare la reazione, sono stati aggiunti 2 μ l di EDTA 0.2 M pH 8.0. Per verificare l'avvenuta reazione di marcatura della sonda è stato effettuato un Dot Blot mediante la membrana Hybond N+ (*Amersham International*). Tale membrana è stata imbibita in una capsula Petri con il buffer 1 (Tris-HCl 0.1 M pH 7.5; NaCl 0.15 M) per 15 min, agitando gentilmente; è stata poi incubata con l'anticorpo anti-DIG per 30 min a 37°C e sottoposta a due lavaggi nel buffer 1 per 5 min. La pellicola è stata poi trasferita nel buffer 3 (tris-HCl 0.1 M pH 9.5; NaCl 0.1 m; MgCl₂ 0.05 M) per 2 min in una nuova capsula Petri, nella quale sono stati posti i reagenti della *detection* sciolti nel buffer 3; tali reagenti sono: BCIP ed NBT. La piastra è stata lasciata al buio affinché potesse

verificarsi un pieno sviluppo della colorazione: la visualizzazione di un colore “rosa-violetto” indica la corretta marcatura.

- Fissazione. Le cellule sono fissate in paraformaldeide 4% per 15 min e successivamente sciacquate per 3 volte in PBS 1X.
- Permeabilizzazione. Le cellule sono permeabilizzate in una soluzione di Triton X-100 0,2% in PBS 1X per 5 min e sciacquate 1 volta in PBS 1X.
- Acetilazione. Tale fase prevede l’aggiunta di una soluzione di acetilazione (0,1M di trietanolamina, 0,25% anidride acetica, pH 8.00) per 10 min e successivo sciacquo in PBS 1X.
- Preibridazione. Le cellule sono mantenute per 4-6 h a temperatura ambiente in un buffer contenente 50% di formammide , SSC 5X e Destran solfato.
- Ibridazione. Al suddetto buffer di preibridazione viene aggiunto DTT al 2% e in più 250 ng di sonda marcata con DIG per piastra. La sonda va denaturata per 5 min a 80°C e successivamente viene posta sulle cellule per 16 h a 55 °C in camera umida. Per ciascuna piastra è sufficiente aggiungere 300 µl di buffer di ibridazione.
- Al termine delle 16 h, le cellule sono sciacquate in SSC 5X e lasciate a temperatura ambiente per 60 minuti in SSC 0.2X. Dopo l’immersione in buffer 1 (0,1M di TrisHCl pH 7.5; 0.15M di NaCl) per 5 min, le cellule sono immerse per 60 min in una soluzione di bloccaggio preparata in buffer 1 con aggiunta di BSA 2% e Triton X-100 allo 0,3%.
- Rivelazione immunologica. Le cellule sono incubate in camera umida per 3-4 h a temperatura ambiente con anti-DIG (1:1000) diluito in buffer 1, cui seguono 2 lavaggi con buffer 1 per 10 min ed un ultimo lavaggio di 5 min in buffer 2 (0,1M TrisHCl/0,1M NaCl/50mM di MgCl₂, pH 9,5).
- Reazione di colorazione. Le cellule sono coperte con un buffer di colorazione (23 µl di NBT, 100 mg/ml, e 18 µl di BCPI, 50 mg/ml preparati in 5 ml di buffer 2) e mantenute al buio in camera umida overnight. La reazione di colorazione è stoppata con un buffer TE contenente 100 mM di TrisHCl pH 8,00 / EDTA 1 mM pH 8,00 per 5 min. Infine le cellule sono lavate in H₂O_s e coperte con montante coprioggetto per la visualizzazione al microscopio ottico.

III.8 Analisi statistica

La valutazione della morfologia neuronale in condizioni di controllo o in seguito a trattamento farmacologico è stata effettuata a diversi stadi di sviluppo (DIV1, DIV3, DIV5 e DIV7) mediante il software “Pro-Plus image analysis” (media Cybernetics). Il diverso pattern di espressione delle subunità NR1 e GluR2, espresso in O.D. \pm s.e.m. è stato valutato a DIV3 e DIV7 mediante analizzatore di immagine (Scion-Image 2.0). In entrambi i casi, le differenze ottenute sono state confrontate mediante ANOVA two-way seguito da test di Newman Keul e i dati sono stati considerati significativi se $p < 0,05$. L’analisi statistica dei dati metabolici è stata condotta mediante test ANOVA seguito da test di Student, e i risultati sono stati considerati significativi quando $p < 0,05$.

RISULTATI E
DISCUSSIONE

Risultati: parte molecolare

IV.1 Identificazione molecolare di GABA α_2 in *Mesocricetus auratus*

L'utilizzo di *primers* disegnati sulla sequenza di *Gabra2* di *Mus musculus* ha consentito l'identificazione di una porzione di tale recettore nella specie *Mesocricetus auratus*. D'accordo con la minima distanza filogenetica tra le due specie, la lunghezza del tratto amplificato visualizzato su gel d'agarosio (1.5%) risulta essere paragonabile. I risultati della reazione di sequenza hanno fornito un frammento nucleotidico complessivo di 90 bp, per il quale la parte iniziale e terminale presentano una perdita di purezza come visualizzato sui cromatogrammi mediante Finch TV versione 1.4.0. La sequenza è di seguito riportata:

```
>partial cds Gabra2_Mesocricetus_auratus
```

```
5' -CATGATACAGAACAACGCCTATGCTGTAGCCGTTGCCAACTACGCCCCGAATCTTTCCAAAGAT
CCTGTCCTCTCTACCATTTCAAAA-3'
```

Per verificare se la sequenza ottenuta in *Mesocricetus auratus* corrispondesse realmente alla sequenza di *Gabra2* di tale specie è stato realizzato l'allineamento nucleotidico di *Mesocricetus auratus* con le sequenze di altri Mammiferi, attraverso il programma di allineamento disponibile *online*, al sito <http://workbench.sdsc.edu>, dotato della funzione BLASTN. Il successivo allineamento delle sequenze (CLUSTALW) ha evidenziato una percentuale di omologia con le sequenze nucleotidiche (fig. IV.1) codificanti per *Gabra2* pari al 96% in *Rattus norvegicus* e al 99% in *Mus musculus*. Nel caso di *Homo sapiens*, la percentuale di omologia è pari a 84%.

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue

- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
>Gabra2_Mesocricetus      -----TCATGATACAGAACAACGC
>Gabra2_Rattus norvegicus AATGACAAGCCTAAAAAGAGAAAGGCTCCGTCATGATACAGAACAACGC
>Gabra2_Mus_musculus 1051 AATGACAAG---AAAAAGAGAAAGGCTCCGTCATGATACAGAACAACGC
>Gabra2_Homo_sapiens     AATGACAAG---AAAAAGAGAAAGGCTCCGTTATGATACAGAACAACGC
                        * *****

>Gabra2_Mesocricetus     CTATGCTGTAGCCGTTGCCAACTACGCCCCGAATCTTTCCAAAGATCCTG
>Gabra2_Rattus norvegicus CTATGCTGTAGCCGTTGCCAACTACGCCCCGAATCTTTCCAAAGATCCTG
>Gabra2_Mus_musculus     CTATGCGGTAGCTGTTGCCAACTATGCCCCGAATCTTTCCAAAGATCCTG
>Gabra2_Homo_sapiens     TTATGCAGTGGCTGTTGCCAATTATGCCCCGAATCTTTCCAAAGATCCAG
                        ***** ** ** ***** ** ***** ** ***** *
```

```

>Gabra2_Mesocricetus      TCCTCTCTACCATTTCAAAA-----
>Gabra2_Rattus norvegicus TCCTCTCTACCATTTCAAAAGTGCAACTACTCCAGAACCAAACAAGAAG
>Gabra2_Mus_musculus      TCCTCTCTACCATTTCAAAAGTGCAACGACGCCAGAACCGAACAAGAAG
>Gabra2_Homo_sapiens      TTCTCTCCACCATCTCCAAGAGTGCAACCACGCCAGAACCCAACAAGAAG
* * * * *

```

Fig. IV.1. Allineamento nucleotidico tra la sequenza parziale di Gabra2 in *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* (cds parziale). Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

Ricorrendo allo stesso sito <http://workbench.sdsc.edu>, è stata sfruttata la funzione SIXFRAME che ha permesso di ottenere la traduzione aminoacidica del frammento nucleotidico, oltre che di verificare l'assenza di codoni di STOP. Il frammento proteico:

```
>Gabra2_Mesocricetus auratus
```

```
MIQNNAYAVAVANYAPNLSKDPVLSTISK
```

così ottenuto di 29 aa è stato allineato con la sequenza aminoacidica di Gabra2 delle stesse specie considerate per l'allineamento nucleotidico. Successivamente, avvalendosi del software BIOEDIT *Sequenze Allineamento Editor*, è stata calcolata la percentuale di identità e di similarità presentate da *Mesocricetus auratus* rispettivamente con ciascuna delle altre specie considerate (fig. IV.2 a,b).

a) **Consensus key** (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue

: - conservation of strong groups

. - conservation of weak groups

- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

>Gabra2_Mus_musculus      NDK-KKEKGSVMIQNNAYAVAVANYAPNLSKDPVLSTISK SATTPEPNKK
>Gabra2_Rattus norvegicus NDKPKKEKGSVMIQNNAYAVAVANYAPNLSKDPVLSTISK SATTPEPNKK
>Gabra2-Mesocricetus      -----MIQNNAYAVAVANYAPNLSKDPVLSTISK-----
>Gabra2_Homo_sapiens      NDK-KKEKASVMIQNNAYAVAVANYAPNLSKDPVLSTISK SATTPEPNKK
* * * * *

```

b)

<i>Mesocricetus auratus</i>	SIMILARITÀ (%)	IDENTITÀ (%)
<i>Rattus norvegicus</i>	100%	100%
<i>Mus musculus</i>	100%	100%
<i>Homo sapiens</i>	100%	100%

Fig. IV.2. Allineamento del frammento nucleotidico di Gabra2 di *Mesocricetus auratus* con le altre specie (a). Gli asterischi in azzurro indicano un residuo aminoacidico completamente conservato. (b) Tabella riassuntiva delle percentuali di similarità e identità calcolate tra la sequenza proteica di *Mesocricetus auratus* e quella relativa alle altre specie prese in esame.

La sequenza parziale di *Mesocricetus auratus* è stata successivamente studiata da un punto di vista funzionale attraverso la predizione della struttura secondaria. L'identificazione di domini conservati tra *Mesocricetus auratus* ed una seconda specie

potrebbe infatti fornire importanti indicazioni circa la funzione del tratto aminoacidico. Tale studio è stato realizzato sfruttando il software GOR4, presente all'indirizzo http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl. In particolare sono state confrontate le predizioni della struttura secondaria di *Mesocricetus auratus*, di *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* e sono stati ottenuti i seguenti risultati (fig. IV.3):

Query: *Mesocricetus auratus* Gabra2

Sequence MIQNNAYAVA VANYAPNLSK DPVLSTISK
Structure CCCCCCHHH HHHCCCCCCC CCEEEEEEC

Sequence length: 29 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 6 is 20.69%
 Beta Sheet (E) : 6 is 20.69%
 Random coil (C) : 17 is 58.62%

Query: *Rattus norvegicus* Gabra2

		360		370		380		390		400
Sequence	NDKPKKEKGS	V	MIQNNAYAV	AV	VANYAPNLS	KDPVLSTISK	S	SATTPEPNKK		
Structure	CCCCCCCCCE	E	EEEECCHHHH	HHH	HHHCCCCCCC	CCCCEEEECC	C	CCCCCCCCCC		

Sequence length: 29 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 8 is 27.59%
 Beta Sheet (E) : 7 is 24.14%
 Random coil (C) : 14 is 48.28%

Query: *Mus musculus* Gabra2

		360		370		380		390		400
Sequence	NDKKKEKGSV	M	IQNNAYAVA	V	VANYAPNLSK	DPVLSTISK	S	ATTPEPNKKP		
Structure	ECCCCCCEE	E	EEECCHHHHH	HHH	HHHCCCCCCC	CCCCEEEECC	C	CCCCCCCCCC		

Sequence length: 29 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 8 is 27.59%
 Beta Sheet (E) : 7 is 24.14%
 Random coil (C) : 14 is 48.28%

Fig. IV.3. Confronto tra la struttura di Gabra2 in *Rattus norvegicus* e in *Mus musculus* e la sequenza parziale ottenuta in *Mesocricetus auratus*, di cui sono riportati in valori percentuale le strutture secondarie. LEGEND: Alpha Helix = H Beta Sheet = E Random Coil = C.

Il confronto tra le predizioni di struttura secondaria mette in evidenza la presenza delle medesime tipologie strutturali in tutte le sequenze analizzate; in particolare si individuano le seguenti tipologie: alfa elica (alpha helix, Hh), filamento disteso (extended strand, Ee) ed avvolgimento casuale (random coil, Cc).

IV.2 Identificazione molecolare di GABA α_4 in *Mesocricetus auratus*

L'utilizzo di *primers* disegnati sulla sequenza di *Gabra4* di *Rattus norvegicus* ha permesso l'identificazione di una porzione di tale recettore nella specie *Mesocricetus auratus*. In accordo con la minima distanza filogenetica tra le due specie, la lunghezza del tratto amplificato visualizzato su gel d'agarosio (1.5%) risulta essere paragonabile. I risultati della reazione di sequenza hanno fornito un frammento nucleotidico complessivo di 157 bp, poiché la parte iniziale e quella terminale del frammento presentano una perdita di purezza come visualizzato sui cromatogrammi mediante Finch TV versione 1.4.0. La sequenza è di seguito riportata:

```
>partial cds Gabra4_Mesocricetus_auratus
5' - TCCTCTCACGGGACACTGCAACCAGCTCCTTTGCGGTGCGCGTCTGCTCGCCCGGCATTTGGAGCT
AGACTTGGGCGAATTAAGACAACAGTTAATACGACAGGGGTGCCTGGGAATGTGTCTAGCCACACCTCCTC
CCTCTGCTCCACCACCAAAAA -3'
```

Per verificare se la sequenza ottenuta in *Mesocricetus auratus* fosse realmente la sequenza di *Gabra4* di tale specie è stato effettuato l'allineamento nucleotidico di *Mesocricetus auratus* con le sequenze di altri Mammiferi, attraverso il programma di allineamento disponibile *online*, al sito <http://workbench.sdsc.edu>, dotato della funzione BLASTN. Il successivo allineamento delle sequenze (CLUSTALW) ha evidenziato una percentuale di omologia con le sequenze nucleotidiche codificanti per *Gabra4* pari al 94% in *Rattus norvegicus* e al 83% in *Mus musculus* (fig. IV.4).

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
 - no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
>Gabra4_Mus_musculus 1351 CTTTCATCTGCAGCATCCCCCTCTCCTCATGGCACATTCGGGCCAGCTTC
>Gabra4_Rattus norvegicus CTTTCGTCTGCCGCATCGCCCTCTCCTCACGGGACACTGCAGCCAGCTCC
>Gabra4_Mesocricetus -----TCCTCTCACGGGACACTGCAACCAGCTCC
                               **  ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *
>Gabra4_Mus_musculus      TTTGGGGTCAGCTTCCACTCGCCCTGCATTTGGATCTAGACTTGGGCGAA
>Gabra4_Rattus norvegicus TTTGCGGTGCGGCTCTGCTCGCCCGGCATTTGGAGCTAGACTTGGGCGCA
>Gabra4_Mesocricetus      TTTGCGGTGCGGCTCTGCTCGCCCGGCATTTGGAGCTAGACTTGGGCGAA
                               ****  ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
```

```

>Gabra4_Mus_musculus      TTAAGACAACAGTTAATACAAACAGGGGCTGCTGGGAATGTGTCAGCCACA
>Gabra4_Rattus norvegicus TTAAGACAACAGTTAATACGACAGGGGTGCCTGGGAATGTGTCAGCCACA
>Gabra4_Mesocricetus     TTAAGACAACAGTTAATACGACAGGGGTGCCTGGGAATGTGTCAGCCACA
                          *****
                          *****
                          *****

>Gabra4_Mus_musculus      CCTCCTCCCCTGCTCCACCGCCTTCTGGATCTGGCACAAGTAAAATAGA
>Gabra4_Rattus norvegicus CCTCCTCCCCTGCTCCACCACCTTCTGGATCTGGCACAAGTAAAATAGA
>Gabra4_Mesocricetus     CCTCCTCCCCTGCTCCACCACCAA-----
                          *****
                          *****
                          **

```

Fig. IV.4. Allineamento nucleotidico tra la sequenza parziale di Gabra4 in *Mesocricetus auratus* e quelle di *Mus musculus* e di *Rattus norvegicus* (cds parziale). Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

Ricorrendo allo stesso sito <http://workbench.sdsc.edu>, è stata utilizzata la funzione SIXFRAME, che ha permesso di ottenere la traduzione aminoacidica del frammento nucleotidico, oltre che di verificare l'assenza di codoni di STOP. Il frammento proteico così ottenuto:

```

>Gabra4 Mesocricetus auratus

SSHGTLQPAPLRSASARPAFGARLGRIKTTVNTTGVPGNVSATPPPSAPPP

```

di 52 aa è stato allineato con la sequenza aminoacidica di Gabra4 delle stesse specie considerate per l'allineamento nucleotidico. Successivamente, avvalendosi del software BIOEDIT *Sequenze Allineamento Editor*, è stata calcolata la percentuale di identità e di similarità presentata da *Mesocricetus auratus* rispettivamente con ciascuna delle altre specie considerate (fig. IV.5 a,b).

a) Consensus key (see documentation for details)

```

* - single, fully conserved residue
: - conservation of strong groups
. - conservation of weak groups
- no consensus

```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

>Gabra4_Mus_musculus      LSSAASPSPHGTLRPA SLGSASTRPAFGSRLGRIKTTVNTTGAAGNVSAT
>Gabra4_Rattus norvegicus LSSAASPSPHGTLQPAPLRSASARPAFGARLGRIKTTVNTTGVPGNVSAT
>Gabra4_Mesocricetus     -----SSHGTLQPAPLRSASARPAFGARLGRIKTTVNTTGVPGNVSAT
                          *.****:*.* * **:*****:*****.*****

>Gabra4_Mus_musculus      PPPPAPPPSGSGTSKIDKYARILFPVTFGAFNMVYVWVYLSKDTMEKSES
>Gabra4_Rattus norvegicus PPPSAPPPSGSGTSKIDKYARILFPVTFGAFNMVYVWVYLSKDTMEKSES
>Gabra4_Mesocricetus     PPPSAPPP-----
                          ***.***

```

b)

<i>Mesocricetus auratus</i>	SIMILARITÀ (%)	IDENTITÀ (%)
<i>Rattus norvegicus</i>	100%	98%
<i>Mus musculus</i>	82%	96%

Fig. IV.5. Allineamento del frammento nucleotidico di Gabra4 di *Mesocricetus auratus* con le altre specie (a). Gli asterischi in azzurro indicano un residuo aminoacidico completamente conservato, i due punti in verde la conservazione di gruppi forti, mentre il singolo punto azzurro la conservazione di gruppi deboli. (b) Tabella riassuntiva delle percentuali di similarità e identità calcolate tra la sequenza proteica di *Mesocricetus auratus* e quella relativa alle altre specie prese in esame.

La sequenza parziale di *Mesocricetus auratus* è stata successivamente studiata da un punto di vista funzionale attraverso la predizione della struttura secondaria. L'identificazione di domini conservati tra *Mesocricetus auratus* ed una seconda specie potrebbe infatti fornire importanti indicazioni circa la funzione del tratto aminoacidico. Tale studio è stato realizzato sfruttando il software GOR4, presente all'indirizzo http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl. In particolare sono state confrontate le predizioni della struttura secondaria di *Mesocricetus auratus*, di *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e sono stati ottenuti i seguenti risultati (fig. IV.6):

Query: *Mesocricetus auratus* Gabra4

Sequence SSHGTLQPAP LRSASARPAF GARLGRIKTT VNTTGVPGNV SATPPPSAPP
Structure CCCCCCCCC HHHHHCHHH HHHHCCEEE ECCCCCCCC CCCCCCCCC

Sequence length: 50 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 12 is 24%
 Beta Sheet (E) : 6 is 12%
 Random coil (C) : 32 is 64%

Query: *Rattus norvegicus* Gabra4

460 470 480 490 500
Sequence LSSAASPH | GTLQPAPLRS | ASARPAFGAR | LGRIKTTVNT | TGVPGNVSAT
Structure HCCCCCCC | CCCCCCHHH | HHCCHHHHHH | HCCEEEEEEC | CCCCCCCCC

Sequence PPSAPPSPG | SGTSKIDKYA | RILFPVTFGA | FNMVYVVVYL | SKDTMEKSES
Structure CCCCCCCC | CCCCCHHHHH | EEEEEEEEC | CEEEEEEEC | CCCCCHHHCC

Sequence length: 50 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 12 is 24%
 Beta Sheet (E) : 6 is 12%
 Random coil (C) : 32 is 64%

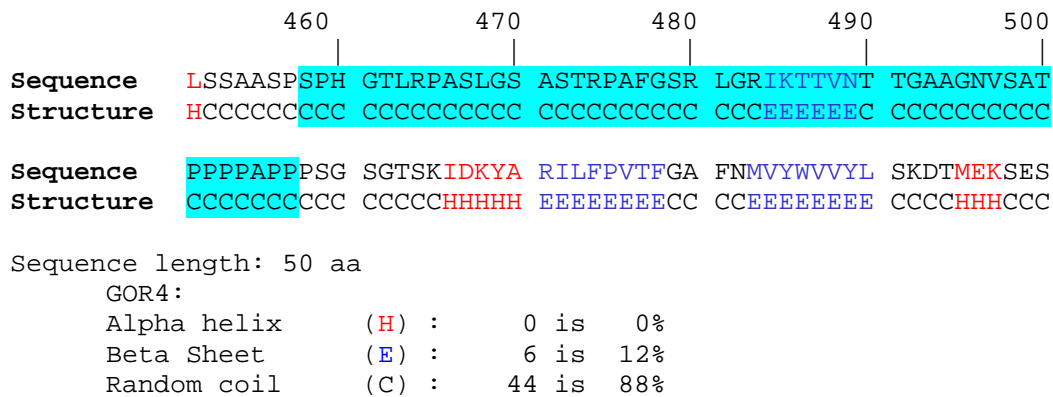
Query: *Mus musculus* Gabra4

Fig. IV.6. Confronto tra la struttura di Gabra4 in *Rattus norvegicus* e in *Mus musculus* e la sequenza parziale ottenuta in *Mesocricetus auratus*, di cui sono riportati in valori percentuale le strutture secondarie. LEGEND: Alpha Helix = H Beta Sheet = E Random Coil = C.

Il confronto tra le predizioni di struttura secondaria mette in evidenza la presenza delle medesime tipologie strutturali in tutte le sequenze analizzate; in particolare si individuano le seguenti tipologie: alfa elica (alpha helix, Hh), filamento disteso (extended strand, Ee) ed avvolgimento casuale (random coil, Cc).

IV.3 Identificazione molecolare di GABA α ₅ in *Mesocricetus auratus*

L'identificazione di *Gabra5* si è avvalsa della stessa procedura sperimentale impiegata nei primi due casi. *Primers* specifici disegnati sulla sequenza di *Gabra5* in *Rattus norvegicus* ha permesso l'identificazione di una porzione dello stesso recettore nella nostra specie di interesse. In accordo con la minima distanza filogenetica tra le due specie, la lunghezza del tratto amplificato visualizzato su gel d'agarosio (1.5%) risulta essere paragonabile. I risultati della reazione di sequenza hanno fornito un frammento nucleotidico complessivo di 86 bp, poiché la parte iniziale e quella terminale del frammento presentano una perdita di purezza come visualizzato sui cromatogrammi mediante Finch TV versione 1.4.0. La sequenza è di seguito riportata:

>Gabra5 *Mesocricetus auratus*

5' AGCTTCCTCAGCCCCAGTGAAACCTTCTGAAGAGAAGACCGCCGAGAGTAAGAAAACCTACACAGCATC
 AGCAAGATCGA-3'

Per verificare se la sequenza ottenuta in *Mesocricetus auratus* corrispondesse realmente alla sequenza di *Gabra5* di tale specie è stato realizzato l'allineamento nucleotidico di *Mesocricetus auratus* con le sequenze di altri Mammiferi, attraverso il

programma di allineamento disponibile *online*, al sito <http://workbench.sdsc.edu>, dotato della funzione BLASTN. Il successivo allineamento delle sequenze (CLUSTALW) ha evidenziato una percentuale di omologia con le sequenze nucleotidiche codificanti per Gabra5 superiori al 79% in *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*, mentre nel caso di *Homo sapiens*, la percentuale di omologia è pari a 76% (fig. IV.7).

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
>Gabra5_Mus_musculus      CCCATCCTCCAAACATCCCAAAGAGCAGCCTCCAGCTGGGACCGCGAAT
>Gabra5_Rattus norvegicus CCCATCCTCCAAACATCCCAAAGGAGCAGCTTCCAGGCGGGACTGGGAAT
>Gabra5_Homo_sapiens      CTCACCCCCCAAACATTCGAAGGAACAGACCCCGAGGACGCTCGAAT
>Gabra5_Mesocricetus      -----CGGGAT
                                     * **

>Gabra5_Mus_musculus      GCACC---CACAGTCTCCATCAAAGCTTCTGAAGAGAAGACTGCGGAGAG
>Gabra5_Rattus norvegicus GCTGTGGGTACAGCCTCAATCAGAGCATCTGAGGAGAAGACTTCTGAGAG
>Gabra5_Homo_sapiens      ACAAC---CTCAGTCTCAGTAAACCTTCTGAAGAGAAGACTTCTGAAAG
>Gabra5_Mesocricetus      GCTTC---CTCAGCCCCAGTGAACCTTCTGAAGAGAAGACCGCCGAGAG
                                     *      *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

>Gabra5_Mus_musculus      TAAAAGACATACAACAGCATCAGCAAGATCGACAAAATGTCCCGGATTG
>Gabra5_Rattus norvegicus TAAAAGACCTACAACAGCATCAGCAAGATCGACAAAATGTCCCGGATTG
>Gabra5_Homo_sapiens      CAAAAGACTTACAACAGTATCAGCAAATTGACAAAATGTCCCGAATCG
>Gabra5_Mesocricetus      TAAGAAAACCTACAACAGCATCAGCAAGATCGA-----
                                     ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Fig. IV.7. Allineamento nucleotidico tra la sequenza parziale di Gabra5 in *Mesocricetus auratus*, quella di *Mus musculus*, *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* (cds parziale). Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

Ricorrendo allo stesso sito <http://workbench.sdsc.edu>, è stata utilizzata la funzione SIXFRAME, che ha permesso di ottenere la traduzione aminoacidica del frammento nucleotidico, oltre che di verificare l'assenza di codoni di STOP.

```
>Gabra5 Mesocricetus auratus
RDASSAPVKPSEEKTAESKKTYSISKI
```

Il frammento proteico così ottenuto di 28 aa è stato allineato con la sequenza aminoacidica di Gabra5 delle stesse specie considerate per l'allineamento nucleotidico. Successivamente, avvalendosi del software BIOEDIT *Sequenze Allineamento Editor*, è stata calcolata la percentuale di identità e di similarità presentata da *Mesocricetus auratus* rispettivamente con ciascuna delle altre specie considerate (fig. IV.8 a,b).

a) **Consensus key** (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
 : - conservation of strong groups
 . - conservation of weak groups
 - no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
>Gabra5_Mus_musculus      WDGKKALEAAKIKKKERELILNKSTNAFTTGKLTHTPPNIPKEQPPAGTAN
>Gabra5_Rattus norvegicus WDGKKALEAAKIKKKERELILNKSTNAFTTGKLTHTPPNIPKEQLPGGTGN
>Gabra5_Homo_sapiens      WDGKKALEAAKIKKK-REVILNKSTNAFTTGKMSHPPNIPKEQTPAGTSN
>Gabra5_Mesocricetus      -----RD
                               :

>Gabra5_Mus_musculus      AP-TVSIKASEEKTAE SKKTYNSISKIDKMSRIVFPILFGTFNLVYWATY
>Gabra5_Rattus norvegicus AVGTASIRASEEKTSE SKKTYNSISKIDKMSRIVFPILFGTFNLVYWATY
>Gabra5_Homo_sapiens      TT-SVSVKPSEEKTSE SKKTYNSISKIDKMSRIVFPVLFGTFNLVYWATY
>Gabra5_Mesocricetus      AS-SAPVKPSEEKTAE SKKTYNSISKI-----
                               :  . . . . . *****:*****
```

b)

<i>Mesocricetus auratus</i>	SIMILARITÀ (%)	IDENTITÀ (%)
<i>Rattus norvegicus</i>	93%	67%
<i>Mus musculus</i>	92%	73%
<i>Homo sapiens</i>	93%	75%

Fig. IV.8. Allineamento del frammento nucleotidico di Gabra5 di *Mesocricetus auratus* con le altre specie (a). Gli asterischi in azzurro indicano un residuo aminoacidico completamente conservato, i due punti in verde la conservazione di gruppi forti, mentre il singolo punto azzurro la conservazione di gruppi deboli. (b) Tabella riassuntiva delle percentuali di similarità e identità calcolate tra la sequenza proteica di *Mesocricetus auratus* e quella relativa alle altre specie prese in esame.

La sequenza parziale di *Mesocricetus auratus* è stata successivamente studiata da un punto di vista funzionale attraverso la predizione della struttura secondaria. L'identificazione di domini conservati tra *Mesocricetus auratus* ed una seconda specie potrebbe infatti fornire importanti indicazioni circa la funzione del tratto aminoacidico. Tale studio è stato realizzato sfruttando il software GOR4, presente all'indirizzo http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl. In particolare sono state confrontate le predizioni della struttura secondaria di *Mesocricetus auratus*, di *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e sono stati ottenuti i seguenti risultati (fig. IV.9):

Query: *Mesocricetus auratus* Gabra5

```
Sequence  RDASSAPVKP SEEKTAESKK TYNSISKI
Structure CCCCCCCCC CCCCHHHHHC CEEEEEEC
```

Sequence length: 28 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 5 is 18%
 Beta Sheet (E) : 6 is 21%
 Random coil (C) : 17 is 61%

Query: *Rattus norvegicus* Gabra5

	360	370	380	390	400
Sequence	WDGKKALEAA	KIKKKERELI	LNKSTNAFTT	GKLTHPPNIP	KEQLPGGTGN
Structure	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HCCCCCEEC	CCCCCCCCCC	CCCCCCCCCC
Sequence	AVGTASIRAS	EKTSESCKT	YNSISKIDKM	SRIVFPILFG	TFNLVYWATY
Structure	CCCHHHHHHH	HHHCCCCC	EEEEEECCC	EEEEEEEEEC	CCEEEECEEC

Sequence length: 28 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 10 is 36%
 Beta Sheet (E) : 7 is 25%
 Random coil (C) : 12 is 43%

Query: *Mus musculus* Gabra5

	360	370	380	390	400
Sequence	WDGKKALEAA	KIKKKERELI	LNKSTNAFTT	GKLTHPPNIP	KEQPPAGTAN
Structure	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HCCCCCEEC	CCCCCCCCCC	CCCCCCCCCC
Sequence	APTVSIKASE	EKTAESCKTY	NSISKIDKMS	RIVFPILFGT	FNLVYWATYL
Structure	CCCHHHHHHH	HHHHHHHCC	CEEEEECCC	EEEEEEEEEC	CEEEEECEEC

Sequence length: 28 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 14 is 50%
 Beta Sheet (E) : 5 is 18%
 Random coil (C) : 9 is 32%

Fig. IV.9. Confronto tra la struttura di Gabra5 in *Rattus norvegicus* e in *Mus musculus* e la sequenza parziale ottenuta in *Mesocricetus auratus*, di cui sono riportati in valori percentuale le strutture secondarie. LEGEND: Alpha Helix = H Beta Sheet = E Random Coil = C.

IV.4 Identificazione molecolare di Syn in *Mesocricetus auratus*

Analogamente a quanto riportato per le subunità GABA_Aergiche, l'impiego di primers disegnati sulla sequenza di Syn di *Rattus norvegicus* ha permesso l'identificazione di una porzione dello stesso marcatore nella specie *Mesocricetus auratus*. In accordo con la minima distanza filogenetica tra le due specie, la lunghezza del tratto amplificato visualizzato su gel d'agarosio (1.5%) risulta essere paragonabile. I risultati della reazione di sequenza hanno fornito un frammento nucleotidico

complessivo di 158 bp, poiché la parte iniziale e quella terminale del frammento presentano una perdita di purezza come visualizzato sugli cromatogrammi mediante Finch TV versione 1.4.0. La sequenza è di seguito riportata:

```
>syn Mesocricetus auratus
```

```
5'-ACATTATCAAGCAGATGCCTGTGTGTCACCAGACAGGGAACACTTGCAAGGAACTGA
GGGACCCTGTGACTTCAGGACTCAACACCTCAGTGGTGTGGCTTCCTGAACCTGGTGCTCTGGGTTGG
CAACCTATGGTTCGTGTTCAAGGAGACAGGA -3'
```

Per verificare se la sequenza ottenuta in *Mesocricetus auratus* corrispondesse realmente alla sequenza di *Syn* di tale specie è stato realizzato l'allineamento nucleotidico di *Mesocricetus auratus* con le sequenze di altri Mammiferi, attraverso il programma di allineamento disponibile *online*, al sito <http://workbench.sdsc.edu>, dotato della funzione BLASTN. Il successivo allineamento delle sequenze (CLUSTALW) ha evidenziato una percentuale di omologia con le sequenze nucleotidiche codificanti per *Syn* pari al 95% in *Rattus norvegicus* e al 95% in *Mus musculus*. Nel caso di *Homo sapiens*, la percentuale di omologia è pari a 91% (fig. IV.10).

Consensus key (see documentation for details)

```
* - single, fully conserved residue
- no consensus
```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
>Syn_Rattus norvegicus 483TGTGAAGATGGCCACGGACCCAGAGAACATTATCAAGGAGATGCCATGT
>Syn_Mus musculus      TGTGAAGATGGCCACTGACCCAGAGAACATTATCAAGGAGATGCCTATGT
>Syn_Mesocricetus     -----ACATTATCAAGCAGATGCCTGTGT
>Syn_Homo sapiens     TGTGAAGATGGCCACAGACCCAGAGAACATTATCAAGGAGATGCCTGTCT
                        ***** * * * *
>Syn_Rattus norvegicus GCCGCCAGACAGGGAACACATGCAAGGAAGCTGAGGGACCCCTGTGACTTCA
>Syn_Mus musculus     GCCGCCAGACAGGAAACACATGCAAGGAAGCTGAGGGACCCCTGTGACTTCA
>Syn_Mesocricetus     GTCACCAGACAGGGAACACTGCAAGGAAGCTGAGGGACCCCTGTGACTTCA
>Syn_Homo sapiens     GCCGCCAGACAGGGAACACATGCAAGGAGCTGAGAGACCCCTGTGACCTCG
                        * * ***** * * * *
>Syn_Rattus norvegicus GGACTCAACACCTCAGTGGTGTGGCTTCCTGAACCTGGTGCTCTGGGT
>Syn_Mus musculus     GGACTCAACACCTCGGTGGTGTGGCTTCCTGAACCTGGTGCTCTGGGT
>Syn_Mesocricetus     GGACTCAACACCTCAGTGGTGTGGCTTCCTGAACCTGGTGCTCTGGGT
>Syn_Homo sapiens     GGACTCAACACCTCGGTGGTGTGGCTTCCTGAACCTGGTGCTCTGGGT
                        ***** * * * *
>Syn_Rattus norvegicus TGGCAACTTATGGTTCGTGTTCAAGGAGACAGGCTGGGCCGCCCCATTCA
>Syn_Mus musculus     TGGCAACCTATGGTTCGTGTTCAAGGAGACAGGCTGGGCCGCCCCATTCA
>Syn_Mesocricetus     TGGCAACCTATGGTTCGTGTTCAAGGAGACAGGA-----
>Syn_Homo sapiens     CGGCAACCTGTGGTTCGTGTTAAGGAGACAGGCTGGGCCGCCCCGTTCC
                        ***** * * * *

```

Fig. IV.10. Allineamento nucleotidico tra la sequenza parziale di *Syn* in *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* (cds parziale). Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

Ricorrendo allo stesso sito <http://workbench.sdsc.edu>, è stata utilizzata la funzione SIXFRAME, che ha permesso di ottenere la traduzione aminoacidica del frammento nucleotidico, oltre che di verificare l'assenza di codoni di STOP.

```
>Syn Mesocricetus auratus
```

```
IIKQMPVCHQTGNTCKELRDPVTSGLNTSVVFGFLNLVWVGNLWVFKETG
```

Il frammento proteico così ottenuto di 52 aa è stato allineato con la sequenza aminoacidica di Syn delle stesse specie considerate per l'allineamento nucleotidico. Successivamente, avvalendosi del software BIOEDIT *Sequenze Allineament Editor*, è stata calcolata la percentuale di identità e di similarità presentata da *Mesocricetus auratus* rispettivamente con ciascuna delle altre specie considerate (fig. IV.11 a,b).

a) **Consensus key** (see documentation for details)

```
* - single, fully conserved residue
: - conservation of strong groups
. - conservation of weak groups
- no consensus
```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
>Syn_Mesocricetus      -----IIKQMPVCHQTGNTCKELRDPVTS
>Syn_Homo sapiens      AFMWLVS S S A W A K G L S D V K M A T D P E N I I K E M P V C R Q T G N T C K E L R D P V T S
>Syn_Rattus norvegicus AFMWLVS S S A W A K G L S D V K M A T D P E N I I K E M P M C R Q T G N T C K E L R D P V T S
>Syn_Mus musculus      AFMWLVS S S A W A K G L S D V K M A T D P E N I I K E M P M C R Q T G N T C K E L R D P V T S
                                     ***:***:*****

>Syn_Mesocricetus      GLNTSVVFGFLNLVWVGNLWVFKETG-----
>Syn_Homo sapiens      GLNTSVVFGFLNLVWVGNLWVFKETGWAAPFLRAPPGAPEKQPAPGDA
>Syn_Rattus norvegicus GLNTSVVFGFLNLVWVGNLWVFKETGWAAPFMRAPPGAPEKQPAPGDA
>Syn_Mus musculus      GLNTSVVFGFLNLVWVGNLWVFKETGWAAPFMRAPPGAPEKQPAPGDA
                                     *****
```

b)

<i>Mesocricetus auratus</i>	SIMILARITÀ (%)	IDENTITÀ (%)
<i>Rattus norvegicus</i>	100%	94%
<i>Mus musculus</i>	100%	94%
<i>Homo sapiens</i>	100%	96%

Fig. IV.11. Allineamento del frammento nucleotidico di Syn di *Mesocricetus auratus* con le altre specie (a). Gli asterischi in azzurro indicano un residuo aminoacidico completamente conservato, i due punti in verde la conservazione di gruppi forti, mentre il singolo punto azzurro la conservazione di gruppi deboli. (b) Tabella riassuntiva delle percentuali di similarità e identità calcolate tra la sequenza proteica di *Mesocricetus auratus* e quella relativa alle altre specie prese in esame.

La sequenza parziale di *Mesocricetus auratus* è stata successivamente studiata da un punto di vista funzionale attraverso la predizione della struttura secondaria. L'identificazione di domini conservati tra *Mesocricetus auratus* ed una seconda specie potrebbe infatti fornire importanti indicazioni circa la funzione del tratto aminoacidico.

Tale studio è stato realizzato sfruttando il software GOR4, presente all'indirizzo http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl. In particolare sono state confrontate le predizioni della struttura secondaria di *Mesocricetus auratus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e sono stati ottenuti i seguenti risultati (fig. IV.12):

Query: *Mesocricetus auratus* Syn

Sequence IIKQMPVCHQ TGNTCKELRD PVTSGLNLSV VFGFLNLVLW VGNLWVFVKE
Structure CCCCCCECC CCCCCCECC CCCCCCCCC EEEEEEEEE CCCEEEEEEE

Sequence TG
Structure EC

Sequence length: 52 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 0 is 0%
 Beta Sheet (E) : 23 is 44.23%
 Random coil (C) : 29 is 55.77%

Query: *Rattus norvegicus* Syn

	160	170	180	190	200
Sequence	SSSAWAKGLS	DVKMATDPEN	IIKEMPMCRQ	TGNTCKELRD	PVTSGLNLSV
Structure	CCHHHHHCCC	CCCCCCCCCC	EEEECCCEEE	CCCCCCCCCC	CCCCCCCCCC

Sequence	VFGFLNLVLW	VGNLWVFVKE	TGWAAPFMRA	PPGAPEKQPA	PGDAYGDAGY
Structure	EEEEEEEEEE	CCCEEEEEEE	CCCCCCCCCC	CCCCCCCCCC	CCCCCCCCCC

Sequence length: 52 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 0 is 0%
 Beta Sheet (E) : 24 is 46.15%
 Random coil (C) : 28 is 53.85%

Query: *Mus musculus* Syn

	160	170	180	190	200
Sequence	AFMWLVSSSA	WAKGLSDVKM	ATDPENIIKE	MPMCRQTGNT	CKELRDPVTS
Structure	EEEEECCHH	HHHCCCCCCC	CCCCCEEE	CCCEEECCCC	CCCCCCCCCC

Sequence	GLNTSVVFGF	LNLVLWVGNL	WFVFKETGWA	APFMRAPPGA	PEKQPAPGDA
Structure	CCCCCEEEEE	EEEEEECCCE	EEEEEECCCC	CCCCCCCCCC	CCCCCCCCCC

Sequence length: 52 aa

```

GOR4:
Alpha helix      (H) :      0 is  0%
Beta Sheet      (E) :     24 is 46.15%
Random coil     (C) :     28 is 53.85%

```

Fig. IV.12. Confronto tra la struttura di Syn in *Rattus norvegicus* e in *Mus musculus* e la sequenza parziale ottenuta in *Mesocricetus auratus*, di cui sono riportati in valori percentuale le strutture secondarie. LEGEND: Alpha Helix = H Beta Sheet = E Random Coil = C.

IV.5 Identificazione molecolare di MAP2 in *Mesocricetus auratus*

L'uso di *primers* disegnati sulla sequenza di *Mtap2* di *Rattus norvegicus* ha consentito l'identificazione di una porzione del recettore nella specie *Mesocricetus auratus*. In accordo con la minima distanza filogenetica tra le due specie, la lunghezza del tratto amplificato visualizzato su gel d'agarosio (1.5%) risulta essere paragonabile. I risultati della reazione di sequenza hanno fornito un frammento nucleotidico complessivo di 152 bp, poiché la parte iniziale e quella terminale del frammento presentano una perdita di purezza come visualizzato sui cromatogrammi mediante Finch TV versione 1.4.0. La sequenza è di seguito riportata:

```

>mtap2_Mesocricetus auratus

5' - GAAAAGCTGGGAAGGCCACAGAGCTCAAGTTCGAGATGTCTCCAGAGCTGGCCCTC
TCGTCCAAAGAACCCAAGAAGAGGATTCATTCATGGGTGTTGAGTCTGGCCACATGAAAGAAGGTGCCAA
AGTCAATGAAACAGAAGTCAAAGAG -3'

```

Per verificare se la sequenza ottenuta in *Mesocricetus auratus* corrispondesse realmente alla sequenza di *Mtap2* di tale specie è stato realizzato l'allineamento nucleotidico di *Mesocricetus auratus* con le sequenze di altri Mammiferi, attraverso il programma di allineamento disponibile *online*, al sito <http://workbench.sdsc.edu>, dotato della funzione BLASTN. Il successivo allineamento delle sequenze (CLUSTALW) ha evidenziato una percentuale di omologia con le sequenze nucleotidiche codificanti per MAP2 pari al 80% in *Rattus norvegicus* e al 75% in *Homo sapiens*. (fig. IV.13).

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

>mtap2_Hom 3154 AAAATTAGTGACTTTGGACAGATGGCTTCAGGGCTAAACATAGATGATAGAAGGGCAACA
>mtap2_Rattus AAAGTCAGTGACTTTGGACAGATGGCTTCTGGGATGAGTGTAGATGCTGGGAAAACCATAG
>mtap2_Mesocri -----GAAAAGCTGGGAAGGCCACA
                        * * * * * * * *

```



```

>mtap2_Homo      GAGCTAAAACCTTGAGGCTACACAGGACATGACCCCTCATCCAAAGCACCCGAGGAGGCA
>mtap2_Rattus    GAGCTTAAGTTCGAGGTTGATCAGCAGCTGACTCTCTCATCCGAAGCACCTCAGGAAACA
>mtap2_Mesocri   GAGCTCAAGTTCGAGATGTCTCCAGAGCTGGCCCTCTCGTCCAAGAACCTCAAGAAGAG
*****  **  *  ***          *   *  **  *  *  ***  ***  ***  ***  **  **

>mtap2_Homo      GATGCATTATGGGTGTTGAGTCTGGCCACATGAAAGAAGGCACATAAAGTTAGTGAGACA
>mtap2_Rattus    GATTCATTATGGGTGTTGAGTCTGGCCACATGAAAGAAGGCACATAAAGTTAGTGAGACA
>mtap2_Mesocri   GATTCATTATGGGTGTTGAGTCTGGCCACATGAAAGAAGGCACATAAAGTTAGTGAGACA
***  ***  *****  *****  *****  *****  **  *  *****  *  ***  ***

>mtap2_Homo      GAAGTCAAAGAGAAGGTGGCCAAGCCTGACTTGGTGCACCAGGAGGCTGTAGACAAGGAG
>mtap2_Rattus    GAAGTCAAAGAGAAGGTGGCCAAGCCTGACTTGGTGCATCAGGAGGCTGTGGACAAAGAA
>mtap2_Mesocri   GAAGTCAAAGAG-----
*****

```

Fig. IV.13. Allineamento nucleotidico tra la sequenza parziale di Mtap2 in *Mesocricetus auratus* e quelle di *Homo sapiens* e di *Rattus norvegicus* (cds parziale). Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

Ricorrendo allo stesso sito <http://workbench.sdsc.edu>, è stata utilizzata la funzione SIXFRAME, che ha permesso di ottenere la traduzione aminoacidica del frammento nucleotidico, oltre che di verificare l'assenza di codoni di STOP. Il frammento proteico così ottenuto:

```

>mtap2_Mesocricetus auratus
KAGKATELKFEMSPPELALSSKEPQEEDSFMGVESGHMKEGAKVNETEVKE

```

di 50 aa è stato allineato con la sequenza aminoacidica di MAP2 delle stesse specie considerate per l'allineamento nucleotidico. Successivamente, avvalendosi del software BIOEDIT *Sequenze Allineamento Editor*, è stata calcolata la percentuale di identità e di similarità presentata da *Mesocricetus auratus* rispettivamente con ciascuna delle altre specie considerate (fig. IV.14 a,b).

a) **Consensus key** (see documentation for details)
* - single, fully conserved residue
: - conservation of strong groups
. - conservation of weak groups
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

>mtap2_Homo      EKA EKGLSSVPEIAEVEPSK KVEQGLDFAVQG---QLDVKISDFGQMASGLNIDRRAT
>mtap2_Rattus    ERA EKGLSSVPEVAEVE'TTTKADQGLDVA AKKDDQSPLDIKVSDFGQMASGMSVDAGKTI
>mtap2_Mesocri   -----KAGKAT
                                     .  ::

>mtap2_Homo      ELKLEATQDMTPSSKAPQEADAFMGVESHMKEGTVK VSETEVKEKVAKPDLVHQEAVDKE
>mtap2_Rattus    ELKFEVDQQLTLSSEAPQETDSFMGIESSHVKDGAKVSETEVKEKVAKPDLVHQEAVDKE
>mtap2_Mesocri   ELKFEMSPPELALSSKEPQEEDSFMGVESHMKEGAKVNETEVKE-----
***:*      ::: **  **  *::*:**  *::*:**  *::*:**  *::*:**  *::*:**

```

b)

<i>Mesocricetus auratus</i>	SIMILARITÀ (%)	IDENTITÀ (%)
<i>Rattus norvegicus</i>	86%	68%
<i>Homo sapiens</i>	84%	66%

Fig. IV.14. Allineamento del frammento aminoacidico di MAP2 di *Mesocricetus auratus* con le altre specie (a). Gli asterischi in azzurro indicano un residuo aminoacidico completamente conservato, i due punti in verde la conservazione di gruppi forti, mentre il singolo punto azzurro la conservazione di gruppi deboli. (b) Tabella riassuntiva delle percentuali di similarità e identità calcolate tra la sequenza proteica di *Mesocricetus auratus* e quella relativa alle altre specie prese in esame.

La sequenza parziale di *Mesocricetus auratus* è stata successivamente studiata da un punto di vista funzionale attraverso la predizione della struttura secondaria. L'identificazione di domini conservati tra *Mesocricetus auratus* ed una seconda specie potrebbe infatti fornire importanti indicazioni circa la funzione del tratto aminoacidico. Tale studio è stato realizzato sfruttando il software GOR4, presente all'indirizzo http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl. In particolare sono state confrontate le predizioni della struttura secondaria di *Mesocricetus auratus*, di *Rattus norvegicus* e di *Homo sapiens* e sono stati ottenuti i seguenti risultati (fig. IV.15):

Query: *Mesocricetus auratus* MAP2

Sequence KAGKATELKF EMSPELALSS KEPQEEDSFM GVESG~~HM~~KEG AKVNETEVKE
Structure CCCCCECCC CCC~~HHHH~~HC CCCCC~~EE~~EE E~~EE~~EE~~HHHH~~C CCCC~~EE~~EE

Sequence length: 50 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 10 is 20%
 Beta Sheet (E) : 13 is 26%
 Random coil (C) : 27 is 54%

Query: *Rattus norvegicus* MAP2

1060 1070 1080 1090 1100
Sequence IKVDFGQMA SGMSV~~DAGKT~~ IELKFEVDQQ LTLSS~~EAPQE~~ TDSFMGI~~ESS~~
Structure EEECCCCC CC~~EE~~EE~~CC~~CH HHHHHHHHHH HHHCCCCC CCCC~~EE~~EE
Sequence HVKDGA~~KVSE~~ TEVKE~~KVAKP~~ DLVHQEAVDK EESYESSGEH ESLT~~MESLKP~~
Structure CCCC~~EE~~CH HHHHH~~HH~~CC CHHHHHHHHH HHCCCC~~CH~~ HHHHH~~HH~~CC

Sequence length: 50 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 20 is 40%
 Beta Sheet (E) : 7 is 14%
 Random coil (C) : 23 is 54%

Query: *Homo sapiens* MAP2

		1060	1070	1080	1090	1100
Sequence	SDFGQMASGL	NI	DDRRATEL	KLEATQDMTP	SSKAPQEADA	FMGVESGHM
Structure	ECCCCCCCC	CC	CHHHHHHH	HHHHHHCCCC	CCCCCHHHHH	HHHHHCCCC
Sequence	EGTKVSETEV	KEKVAKPDLV	HQEAVDKEES	YESSGEHESL	TMESLKADEG	
Structure	CCCEECHHHH	HHHHCCCCHH	HHHHHHHHHC	CCCCCHHHH	HHHHHHHHCC	

Sequence length: 50 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 29 is 58%
 Beta Sheet (E) : 2 is 4%
 Random coil (C) : 19 is 38%

Fig. IV.15. Confronto tra la struttura di MAP2 in *Rattus norvegicus* e in *Homo sapiens* e la sequenza parziale ottenuta in *Mesocricetus auratus*, di cui sono riportati in valori percentuale le strutture secondarie. LEGEND: Alpha Helix = H Beta Sheet = E Random Coil = C.

IV.6 Identificazione molecolare di β -actina in *Mesocricetus auratus*

L'utilizzo di *primers* disegnati sulla sequenza di *Actb* di *Rattus norvegicus* ha consentito l'identificazione di una porzione di tale recettore nella specie *Mesocricetus auratus*. La minima distanza filogenetica tra le due specie e la lunghezza del tratto amplificato visualizzato su gel d'agarosio (1.5%) risultano essere paragonabile. I risultati della reazione di sequenza hanno fornito un frammento nucleotidico complessivo di 112 bp, poiché la parte iniziale e quella terminale del frammento presentano una perdita di purezza come visualizzato sui cromatogrammi mediante Finch TV versione 1.4.0. La sequenza è di seguito riportata:

>actb_Mesocricetus auratus

```
5' - TTCCAGCCTTCCTTCCTGGGTATGGAATCCTGTGGCATCCACGAAACTACATTCAA
CTCCATCATGAAGTGTGACGTCGACATCCGCAAAGACCTCTATGCCAACACAGTGC -3'
```

Per verificare se la sequenza ottenuta in *Mesocricetus auratus* corrispondesse realmente alla sequenza di *actb* di tale specie è stato effettuato l'allineamento nucleotidico di *Mesocricetus auratus* con le sequenze di altri Mammiferi, attraverso il programma di allineamento disponibile *online*, al sito <http://workbench.sdsc.edu>, dotato della funzione BLASTN. Il successivo allineamento delle sequenze (CLUSTALW) ha evidenziato una percentuale di omologia con le sequenze nucleotidiche codificanti per la β -actina superiore al 95% in tutte le specie considerate (fig. IV.16).

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
 - no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
>actb_Mus_musculus      833  GGCAACGAGCGGTTCGATGCCCTGAGGCTCTTTCCAGCCTTCCTTCTT
>actb_Rattus_norvegicus GGCAATGAGCGGTTCGATGCCCGAGGCTCTC TTCCAGCCTTCCTTCCT
>actb_Mesocricetus      -----TTCCAGCCTTCCTTCCT
>actb_Homo_sapiens      GGCAATGAGCGGTTCGCTGCCCTGAGGCACTCTTCCAGCCTTCCTTCCT
                               ***** *

>actb_Mus_musculus      GGGTATGGAATCCTGTGGCATCCATGAAACTACATTCAATTCATCATGA
>actb_Rattus_norvegicus GGGTATGGAATCCTGTGGCATCCATGAAACTACATTCAATTCATCATGA
>actb_Mesocricetus      GGGTATGGAATCCTGTGGCATCCACGAAACTACATTCAATTCATCATGA
>actb_Homo_sapiens      GGGCATGGAGTCTGTGGCATCCACGAAACTACCTTCAATTCATCATGA
                               ***  *****

>actb_Mus_musculus      AGTGTGACGTGACATCCGTAAGACCTCTATGCCAACACAGTGTGTCT
>actb_Rattus_norvegicus AGTGTGACGTGACATCCGTAAGACCTCTATGCCAACACAGTGTGTCT
>actb_Mesocricetus      AGTGTGACGTGACATCCGCAAAGACCTCTATGCCAACACAGTGC-----
>actb_Homo-sapiens      AGTGTGACGTGACATCCGCAAAGACCTGTACGCCAACACAGTGTGTCT
                               *****  ***** * *****
```

Fig. IV.16. Allineamento nucleotidico tra le sequenze parziali del gene per β -actina in *Mesocricetus auratus*, *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* (cds parziale). Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

Ricorrendo allo stesso sito <http://workbench.sdsc.edu>, è stata utilizzata la funzione SIXFRAME, che ha permesso di ottenere la traduzione aminoacidica del frammento nucleotidico, oltre che di verificare l'assenza di codoni di STOP.

```
>actb_Mesocricetus auratus

FQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANTV
```

Il frammento proteico così ottenuto di 37 aa è stato allineato con la sequenza aminoacidica di β -actina delle stesse specie considerate per l'allineamento nucleotidico. Successivamente, avvalendosi del software BIOEDIT *Sequenze Allineament Editor*, è stata calcolata la percentuale di identità e di similarità presentata da *Mesocricetus auratus* rispettivamente con ciascuna delle altre specie considerate (fig. IV.17 a,b).

a) **Consensus key** (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
 : - conservation of strong groups
 . - conservation of weak groups
 - no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
>actb_Homo_sapiens      GNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS
>actb_Mus_musculus      GNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS
>actb_Mesocricetus      -----FQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANTV--
>actb_Rattus            GNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS
                               *****
```

b)

<i>Mesocricetus auratus</i>	SIMILARITÀ (%)	IDENTITÀ (%)
<i>Rattus norvegicus</i>	100%	100%
<i>Mus musculus</i>	100%	100%
<i>Homo sapiens</i>	100%	100%

Fig. IV.17. Allineamento del frammento nucleotidico di actb di *Mesocricetus auratus* con le altre specie (a). Gli asterischi in azzurro indicano un residuo aminoacidico completamente conservato. (b) Tabella riassuntiva delle percentuali di similarità e identità calcolate tra la sequenza proteica di *Mesocricetus auratus* e quella relativa alle altre specie prese in esame.

La sequenza parziale di *Mesocricetus auratus* è stata successivamente studiata da un punto di vista funzionale attraverso la predizione della struttura secondaria. L'identificazione di domini conservati tra *Mesocricetus auratus* ed una seconda specie potrebbe infatti fornire importanti indicazioni circa la funzione del tratto aminoacidico. Tale studio è stato realizzato sfruttando il software GOR4, presente all'indirizzo http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl. In particolare sono state confrontate le predizioni della struttura secondaria di *Mesocricetus auratus*, di *Rattus norvegicus* e di *Mus musculus* e sono stati ottenuti i seguenti risultati (fig. IV.18):

Query: *Mesocricetus auratus* β -actina

Sequence FQPSFLGMES CGIHETTFNS IMKCDVDIRK DLYANTV
Structure CCCCCCCCC CCCCEEEEC CCCCCCCCC CCEEEEC

Sequence length: 37 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 0 is 0%
 Beta Sheet (E) : 8 is 21.62%
 Random coil (C) : 29 is 78.38%

Query: *Rattus norvegicus* β -actina

260 270 280 290 300
Sequence GNERFRCPEA L FQPSFLGME SCGIHETTFN SIMKCDVDIR KDLYANTVLS
Structure ECCCCCCCC C CCCCCCCCC CCCCEEEEC CCCCCCCCC CCCCCEEEC

Sequence length: 37 aa

GOR4:
 Alpha helix (H) : 0 is 0%
 Beta Sheet (E) : 6 is 16.22%
 Random coil (C) : 31 is 83.78%

Query: *Mus musculus* β -actina

		260	270	280	290	300
Sequence	GNERFRCPEA	L	FQPSFLGME	SCGIHETTFN	SIMKCDVDIR	KDLYANTVLS
Structure	ECCCCCCCC	C	CCCCCCCCC	CCCCEEEEC	CCCCCCCCC	CCCCCEEEC

Sequence length: 37 aa

GOR4:

Alpha helix	(H)	:	0	is	0%
Beta Sheet	(E)	:	6	is	16.22%
Random coil	(C)	:	31	is	83.78%

Fig. IV.18. Confronto tra la struttura della β -actina in *Rattus norvegicus* e in *Mus musculus* e la sequenza parziale ottenuta in *Mesocricetus auratus*, di cui sono riportati in valori percentuale le strutture secondarie. LEGEND: Alpha Helix = H Beta Sheet = E Random Coil = C.

Tabella riassuntiva sequenze identificate

gene	sequenza	Lunghezza (bp)	GenBank
GABA α_2	CATGATACAGAACAACGCCTATGCTGTAGCCG TTGCCAACTACGCCCGAATCTTCCAAAGAT CCTGTCTCTCTACCAATTCAAAAA	90 bp	1300238
GABA α_4	TCCTCTCACGGGACACTGCAACCAGCTCCTTT GCGGTCGGCGTCTGCTCGCCCGGCATTGGAG CTAGACTTGGGCGAATTAAGACAACAGTTAAT ACGACAGGGGTGCCTGGGAATGTGTCAGCCA CACCTCTCCCTCTGC	157 bp	1300240
GABA α_5	AGCTTCTCAGCCCCAGTGAAACCTTCTGAAG AGAAGACCGCCGAGAGTAAGAAAACCTACAC AGCATCAGCAAGATCGA	86 bp	1300246
Sinaptofisina	ACATTATCAAGCAGATGCCTGTGTGTCACCAG ACAGGGAACACTTGCAAGGAACTGAGGGACC CTGTGACTTCAGGACTCAACACCTCAGTGGTG TTGGCTTCTGAACCTGGTGTCTGGGTTGG CAACCTATGGTTTCGTGTTCAAGGAGACAGGA	158 bp	GU586152
MAP2	GAAAAGCTGGGAAGGCCACAGAGCTCAAGTT CGAGATGTCTCCAGAGCTGGCCCTCTCGTCCA AAGAACCCAAGAAGAGGATTCATTCATGGGT GTTGAGTCTGGCCACATGAAAGAAGGTGCCA AAGTCAATGAAACAGAAGTCAAAGAG	152 bp	GU586150
β-actina	TTCCAGCCTTCTTCTGGGTATGGAATCCTGT GGCATCCACGAAACTACATTCAACTCCATCAT GAAGTGTGACGTCGACATCCGCAAAGACCTCT ATGCCAACACAGTGC	112 bp	GU586151

RISULTATI

Ottimizzazione del sistema di coltura bioartificiale per neuroni ippocampali

V.1 Differenziamento dei neuroni ippocampali di *Mesocricetus auratus in vitro*

Nella parte iniziale di questo lavoro, la determinazione delle caratteristiche morfostrutturali dei neuroni ippocampali di criceto in coltura agli stadi DIV3 e DIV7 è stata realizzata sia mediante analisi al microscopio ottico che attraverso studi di immunofluorescenza. I risultati rivelano un pattern di distribuzione spazio-temporale di specifici antigeni neuronali impiegati come marcatori sia del differenziamento dell'intera cellula (β -tubulina) che dell'elemento assonico (GAP43) e dendritico (MAP2). Allo stadio DIV3 i neuroni ippocampali si presentano al microscopio ottico come una rete in via di sviluppo (fig. V.1a), osservazione confermata dal grado di distribuzione della β -tubulina che appare espressa in maniera uniforme in tutta la cellula (fig. V.1c,f). In particolare, dalla distribuzione della GAP43 (fig. V.1b) emerge un discreto sviluppo dei prolungamenti assonici presenti a questo stadio in tutte le cellule, mentre il segnale di fluorescenza fornito dalla MAP2 (fig. V.1e) suggerisce che a DIV3 tale proteina appare confinata prevalentemente nel corpo cellulare e moderatamente nei dendriti, il cui differenziamento non risulta ancora completato. L'elaborazione combinata dei due segnali di fluorescenza (fig. V.1d,g) fornisce un quadro completo del grado di complessità della rete neuronale allo stadio DIV3.

Allo stadio DIV7, l'osservazione al microscopio ottico evidenzia una trama neuronale ben sviluppata caratterizzata da un maggior numero di contatti sinaptici tra i processi delle cellule ippocampali (fig. V.2a). L'analisi condotta al microscopio confocale conferma sia il maggior grado di sviluppo della rete neuronale, come si evince dalla distribuzione della β -tubulina (fig. V.2c,f) che una maggiore estensione dei prolungamenti assonici, ove l'espressione della GAP43 aumenta considerevolmente (fig. V.2b), e dendritici nei quali la MAP2 risulta abbondantemente distribuita (fig. V.2e). Anche in questo caso, l'elaborazione combinata dei due segnali di fluorescenza (fig. V.2d,g) fornisce un segnale completo del grado di complessità della rete neuronale a DIV8, che risulta molto più specializzata se confrontata con quella osservata allo stadio DIV3.

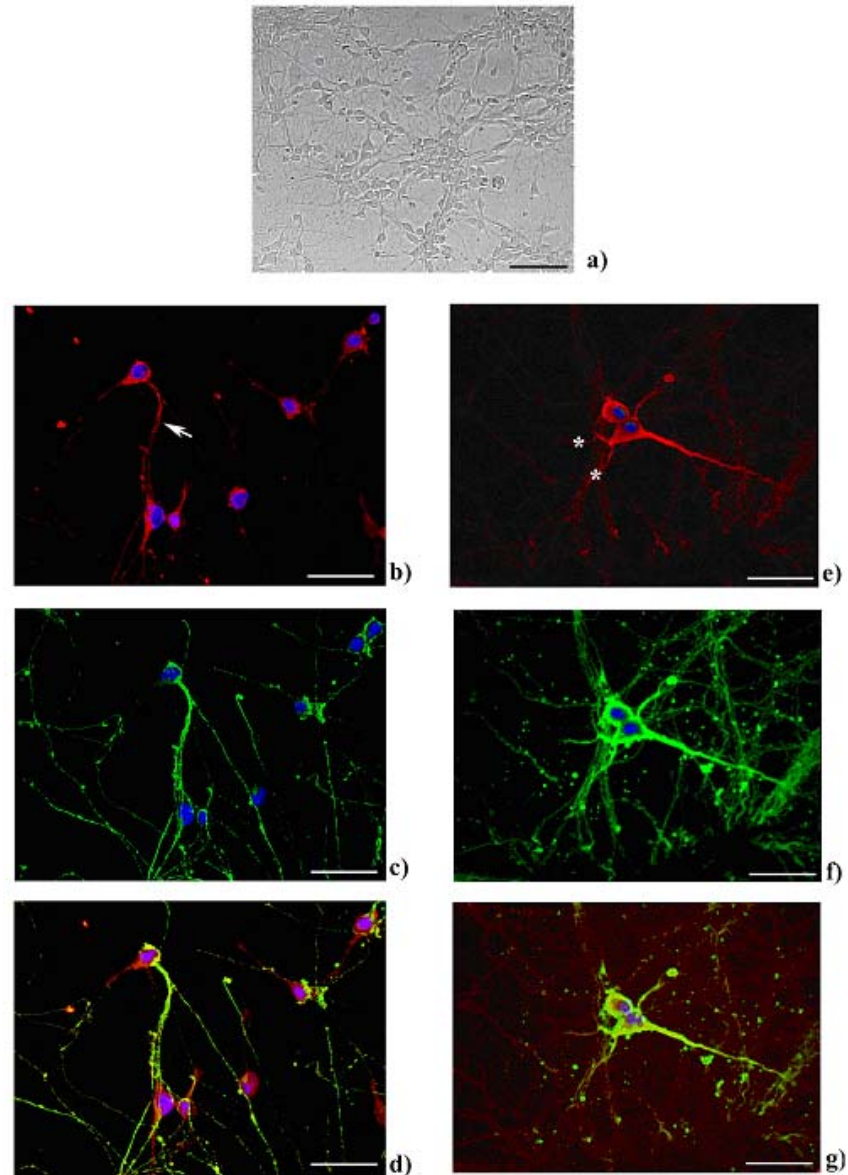


Fig. V.1. Neuroni ippocampali allo stadio DIV3 visualizzati al microscopio ottico (a) ed analizzati mediante microscopia confocale (b-g). Le cellule sono state sottoposte ad immunofluorescenza con specifici marcatori strutturali quali (b) GAP43 specifico per l'assone e (e) MAP2 specifica per i dendriti, oltre alla β -tubulina (c, f). Sono inoltre mostrati i risultati del merge ottenuto mediante doppia immunofluorescenza ed in particolare GAP43 + β -tubulina (d) e MAP2 + β -tubulina (g). Il segnale blu è dato dal marcatore neuronale DAPI. Scale bar: 50 μ m (a); 20 μ m (b-g).

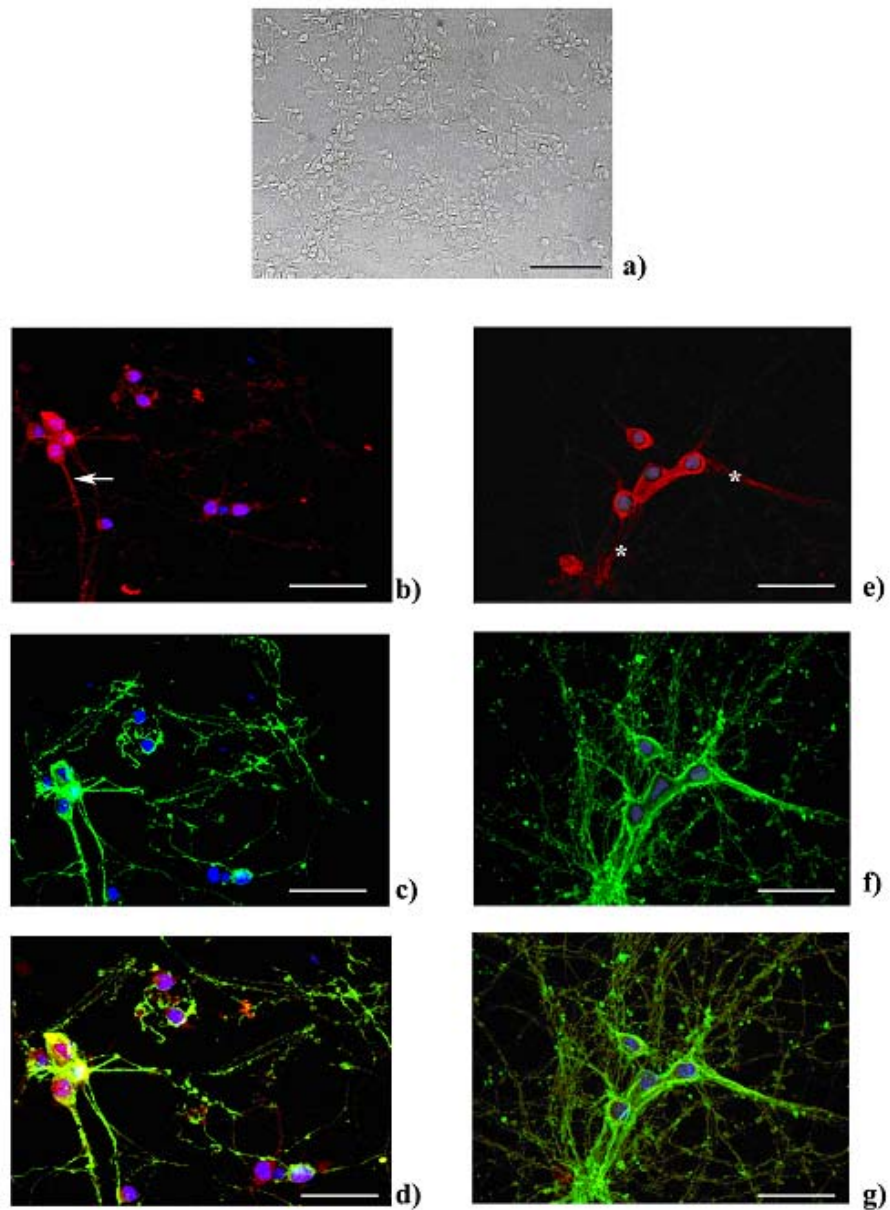


Fig. V.2. Neuroni ippocampali allo stadio DIV7 visualizzati al microscopio ottico (a) ed analizzati mediante microscopia confocale (b-g). Le cellule sono state sottoposte ad immunofluorescenza con specifici marcatori strutturali quali (b) GAP43 specifico per l'assone e (e) MAP2 specifica per i dendriti, oltre alla β -tubulina (c, f). Sono inoltre mostrati i risultati del merge ottenuto mediante doppia immunofluorescenza ed in particolare GAP43 + β -tubulina (d) e MAP2 + β -tubulina (g). Il segnale blu è dato dal marcatore neuronale DAPI. Scale bar: 50 μ m (a); 20 μ m (b-g).

V.2 Caratteristiche morfo-funzionali dei neuroni ippocampali su due sistemi di coltura

Al fine di verificare la potenziale applicabilità di specifiche membrane al fluorocarbonio per lo studio dei processi di differenziamento neuronale, uno studio simile a quello condotto su piastra Petri è stato ricondotto su membrane FC. Da un primo confronto si evince come i neuroni piastrati su membrane FC presentano un'attività metabolica intensa, ed in particolare il consumo di glucosio, la produzione di lattato e di BDNF riscontrati sono paragonabili a quelli dei neuroni su piastre Petri (fig. V.3 a-c). In aggiunta, un'elevata vitalità neuronale è stata riportata su entrambi i tipi di supporto (fig. V.3 d).

Sebbene l'analisi dei parametri metabolici non abbia messo in evidenza differenze significative nella maturazione dei neuroni sui due tipi di supporto, la successiva analisi morfologica ha consentito di riconoscere le membrane FC come vantaggiose per lo sviluppo dei neuroni ippocampali (fig. V.4 a-c). Tale risultato è in accordo con la lunghezza moderatamente maggiore dei processi dendritici (fig. V.4 b) ed assonici (fig. V.4 a) dei neuroni cresciuti su membrana FC rispetto ai neuroni cresciuti su piastra Petri a DIV7, mentre nessuna differenza è stata riscontrata nel diametro del soma per l'intero periodo di coltura (fig. V.4 c).

Tali dati morfologici sono stati ulteriormente confermati dall'analisi del pattern di espressione dei marcatori strutturali Syn e MAP2 condotta a DIV3 e DIV7 per i neuroni piastrati sui due tipi di supporto (fig. V.5 a,b). Un primo risultato interessante consiste nelle variazioni di espressione che caratterizzano sia la MAP2 che la Syn durante la prima settimana di sviluppo *in vitro*; in particolare, il forte incremento (+80%) dell'mRNA riscontrato a DIV7 rispetto a DIV0 per entrambi i marcatori (fig. V.5 a,b) sottolinea la loro applicabilità come markers di maturazione neuronale. Il successivo confronto dei livelli di trascritto tra i due supporti, ha dimostrato per i neuroni cresciuti su membrana FC un'espressione moderatamente maggiore ($p < 0.05$; +37%) di mRNA per MAP2 a DIV7 rispetto alla piastra Petri, mentre nessuna differenza significativa è stata riportata allo stadio precedente di maturazione (DIV3; fig. V.5 a). Al contrario, nessuna variazione è stata riportata nei livelli di mRNA di Syn per l'intero periodo di coltura (fig. V.5b).

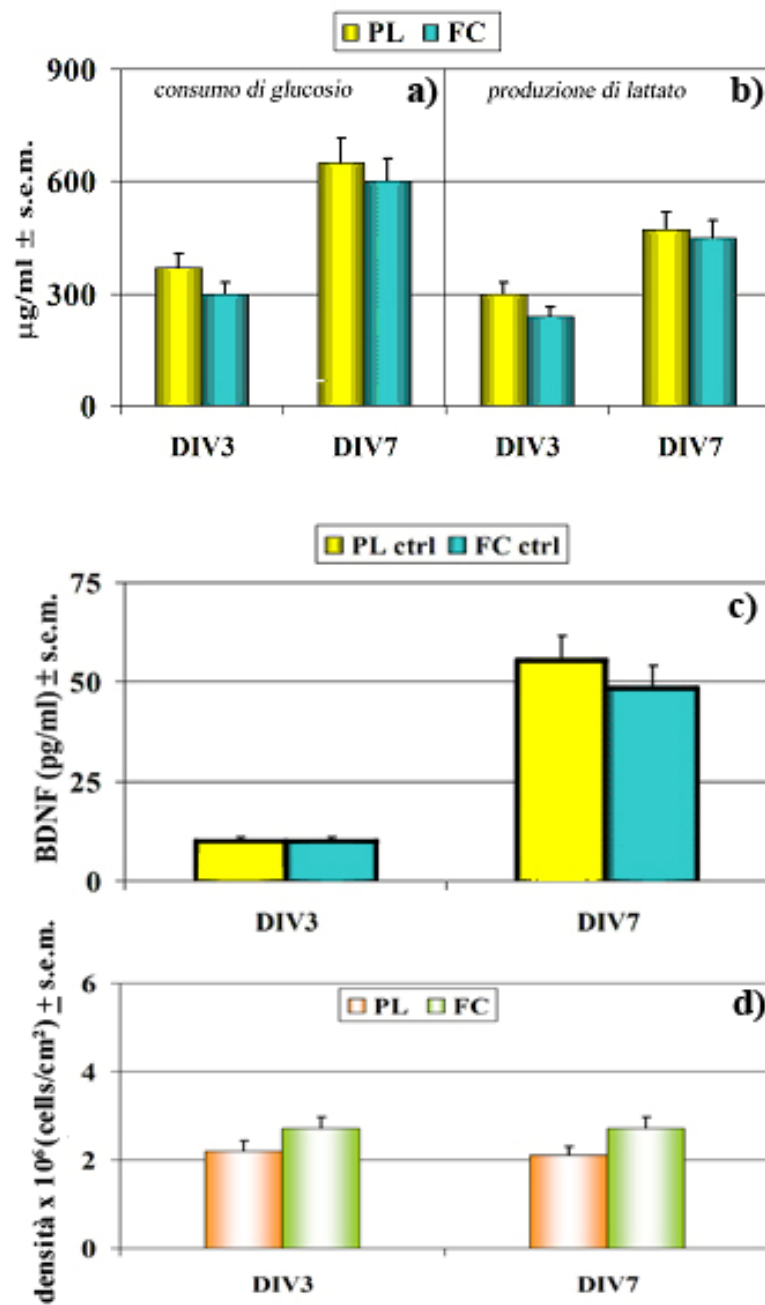


Fig. V3. Parametri metabolici dei neuroni ippocampali a DIV3 e DIV7. Il confronto del consumo di glucosio (a), produzione di lattato (b) e secrezione di BDNF (c) non mostra variazioni significative nella crescita tra le piastre Petri e le membrane FC. Entrambi i supporti conservano un'elevata vitalità cellulare (d). Il confronto tra i supporti è valutato mediante ANOVA seguito da Newman Keul's Multiple range test quando $p < 0.05$.

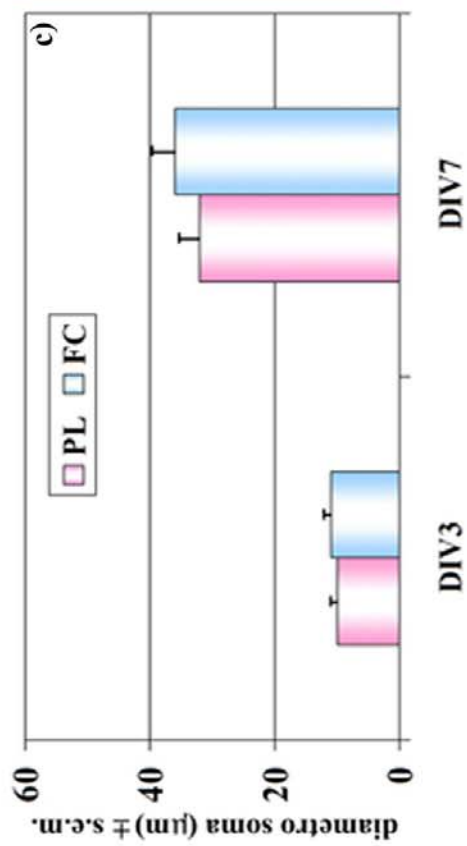
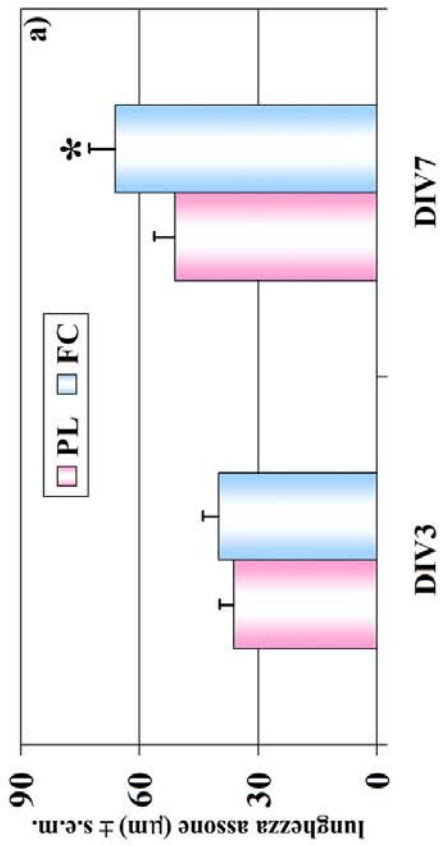
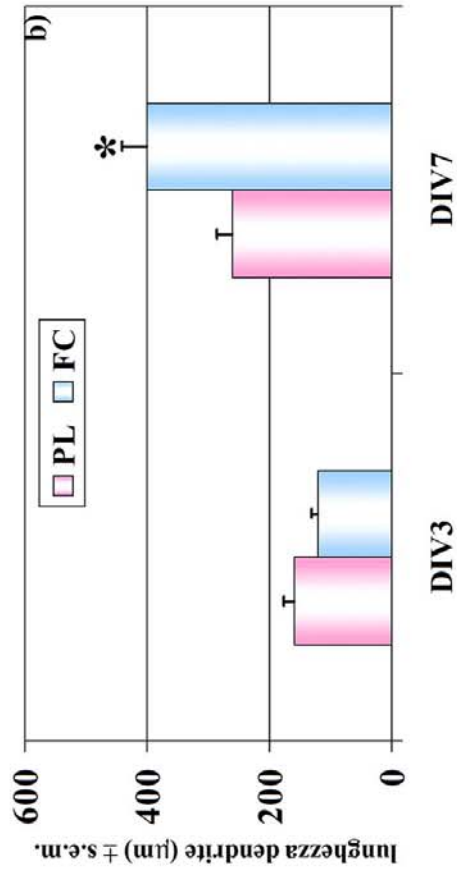


Fig. V.4. Analisi morfometrica quantitativa di alcuni parametri strutturali di neuroni ippocampali a diversi stadi di sviluppo (DIV3 e DIV7). La lunghezza dell'assone (a) e dei dendriti (b), così come il diametro del soma (c) sono stati determinati in neuroni cresciuti su membrane FC e confrontati con le piastre Petri. Analisi statistica: ANOVA seguita da Student t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

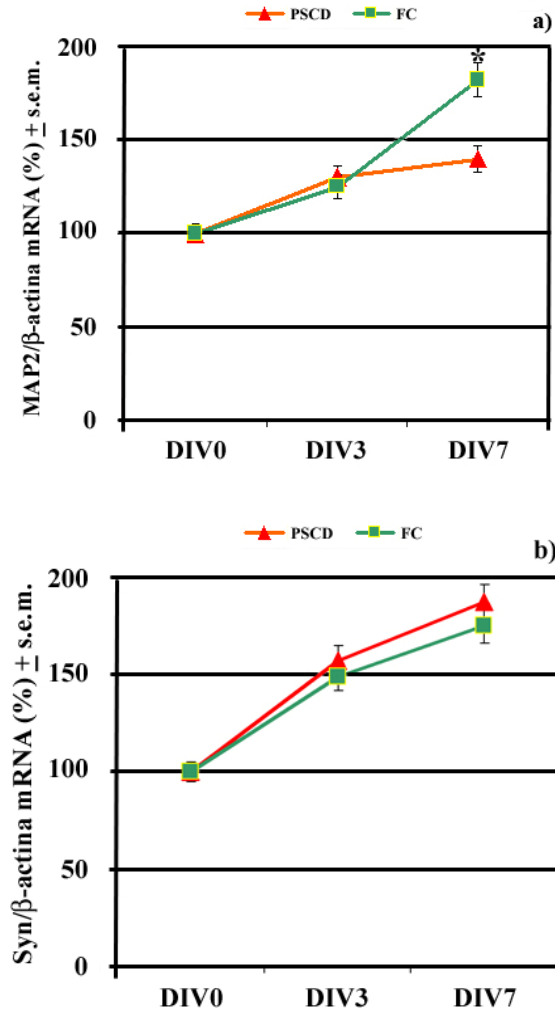


Fig. V.5. Analisi dell'espressione dell'mRNA per MAP2 (a) e Syn (b) mediante qPCR. Le barre rappresentano la quantità relativa degli mRNAs valutata come $Ct \pm s.e.m.$, dove Ct corrisponde al ciclo di amplificazione in cui si ha la rilevazione della fluorescenza. L'espressione dell'mRNA per entrambi i marcatori è pari al 100% al tempo DIV0, mentre si riporta la variazione percentuale rispetto a DIV0 negli stadi successivi. Tutti i valori sono stati normalizzati rispetto alla β -actina [AC: GU586151]. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$.

RISULTATI

Ruolo della trasmissione GABAergica sulla maturazione morfo-funzionale dei neuroni ippocampali nella prima settimana di sviluppo *in vitro*.

Nel trattamento farmacologico condotto su cellule ippocampali nella prima settimana di sviluppo mediante applicazione dell'agonista ed antagonista per GABA_AR, la determinazione delle concentrazioni di DZP e FLM è stata eseguita sulla base dell'elevata affinità del primo agonista verso i recettori contenenti le subunità $\alpha_{1/2/3/5}\beta_{2/3}\gamma_2$ (Ali e Thomson, 2007), mentre il FLM è stato usato insieme al DZP grazie alla sua capacità di bloccare in modo competitivo gli effetti delle benzodiazepine (Poleszak, 2008). Inoltre, le concentrazioni sono state scelte in base a studi condotti in precedenza su tessuto ippocampale di criceto presso il Laboratorio di Neuroanatomia Comparata (FLM; Canonaco et al., 2002) o su colture ippocampali presso altri Istituti (DZP; Tietz et al., 1999), e da me confermati mediante screening. In particolare sono stati applicati DZP 1 μ M e FLM 10 μ M.

V.3 Alterazione della morfologia neuronale

Le proprietà strutturali dei neuroni ippocampali di criceto trattati con DZP o con DZP+FLM sono state confrontate con quelle dei neuroni controllo, trattati con il solo mezzo in cui sono stati disciolti i farmaci (DMSO). Un primo risultato interessante riguarda l'incremento molto forte dei processi di sprouting (+118%) e branching (+98%) dendritici riscontrato a DIV3 quando le cellule sono state trattate con la benzodiazepina agonista DZP (fig. V.6 A,B); un effetto che tende a scomparire negli stadi successivi di maturazione. L'azione dell'agonista benzodiazepinico è risultata essere specifica anche per la componente assonica, come evidenziato dal moderato incremento sia della lunghezza dell'assone che del numero di assoni presenti in un determinato campo neuronale osservato per l'intero periodo di coltura rispetto alle cellule non trattate (fig. V.7 A,B). Gli effetti positivi sulla maturazione degli elementi neuronali sono stati invece annullati in seguito alla somministrazione dell'antagonista competitivo delle benzodiazepine FLM. In un primo caso, l'aggiunta di DZP+FLM ha determinato una forte e molto forte riduzione della lunghezza dendritica (-84%) e del processo di branching dendritico (-105%), rispettivamente, a DIV3 rispetto ai neuroni trattati con il solo DZP (fig. V.6 A,B). L'effetto bloccante del FLM è sembrato inoltre

intensificarsi negli stadi successivi di maturazione, come dimostrato dalla riduzione molto forte della lunghezza dendritica (-119% a -100%) rispetto ai neuroni trattati con DZP e, nello stesso periodo, dalla forte riduzione (-66%) di tale parametro anche rispetto alle cellule non trattate (fig. V.6 A). D'altra parte, l'azione del FLM nei confronti della componente assonica è sembrata diretta esclusivamente alla modulazione negativa dell'azione del DZP (fig. V.7 B).

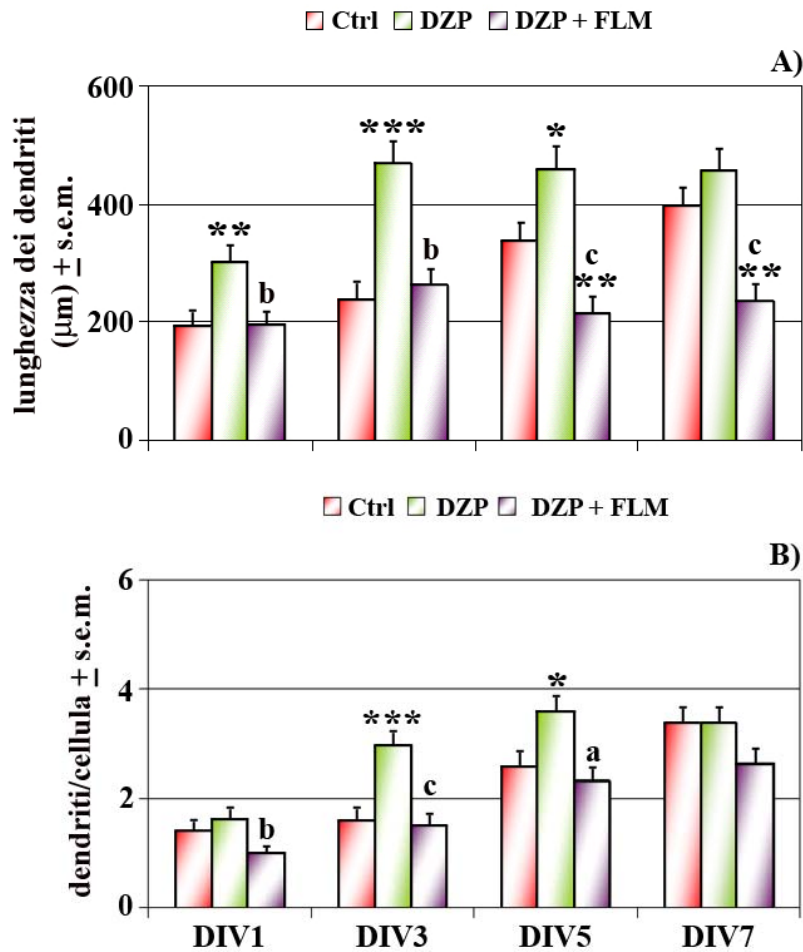


Fig. V.6. Effetti del DZP e del co-trattamento DZP+FLM sulla maturazione della componente dendritica dei neuroni ippocampali. Gli effetti sono stati determinati sulla lunghezza dendritica (A) e sul numero totale di dendriti che si dipartono dal soma (B) dei neuroni in 10 campi neuronali (100 μm x 100 μm) delle colture trattate e quindi confrontati con i controlli. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$. Gli asterischi indicano le differenze significative tra i neuroni trattati e quelli non trattati (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) mentre le lettere indicano le differenze significative tra neuroni trattati con solo DZP e neuroni co-trattati con DZP+FLM (a $p < 0.05$; b $p < 0.01$; c $p < 0.001$).

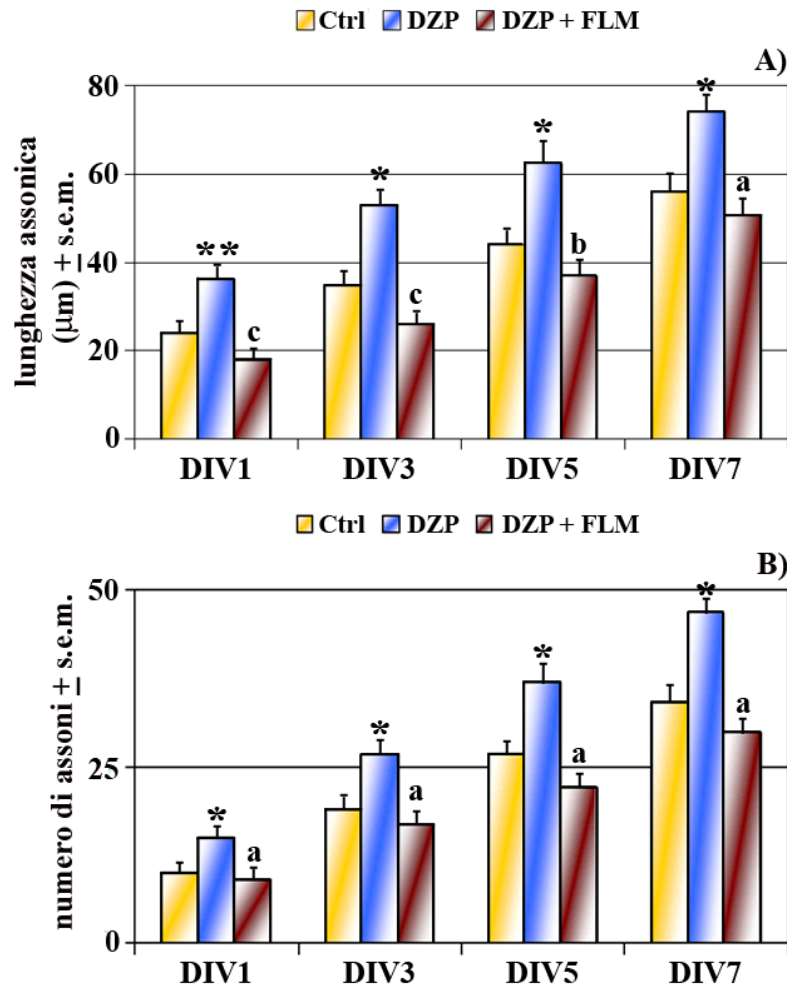


Fig. V.7. Effetti del DZP e del co-trattamento DZP+FLM sulla maturazione della componente assonica dei neuroni ippocampali. Gli effetti sono stati determinati sulla lunghezza dell'assone (A) e sul numero totale di assoni (B) presenti in 10 campi neuronali (100 μm x 100 μm) delle colture trattate e quindi confrontati con i controlli. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$. Gli asterischi indicano le differenze significative tra i neuroni trattati e quelli non trattati (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) mentre le lettere indicano le differenze significative tra neuroni trattati con solo DZP e neuroni co-trattati con DZP+FLM (^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$).

L'azione modulatrice dei farmaci per la trasmissione GABA_Aergica è stata ulteriormente confermata dalle evidenti variazioni dell'espressione del marker dendritico MAP2, e precisamente dall'up-regulation molto elevata (+120%) e moderata (+43%) del suo mRNA a DIV3 e DIV7, rispettivamente, nei neuroni trattati con DZP rispetto al controllo (fig. V.8 a). Anche in questo caso, l'azione positiva del DZP è stata invertita in seguito all'aggiunta del FLM ad entrambi gli stadi di sviluppo considerati (fig. V.8 a). Particolarmente interessanti sono risultati gli effetti indotti dal DZP sull'espressione del marcatore sinaptico Syn, e precisamente un'up-regulation elevata

(+81%) del suo mRNA solo a DIV7 rispetto ai neuroni non trattati (fig. V.8 b). Tale azione è stata ancora una volta confermata dagli effetti del co-trattamento DZP+FLM come si evince dalla moderata riduzione (-52%) dell'mRNA di Syn a DIV3 rispetto ai neuroni non trattati (fig. V.8 b); in aggiunta, sebbene non vi siano alterazioni significative a DIV7 rispetto ai controlli, una elevata riduzione (-64%) del trascritto è stata riscontrata rispetto alle cellule trattate con il solo DZP (fig. V.8 b).

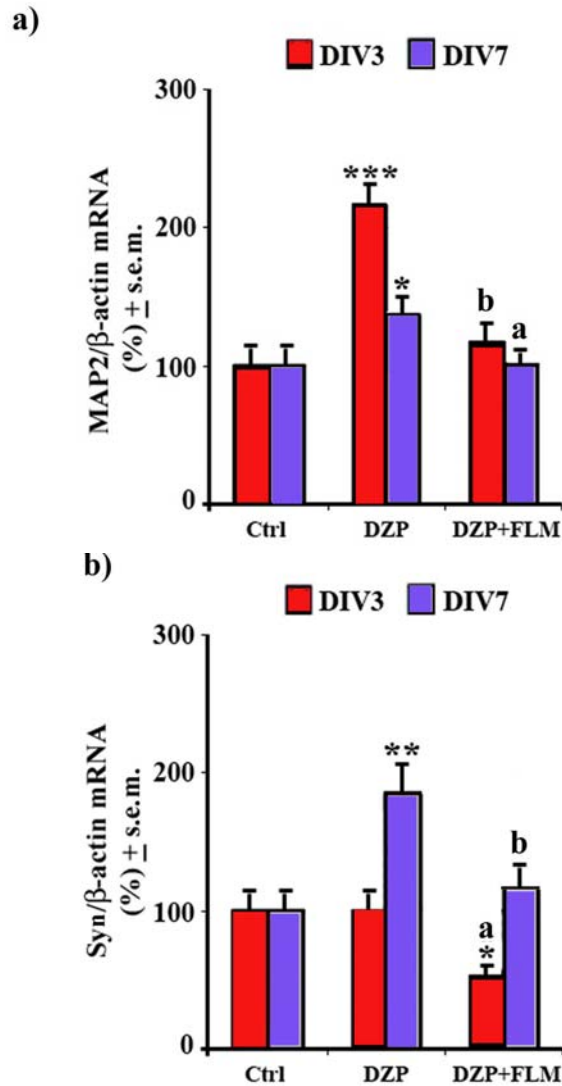


Fig. V.8. Analisi dell'espressione dell'mRNA per MAP2 (a) e Syn (b) mediante qPCR. Le barre rappresentano la quantità relativa degli mRNAs valutata come $Ct \pm s.e.m.$, dove Ct corrisponde al ciclo di amplificazione in cui si ha la rilevazione della fluorescenza. L'espressione dell'mRNA per entrambi i marcatori è posta al 100% nel Ctrl, mentre si riporta la variazione percentuale dei trattamenti rispetto al Ctrl. Tutti i valori sono stati normalizzati rispetto alla β -actina [AC: GU586151]. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$. Gli asterischi indicano le differenze significative tra i neuroni trattati e quelli non trattati (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$) mentre le lettere indicano le differenze significative tra neuroni trattati con solo DZP e neuroni co-trattati con DZP+FLM (^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$).

V.4 Ruolo della trasmissione GABA_Aergica sull'espressione dei recettori Gluergici

La successiva valutazione degli effetti di una trasmissione GABA_Aergica stimolata sulla maturazione del sistema Gluergico è stata condotta mediante ibridazione *in situ*. Un primo risultato importante che conferma la validità del sistema di coltura applicato in questo studio è l'assenza di segnale aspecifico esterno ai neuroni sulle membrane FC rispetto alla piastra Petri (dati non mostrati). Il segnale di ibridazione aspecifico, ottenuto dalle colture trattate con la sonda sense conferma inoltre la specificità delle sonde per le subunità GluR2 ed NR1. In primo luogo, sebbene la somministrazione dell'agonista GABA_Aergico DZP abbia determinato un'up-regulation molto forte (+118%) dell'mRNA di GluR2 solo nel soma dei neuroni a DIV3 (fig. V.9 A), un'azione a più ampio spettro ha caratterizzato lo stadio successivo, in accordo con l'up-regulation molto forte e moderata dell'mRNA di GluR2 nell'assone (+90%) e nei dendriti (+40%) rispetto alle cellule non trattate (fig. V.9 B,E,F). Un andamento completamente opposto dei livelli di trascritto riscontrati nei diversi compartimenti cellulari è parso essere tipico dei neuroni trattati con DZP+FLM. L'aggiunta dell'antagonista ha determinato infatti un'up-regulation molto forte di GluR2 sia nell'assone (+142%) che nei dendriti (+100%), oltre che in maniera moderata nel soma (+64%) a DIV3 rispetto ai neuroni non trattati (fig. V.9 A,C,D) e a quelli trattati con solo DZP (fig. V.9 A). Al contrario, l'azione dell'imidabenzodiazepina combinata con il DZP a DIV7 ha contribuito principalmente ad annullare gli effetti dell'agonista, come confermato dalla riduzione elevata e molto elevata di GluR2 nell'assone (-67%) e nel soma (-100%) rispettivamente, se paragonati ai neuroni trattati con il solo DZP (fig. V.9 B). Gli effetti contrastanti dei trattamenti sulla maturazione della componente AMPAergica dei neuroni sembrano caratterizzare anche lo sviluppo della componente NMDAR. In primo luogo, il DZP ha determinato una forte down-regulation di NR1 nell'assone (-65%) e nei dendriti (-64%) a DIV3 rispetto alle cellule non trattate (fig. V.10 A), mentre nessuna variazione è stata riscontrata a livello somatico. Particolarmente interessante è apparsa la forte (+83% e +68%) e moderata (+45%) up-regulation dell'mRNA di NR1 nei neuriti e nel soma (fig. V.10 B,E,F), rispettivamente, al più tardivo stadio di maturazione DIV7. Ancora una volta si è avuta la conferma della specificità di tali effetti in presenza di FLM, come dimostrato dall'up-regulation molto forte (+280%) e moderata (+44%) della medesima subunità dell'NMDAR nei neuriti e nel soma, rispettivamente, a DIV3 (fig. V.10 A,C,D), mentre tutti gli effetti sono stati aboliti a DIV7 (fig. V.10 B).

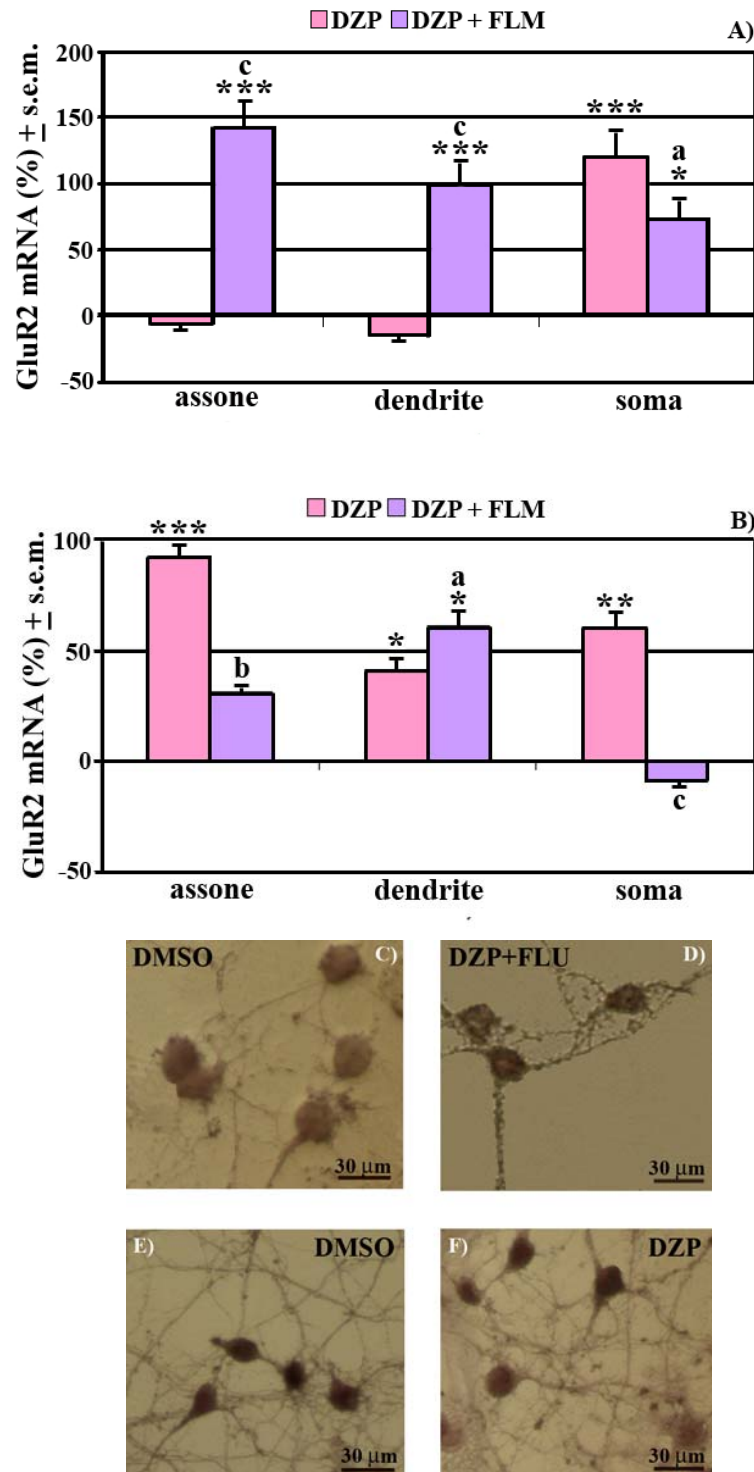


Fig. V.9. Effetti della trasmissione GABAergica sul pattern di espressione dell'mRNA per GluR2 dei neuroni ippocampali. Gli effetti di DZP e di DZP+FLM sono stati valutati sull'espressione dell'mRNA per GluR2 a DIV3 (A) e a DIV7 (B). Foto rappresentative di neuroni sottoposti ad ISH per GluR2 sia a DIV3 (C,D) che a DIV7 (E,F), con evidente incremento dell'espressione dell'mRNA di GluR2 nei neuroni trattati con DZP+FLM (D) rispetto al controllo (C) a DIV3, e dei neuroni trattati con DZP (F) rispetto al controllo (E) a DIV7. I dati, espressi come O.D. \pm s.e.m. sono espressi come percentuale dei gruppi trattati rispetto al controllo. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$; *^a $p < 0.05$; **^b $p < 0.01$; ***^c $p < 0.001$.

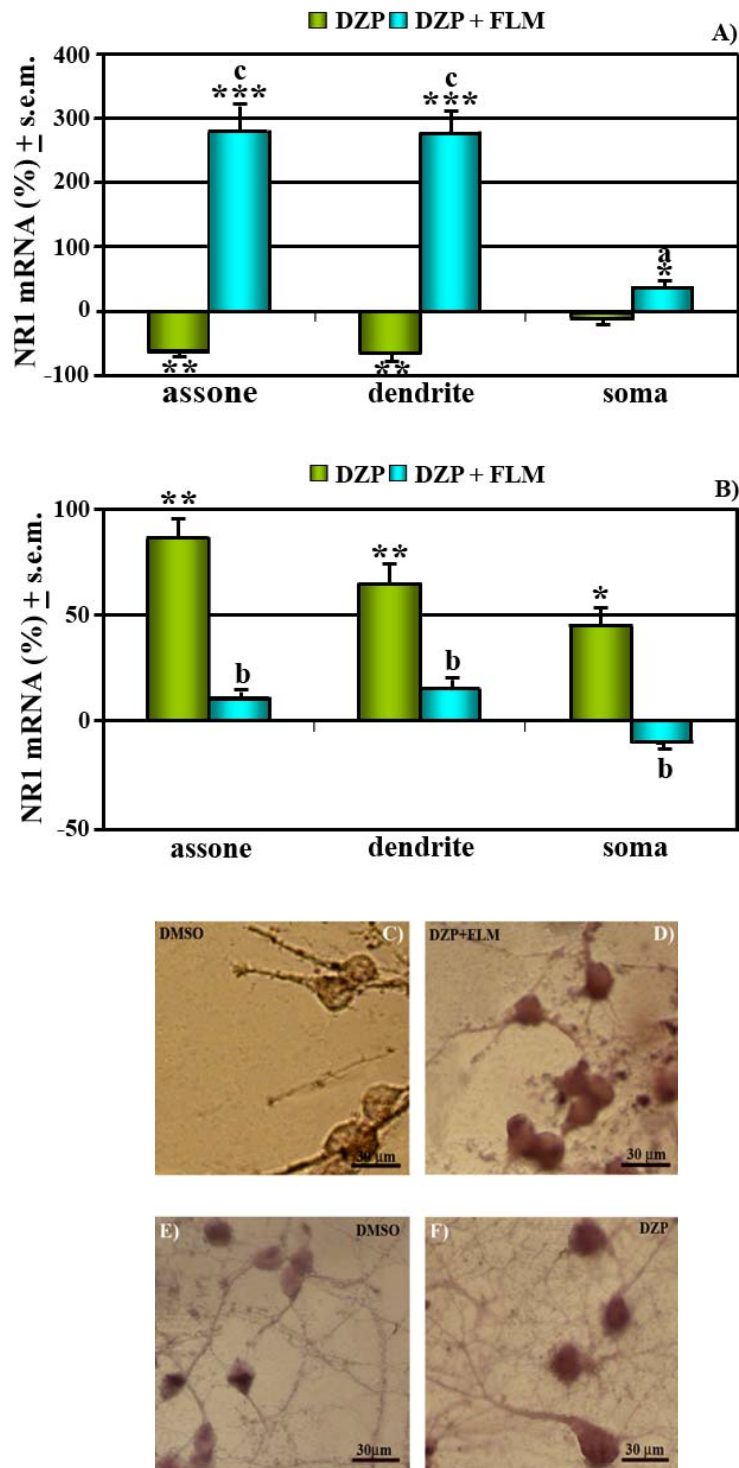


Fig. V.10. Effetti della trasmissione GABAergica sul pattern di espressione dell'mRNA per NR1 dei neuroni ippocampali. Gli effetti di DZP e di DZP+FLM sono stati valutati sull'espressione dell'mRNA per NR1 a DIV3 (A) e a DIV7 (B). Foto rappresentative di neuroni sottoposti ad ISH per NR1 sia a DIV3 (C,D) che a DIV7 (E,F), con evidente incremento dell'espressione dell'mRNA di NR1 nei neuroni trattati con DZP+FLM (D) rispetto al controllo (C) a DIV3, e dei neuroni trattati con DZP (F) rispetto al controllo (E) a DIV7. I dati, espressi come O.D. ± s.e.m. sono espressi come percentuale dei gruppi trattati rispetto al controllo. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$; *^a $p < 0.05$; **^b $p < 0.01$; ***^c $p < 0.001$.

RISULTATI

Ruolo delle subunità GABAergiche $\alpha_{2,5}$ sulla maturazione morfo-funzionale dei neuroni ippocampali nella prima settimana di sviluppo *in vitro*.

V.5 Variazioni dell'attività metabolica neuronale

Dopo aver stabilito un ruolo importante per la trasmissione GABA_Aergica nel differenziamento neuronale mi sono chiesta quale tra le combinazioni recettoriali del GABA_AR fosse responsabile degli effetti sia morfologici che trascrizionali osservati nella prima settimana di sviluppo *in vitro*. Al fine di determinare la specificità di azione delle subunità α la cui espressione è stata identificata nel sistema ippocampale a tale stadio precoce, si è proceduto con l'applicazione degli agonisti per GABA, Flu ed RY-080, le cui concentrazioni utilizzate sono state determinate mediante studi di affinità di legame condotti preliminarmente nel Laboratorio di Neuroanatomia Comparata ed ottenute in tessuto ippocampale di criceto. In tali analisi è stato utilizzato il radiolegante [³H]-Flu in presenza degli agonisti Flu per α_2 e RY080 per α_5 . La concentrazione ottimale di affinità recettoriale dei due agonisti è stata determinata mediante analisi di Scatchard ed è risultata di 50 nM per RY080 e 100 nM per Flu (Canonaco et al., 2002).

La somministrazione dei due farmaci specifici per i diversi complessi recettoriali GABA_AR nelle colture ippocampali su membrana FC ha determinato alterazioni sia metaboliche che morfologiche durante differenti stadi di sviluppo. In un primo caso, la somministrazione di RY-080 ha indotto le maggiori variazioni metaboliche, come dimostrato dalla forte ($p < 0.01$) riduzione (-83%) dei livelli di BDNF (fig. V.11 c) oltre che dal moderato incremento del consumo di glucosio (+43%; fig. V.11 a) a DIV7. Al contrario, un moderato incremento del consumo di glucosio è stato osservato quando le cellule sono state trattate con l'agonista preferenziale della subunità α_2 (Flu) a DIV3 (+32%) e DIV7 (+40%; fig. V.11 a), mentre nessuna variazione è stata riportata per la produzione di lattato (fig. V.11 b).

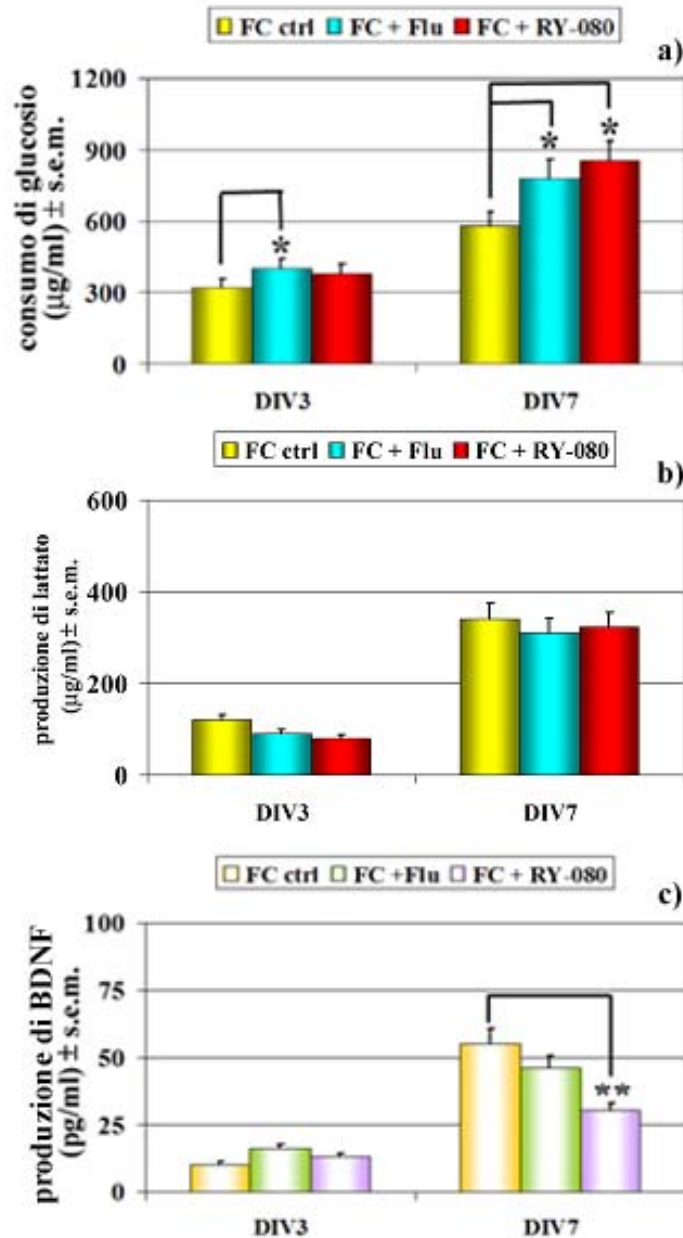


Fig. V.11. Effetti degli agonisti per le subunità GABA_Aergiche $\alpha_{2,5}$ sui principali parametri metabolici dei neuroni ippocampali. Il consumo di glucosio (a), la produzione di lattato (b) e di BDNF (c) dei neuroni cresciuti su membrane FC in assenza di farmaci sono confrontati con quelli dei neuroni trattati con Flu o con RY-080 a DIV3 e DIV7. Tutte le variazioni metaboliche sono state analizzate mediante ANOVA two-way seguita da test di Student quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

V.6 Alterazione della morfologia neuronale

La valutazione degli effetti di tali agonisti sulle diverse formazioni neuronali ha messo in evidenza come entrambi i farmaci si comportino in modo particolare nei confronti del differenziamento degli elementi neuronali, in accordo con gli alterati livelli dei marcatori strutturali considerati in questo studio durante i diversi stadi di

sviluppo. In un primo caso, l'agonista inverso specifico per α_5 ha determinato un'azione bloccante, come dimostrato dalla ridotta arborizzazione dendritica (fig. V.12 a,b) rispetto alle cellule non trattate. La riduzione della lunghezza dei dendriti determinata da RY-080 permane per l'intero periodo di coltura, come evidenziato dalla moderata riduzione di tale parametro a DIV3 (-42%) e DIV5 (-56%) che diviene elevata (-85%) allo stadio di sviluppo più tardivo (DIV7) rispetto al controllo (fig. V.12 a). In aggiunta, l'agonista inverso per la subunità α_5 è stato anche responsabile di una riduzione elevata e molto elevata ($p < 0.001$) del numero totale di dendriti che si dipartono dal corpo cellulare a DIV5 (-78%) e DIV7 (-115%), rispettivamente (fig. V.12 b), mentre l'azione del Flu è parsa interferire con tale processo solo a DIV1, in accordo con la moderata riduzione (-52%) della lunghezza dendritica (fig. V.12 a) riportata a tale stadio.

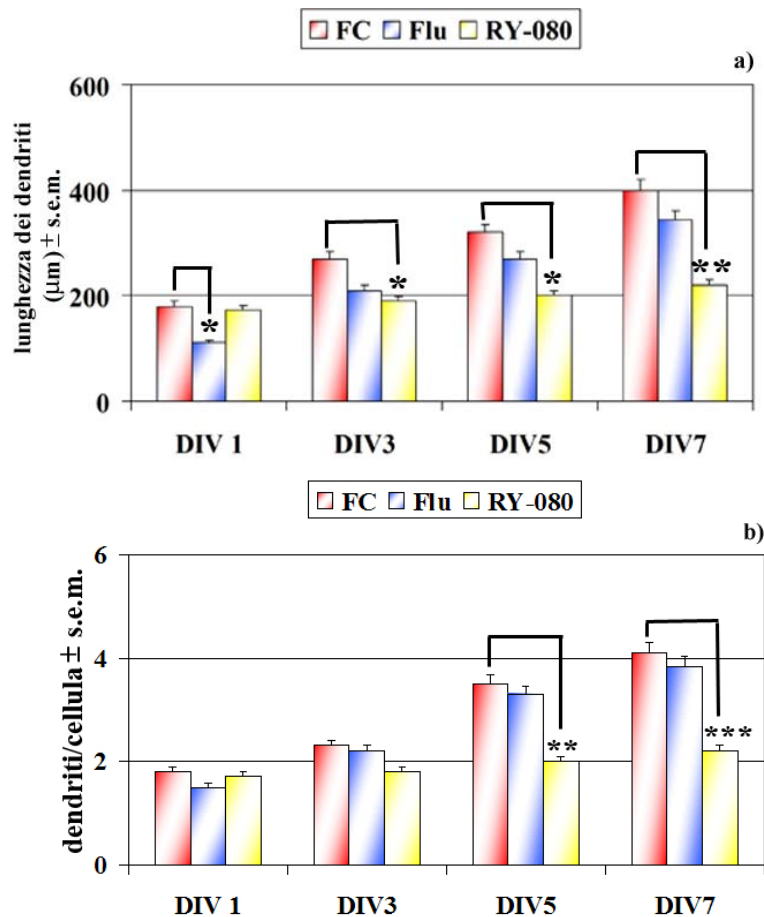


Fig. V.12. Effetti degli agonisti per le subunità GABA_Aergiche $\alpha_{2,5}$ sulla maturazione della componente dendritica dei neuroni ippocampali. Gli effetti sono stati determinati sulla lunghezza dendritica (a) e sul numero totale di dendriti che si dipartono dal soma (b) dei neuroni in 10 campi neuronali (100 μm x 100 μm) delle colture trattate con entrambi i farmaci e confrontati con i controlli. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

D'altra parte, gli effetti del Flu rispetto alle cellule non trattate sono sembrate essere diretti in modo predominante verso la componente assonica, come dimostrato dall'elevata riduzione della lunghezza assonica (da -65% a -70%) rispetto alle cellule non trattate a DIV1 e DIV3, rispettivamente (fig. V.13 a). Durante gli stessi stadi di sviluppo, il Flu è stato anche responsabile di un'elevata e moderata riduzione della quantità di assoni (-85% e -62%; fig. V.13 b). Tali effetti tendono a ridursi negli stadi successivi (fig. V.13 a), come si evince dalla solo moderata riduzione della lunghezza assonica a DIV5 (-45%) e DIV7 (-40%).

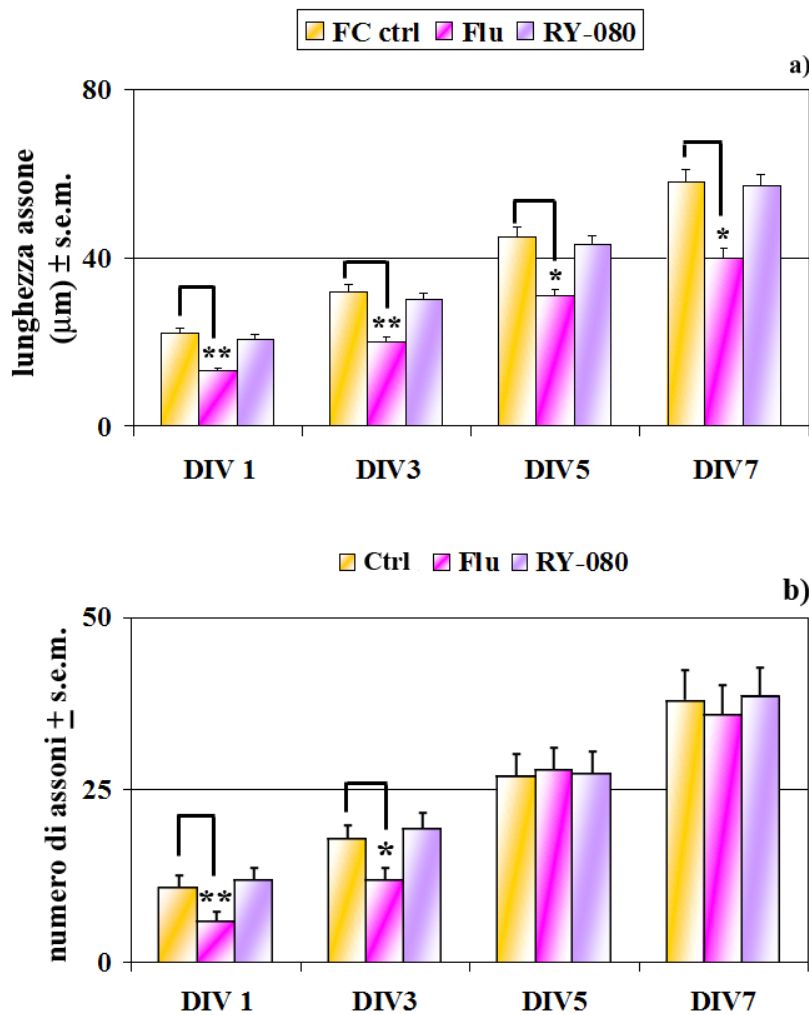


Fig. V.13. Effetti degli agonisti per le subunità GABA_Aergiche $\alpha_{2,5}$ sulla maturazione della componente assonica dei neuroni ippocampali. Gli effetti sono stati determinati sulla lunghezza assonica (a) e sul numero totale di assoni (b) presenti in 10 campi neuronali (100 μm x 100 μm) delle colture trattate con entrambi i farmaci e confrontati con i controlli. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Anche in questo caso, la valutazione del pattern di espressione dei marcatori strutturali dendritico (MAP2) e sinaptico (Syn) ha confermato quanto riscontrato dall'analisi morfometrica condotta mediante microscopia confocale e analisi di immagine. Un incremento molto forte (+150%) dei livelli di mRNA per la Syn ha caratterizzato infatti i neuroni trattati con il Flu rispetto alle cellule non trattate a DIV7 (fig. V.14), mentre nessuna variazione significativa è stata riportata nei livelli di mRNA per la MAP2 in seguito ai trattamenti farmacologici.

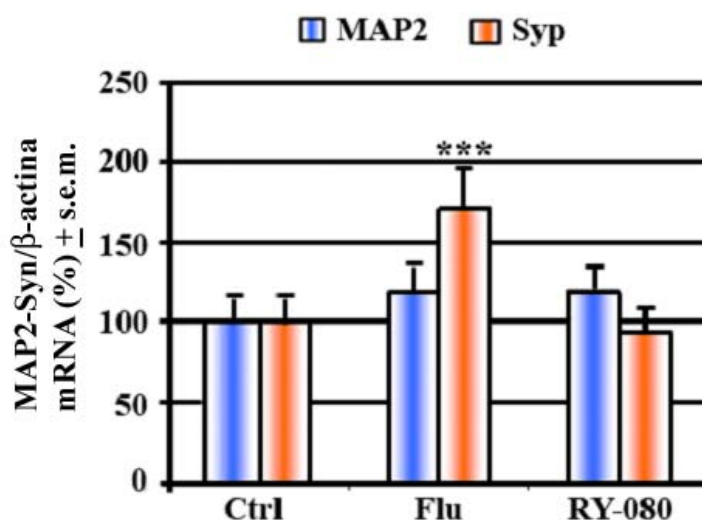


Fig. V.14. Analisi dell'espressione dell'mRNA per MAP2 e Syn mediante qPCR a DIV7. Effetti degli agonisti per le subunità GABA_Aergiche $\alpha_{2,5}$ sul pattern di espressione dei geni codificanti per i marcatori dendritico e sinaptico. L'espressione relativa è riportata come cambiamento percentuale nel rapporto marker/gene housekeeping. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

V.7 Effetti delle subunità GABA_Aergiche $\alpha_{2,5}$ sull'espressione dei recettori Gluergici

Anche in questo caso, gli effetti dei due farmaci sono stati testati sull'espressione neuronale dei sistemi recettoriali Gluergici a DIV3 e DIV7. Particolarmente interessante risulta il fatto che anche nel caso dell'attività trascrizionale, è stato il trattamento con RY-080 ad indurre le maggiori variazioni (fig. V.15 C), come confermato dalla forte e molto forte down-regulation dell'mRNA per GluR2 negli assoni (-80%) e nei dendriti (-158%), rispettivamente a DIV7 (fig. V.15 B), mentre nessuna variazione è stata riportata per il corpo cellulare o i neuriti a DIV3 (fig. V.15 A).

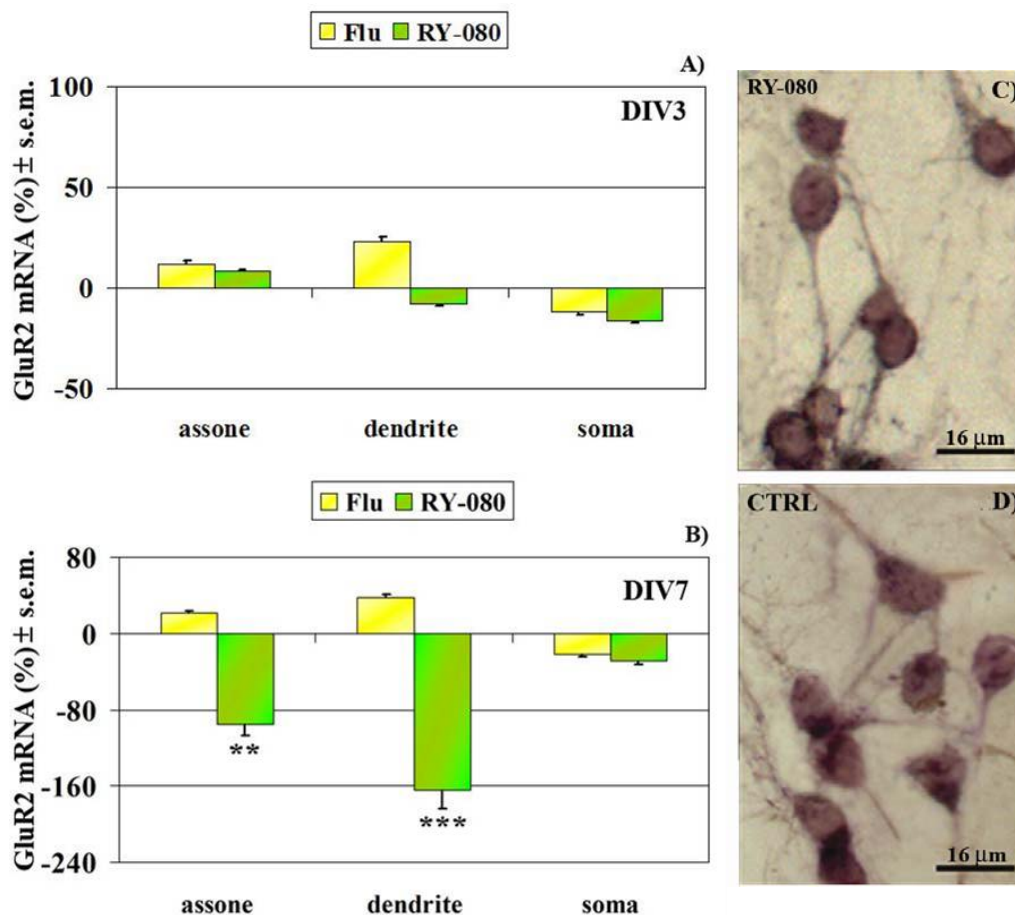


Fig. V.15. Effetti degli agonisti per le subunità GABA_Aergiche $\alpha_{2,5}$ sul pattern di espressione dell'mRNA per GluR2 dei neuroni ippocampali. Gli effetti del Flu e di RY-080 sono stati valutati sull'espressione dell'mRNA per GluR2 a DIV3 (A) e a DIV7 (B). Foto rappresentative di neuroni sottoposti ad ISH per GluR2 con evidente riduzione dell'espressione dell'mRNA di GluR2 nei neuroni trattati con RY-080 (C) rispetto ai neuroni non trattati (D). I dati, espressi come O.D. \pm s.e.m. sono espressi come percentuale dei gruppi trattati rispetto al controllo. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Al contrario, l'azione del Flu è parsa essere diretta alla modulazione dell'espressione di NR1 soprattutto a DIV3. L'attivazione dei GABA_ARs contenenti α_2 ha determinato infatti una forte up-regulation dell'mRNA per NR1 a livello assonico (+78%) a DIV3, mentre una moderata up-regulation è risultata essere tipica del corpo cellulare (+48%; fig. V.16 A,C). Inoltre, sebbene l'assone abbia continuato a rappresentare il principale target dell'azione del Flu, come indicato dall'up-regulation molto forte dell'mRNA di NR1 a DIV7 (+152%), esso non è stato l'unico in quanto anche i dendriti hanno mostrato un moderato incremento dell'espressione di NR1 durante lo stesso stadio di sviluppo (fig. V.16 B).

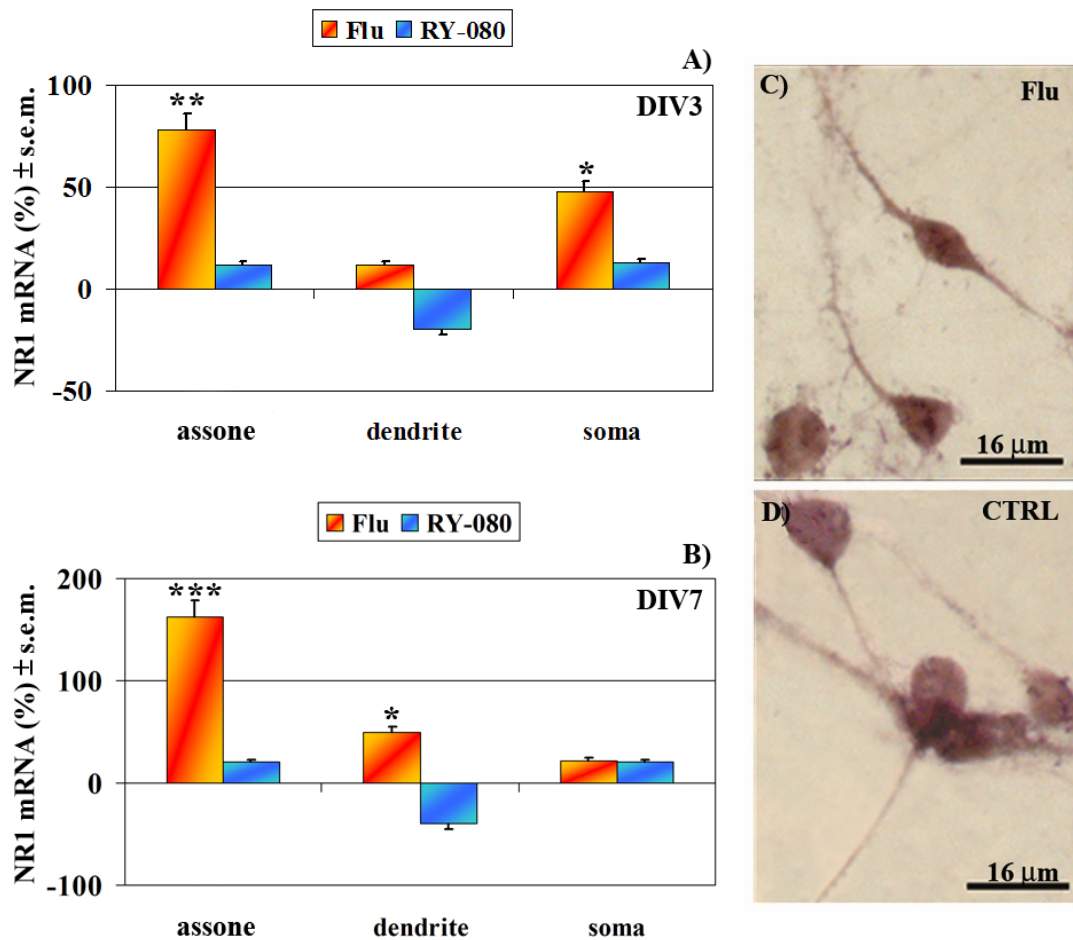


Fig. V.16. Effetti degli agonisti per le subunità GABA_Aergiche $\alpha_{2,5}$ sul pattern di espressione dell'mRNA per NR1 dei neuroni ippocampali. Gli effetti del Flu e di RY-080 sono stati valutati sull'espressione dell'mRNA per NR1 a DIV3 (A) e a DIV7 (B). Foto rappresentative di neuroni sottoposti ad ISH per NR1, con evidente riduzione dell'espressione dell'mRNA di NR1 nei neuroni trattati con Flu (C) rispetto ai non trattati. I dati, espressi come O.D. \pm s.e.m. sono espressi come percentuale dei gruppi trattati rispetto al controllo. ANOVA two-way seguita da Newman Keul's Multiple Range Test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

I risultati del presente lavoro di dottorato evidenziano il ruolo centrale della neurotrasmissione GABAergica nel controllo del differenziamento morfo-funzionale dei neuroni Gluergici ippocampali nel criceto dorato, utilizzando per la prima volta un supporto per la crescita *in vitro* altamente innovativo, quale il sistema a membrane di fluorocarbonio (FC). Nella prima fase, la determinazione dei principali parametri strutturali e delle proprietà farmacologiche in neuroni cresciuti su tali membrane hanno confermato il vantaggio di tale sistema bioibrido per lo studio dei circuiti neuronali *in vitro* (Dowell-Mesfin et al., 2004; De Bartolo et al., 2007; Morelli et al., 2010). La possibilità di identificare in modo dettagliato la morfologia dei neuroni dell'HIP, ed in maniera specifica il raffinato processo di branching dendritico, rappresenta un aspetto importante per la definizione *in vivo* delle proprietà plastiche coinvolte nei processi mnemonici e di apprendimento di diverse regioni ippocampali (Benfenati et al., 2007).

Il coinvolgimento delle subunità recettoriali α del sistema GABA_Aergico nei meccanismi di cross-talking con altri sistemi di neurotrasmissione è stato analizzato in questo studio sulla base della loro specificità farmacologica associata alla prima settimana di sviluppo ippocampale del criceto. In tale periodo critico, il GABA regola i meccanismi di switch on/off preposti al controllo della morfogenesi e delle attività di plasticità sinaptica (Möhler, 2007). L'analisi del ruolo svolto da distinti complessi recettoriali GABAergici che per primi fanno la propria comparsa nel periodo perinatale ($\alpha_{2,5}$) è stata inizialmente affrontata mediante utilizzo dell'agonista selettivo per ambedue le subunità in esame (DZP). La stimolazione della trasmissione GABAergica derivante da tale trattamento produce un effetto di potenziamento dei processi di allungamento e branching dendritico a DIV3, mentre interferisce con l'allungamento ed il numero di assoni per l'intero periodo di coltura. Tale pattern temporale suggerisce che i cambiamenti nella composizione dei complessi recettoriali GABAergici avvengono con una specificità di azione verso i differenti elementi neuronali, esercitando un ruolo predominante sulla determinazione dello sprouting e della protrusione dendritica nell'HIP di criceto (Di Vito et al., 2010) in maniera paragonabile a quanto osservato nel giro dentato del topo (Medvedev et al., 2008). L'azione del DZP nei primissimi stadi di sviluppo è ulteriormente rafforzata dagli elevati livelli dell'mRNA della proteina MAP2 a livello dendritico, mentre a DIV7 tale effetto si estende a livello sinaptico, promuovendo un incremento nei livelli di espressione del marcatore sinaptofisina. Sulla base di tali evidenze la MAP2, presente sia nelle fasi precoci che tardive della maturazione neuronale (Sanchez et al., 2000), contribuisce in

maniera determinante alla stimolazione DZP-mediata della crescita dendritica, favorendo in particolare la stabilizzazione e l'assemblaggio dei microtubuli (Ten et al., 2001). Accanto a tale effetto, l'incremento dell'espressione del marcatore presinaptico sinaptofisina, una glicoproteina associata alle vescicole sinaptiche ed indicatore di proliferazione sinaptica (Hescham et al, 2009), si traduce in un preciso ruolo nella sinaptogenesi (Neal et al., 2010) e nell'allungamento assonico.

L'azione distinta di α_2 e α_5 sulle proprietà morfo-funzionali dei neuroni ippocampali del criceto è stata determinata mediante trattamento farmacologico condotto con agonisti selettivi per ciascuna subunità. In tale contesto, l'azione dell'agonista preferenziale per i complessi recettoriali formati dalla combinazione $\alpha_2\beta_{2,3}\gamma_2$ (flunitrazepam) si è tradotta in una riduzione del numero totale di assoni e soprattutto della lunghezza di tale prolungamento durante le fasi iniziali di maturazione (DIV3), in accordo con una ridotta intensità del marcatore GAP-43 riscontrata a livello del cono di crescita (Giusi et al., 2009). La massima espressione di questo marker assonico durante lo sviluppo neuronale e nei processi di rigenerazione suggerisce il suo ruolo cruciale nelle interazioni con altre proteine citoscheletriche e di segnale, quali l'actina e le proteine G, non solo per la maturazione neuritica ma anche per la corretta organizzazione delle membrane sinaptiche (Benowitz e Routtenberg, 1997). In aggiunta, la riduzione flunitrazepam-dipendente della GAP-43 tende ad annullare l'azione neuroprotettiva dell'agonista per α_2 in alcune patologie neuronali comuni quali la sindrome di Alzheimer, in cui un'alterata espressione e funzionalità della GAP-43 è stata riportata non solo nell'HIP ma anche nella corteccia (Bogdanovic et al., 2000). Un simile risultato ben si correla con la stretta associazione riscontrata tra i processi di formazione del segmento iniziale assonico e di sinaptogenesi dei neuroni piramidali di ratto e la comparsa di clusters recettoriali contenenti la subunità α_2 in corrispondenza di sinapsi ancora in maturazione (Lüscher e Keller, 2004), modulando un'attività GABAergica interneuronale di tipo eccitatorio in cui è coinvolta la proteina scaffold geferina (Tretter et al., 2008). Queste precoci variazioni sembrano preparare le condizioni per il turnover da α_2 ad α_1 allo stadio adulto, come suggerito dal ridotto numero di complessi GABA_AR contenenti α_2 e dalla maggiore quantità di α_1 nell'HIP dorsale adulto (Yu et al., 2006). D'altra parte, gli elevati livelli di α_2 riscontrati nell'HIP ventrale sembrano partecipare, insieme alla stessa subunità amigdalare (Heldt and Ressler, 2007), alla regolazione dei processi mnemonici e d'apprendimento spaziale GABA-dipendenti (Sotiriou et al., 2005).

L'effetto modulatore della subunità GABAergica α_5 è stato analizzato in seguito all'aggiunta nel mezzo di coltura dell'agonista inverso selettivo, RY-080, durante la prima settimana di sviluppo ippocampale. Attualmente è ampiamente noto il coinvolgimento di tale subunità nelle diverse fasi dello sviluppo neuronale e soprattutto la sua clusterizzazione in siti extrasinaptici (Olsen e Sieghart, 2009). Il trattamento con RY-080 ha promosso alterazioni morfologiche a carico principalmente di una riduzione sia del processo di branching che della lunghezza dendritica a partire da DIV7. Tali risultati sono in pieno accordo con la precoce attivazione del processo di arborizzazione dendritica e di formazione delle spine dendritiche, totalmente indipendente dall'attività di complessi recettoriali GABA_Aergici sinaptici (Cancedda et al., 2007). Il fatto che le proprietà di rimodellamento strutturale qui osservate seguano la stessa direzione di un'altra proteina scaffold, e precisamente Shank-1 nella regolazione delle formazioni neuronali (Hung et al., 2008), suggerisce la possibile interazione tra la subunità GABAergica extra-sinaptica e la proteina Shank-1 come principale fattore responsabile dell'assemblamento finale delle sinapsi GABAergiche (Arancibia-Carcamo e Moss, 2006). Quando gli effetti dell'agonista inverso per α_5 sono stati valutati sui parametri metabolici, è emersa un'elevata riduzione dell'espressione del BDNF in concomitanza con la ridotta arborizzazione dendritica a DIV7. Le note funzioni citoscheletriche del fattore neurotrofico potrebbero anche essere responsabili dell'arborizzazione dendritica presinaptica oltre che dell'attività peculiare degli interneuroni GABAergici fast-spiking (Rex et al., 2007), il cui meccanismo di attivazione è stato finora investigato solo tra gli interneuroni corticali (Kohara et al., 2003). A questo punto, il ruolo predominante del BDNF sui processi neuronali dipendenti da α_5 potrebbe coincidere con lo switch neuronale GABAergico per la determinazione delle proprietà morfologiche e funzionali dei neuroni (Dawson et al., 2006). E' possibile dunque proporre che, mentre i primi stadi di sviluppo ippocampale appaiono essere direttamente correlati ad un'attivazione di clusters $\alpha_2, \beta_{2/3} \gamma_2$ a livello assonico, l'attivazione dell'attività tonica GABAergica al più tardivo stadio di sviluppo (DIV7) sembra dipendere da una clusterizzazione dendritica di α_5 (Hornung and Fritschy, 1996). Tale meccanismo persiste anche nelle fasi più avanzate di sviluppo, quando funzioni complesse quali la memoria associativa (Fukata et al., 2002) e l'attività locomotoria di tipo esplorativo (Collinson et al., 2002) sono regolate da un'attività GABAergica che coinvolge tale subunità (α_5).

I processi di maturazione neuronale, la cui attivazione o spegnimento sono ampiamente regolati da meccanismi di cross-talking tra un'attività GABAergica inibitoria e un'attività Gluergica eccitatoria, sottolineano il ruolo cruciale di tali sistemi di trasmissione sia nel differenziamento neuronale che nel consolidamento dei network sinaptici (Hur and Kim, 2007; Glykys et al., 2008). In tale contesto, nella seconda parte del presente lavoro di dottorato l'obiettivo principale è stato quello di dimostrare come l'azione GABAergica eccitatoria, associata ad elevati livelli intracellulari di ioni Cl^- nei neuroni immaturi, possa determinare il reclutamento di complessi NMDARs e AMPARs attraverso la rimozione del blocco operato dal Mg^{2+} dall'NMDAR (Rivera et al., 2005; Ben-Ari, 2006). I primi risultati derivanti dall'azione dell'agonista DZP sull'espressione della subunità NR1 del complesso NMDAR, dimostrano una forte riduzione della componente eccitatoria Gluergica a DIV3 che sembrerebbe rimandare ad un'azione GABAergica di "shunting" durante gli stadi precoci di maturazione ippocampale (BenAry, 2001). Contemporaneamente, il trattamento con Flu nei neuroni ippocampali promuove un precoce reclutamento del trascritto di NR1 a livello assonico a partire da DIV3 e durante i successivi stadi di maturazione. Un simile meccanismo suggerisce che il mantenimento dei neuroni di nuova formazione in uno stato silente, possa essere favorito, come nei ratti (Mokin et al., 2007) da un incremento α_2 -dipendente di complessi NR1-sinaptofisina a livello sinaptico (Voigt et al., 2005). Questa ipotesi è ulteriormente confermata dalle forti variazioni dei livelli di sinaptofisina riscontrate in seguito alla stimolazione dei $GABA_A$ R a DIV7. Solo ad uno stadio più tardivo, i neuroni in forma silente possono essere attivati attraverso la clusterizzazione α_5 -dipendente di complessi recettoriali di tipo AMPA a livello sinaptico, insieme ad un elevato numero di complessi di tipo NMDA (Voigt et al., 2005). Accade, difatti, che durante la co-attivazione di $GABA_A$ R ed NMDAR in tali stadi la trasmissione GABAergica renda nulla la trasmissione Glu-dipendente, prevenendo disordini legati a squilibri della componente eccitatoria, quali attacchi epilettici (Ben-Ari, 2006). In tale periodo, caratterizzato da una trasmissione Gluergica bloccata durante la trasmissione GABAergica e potenziata nelle fasi di decadimento di quest'ultima, l'azione GABAergica sulla maturazione dei neuroni ippocampali assume una natura trofica (Represa e Ben-Ary, 2005). A supporto di tale ipotesi, il rilascio di una maggiore quantità di BDNF caratterizza le fasi iniziali della maturazione dei neuroni ippocampali, suggerendo un ruolo per la neurotrofina nella mediazione degli effetti trofici GABA-dipendenti (Berninger et al., 1995). In aggiunta, meccanismi di

cross-talking tra i complessi GABA_AR ed NMDAR, considerati eventi cruciali per il raggiungimento di un corretto equilibrio eccitatorio-inibitorio (Wang e Kriegstein, 2008), sembrano svolgere un ruolo chiave nello switching dell'azione GABAergica da eccitatoria ad inibitoria (Represa e Ben-Ary, 2005), in accordo con gli elevati livelli di NR1 riscontrati a DIV7, quando la trasmissione NMDAR-mediata è ormai stabilita (Esposito et al., 2005). Nel caso dell'agonista inverso specifico per α_5 (RY-080), la sua azione è prevalentemente diretta alla subunità GluR2 del complesso AMPAR che risulta direttamente associata all'attivazione delle sinapsi silenti (Hennou et al., 2002), proponendo un potenziale meccanismo responsabile della regolazione dell'arborizzazione dendritica. In particolare, i ridotti livelli di tale trascritto indotti da RY-080 a DIV7 suggeriscono che sia il turnover delle spine dendritiche che l'allungamento dei processi dendritici in una fase così precoce dipendano dall'azione di GluR2 sulla determinazione dei contatti sinaptici con altri sistemi neuronali (Liu et al., 2006). Numerosi studi supportano l'importanza di GluR2 nella determinazione dei processi neuronali, come confermato dall'alterata morfologia delle spine dendritiche e dei complessi sinaptici in topi knock-out per GluR2 (Medvedev et al., 2008). L'incorporamento di clusters contenenti GluR2 in siti in cui è presente la subunità obbligata del recettore per l'NMDA (NR1) potrebbe, inoltre, correlarsi ad una conseguente attivazione di neuroni fino a quel momento mantenuti silenti (Mokin et al., 2007). Questo tipo di associazione, che è tipico anche delle sinapsi silenti nelle fasi iniziali della formazione dei circuiti neuronali sia per l'area CA3 ippocampale (Montgomery et al., 2001) che per il nucleo del tratto solitario, una formazione del tronco encefalico considerata stazione di passaggio per diverse fibre viscerosensitive afferenti (Balland et al., 2008) rafforza l'importanza dell'attivazione di α_5 per il completamento della complessità dendritica, almeno nell'HIP degli ibernanti.

Conclusioni

In conclusione, i risultati ottenuti nel presente lavoro di dottorato dimostrano un preciso effetto GABA-dipendente sui processi di maturazione degli elementi neuronali ippocampali del criceto, la cui crescita *in vitro* è stata condotta su membrane FC (De Bartolo et al., 2007). In particolare, l'utilizzo di farmaci selettivi a differenti stadi di sviluppo supportano il ruolo chiave delle subunità $\alpha_{2,5}$ del GABA_AR sui processi di sprouting assonico e di protrusione dendritica (Medvedev et al., 2008) anche nel nostro modello animale. Durante i primi giorni di maturazione, permane un'azione

GABAergica di shunting che contribuisce a mantenere inattivata la componente eccitatoria Gluergica, realizzando in tal modo un meccanismo di neuroprotezione contro eventi di eccitossicità soprattutto in quelle aree ippocampali particolarmente suscettibili a condizioni di stress quali CA1. Allo stesso tempo, l'attivazione di complessi recettoriali contenenti α_2 è responsabile non solo della maturazione della componente assonica, ma determina soprattutto il mantenimento delle sinapsi di nuova formazione in una condizione silente, probabilmente attraverso un precoce reclutamento di complessi NR1-sinaptofisina a livello sinaptico. Verso il termine della prima settimana di maturazione neuronale, l'attivazione di complessi recettoriali contenenti α_5 e l'interazione degli stessi con la componente Gluergica AMPA-mediata contribuisce in primo luogo al reclutamento delle sinapsi fino a quel momento mantenute in condizione silente. In aggiunta, l'azione combinata GABA-Glu contribuisce alla maturazione della componente dendritica neuronale, attraverso un meccanismo che coinvolge importanti fattori neurotrofici quali il BDNF. I risultati di tale lavoro propongono dunque che una selettiva associazione tra distinte subunità GABAergiche e Gluergiche è cruciale per la conversione delle sinapsi silenti (α_2 -NR1) in clusters recettoriali attivati (α_5 -GluR2), esercitando in tal modo un ruolo chiave nel corretto differenziamento dei diversi elementi neuronali. Allo stesso tempo, tale studio getta le basi per gli studi attualmente in corso ed atti alla determinazione del preciso contributo di ciascuna combinazione recettoriale GABA_Aergica nelle specifiche subregioni ippocampali (CA1 e CA3). L'area CA1 è stata, infatti, recentemente riconosciuta come un'importante struttura di output (Daumas et al., 2005), sottolineando il suo ruolo nell'organizzazione e nella specificità di target da raggiungere dalle fibre che da essa si dipartono. Allo stesso tempo, una diversa vulnerabilità caratterizza questa area, in accordo con la presenza di neuroni piramidali molto più sensibili rispetto alla stessa tipologia cellulare in CA3 a condizioni di stress, quali attacchi epilettici (Jackson e Foster, 2009) e danni neuronali indotti da eventi ipossici od ischemici (Olsson et al., 2003). La comprensione dei precisi meccanismi molecolari responsabili delle diverse risposte osservate in CA1 ed in altre regioni ippocampali agli stimoli GABAergici, soprattutto durante le fasi precoci di maturazione neuronale, potrebbe fornire nuove indicazioni riguardanti gli eventi simil-ischemici che ricorrono non solo nello sviluppo perinatale ma anche nella fase di torpore per il criceto ibernante, proponendo al contempo nuovi targets terapeutici per la cura di patologie neurodegenerative quali l'ischemia e la narcolessia.

Bibliografia

- 1) **Abraham WC, Bliss TV, Goddard GV (1995).** Heterosynaptic changes accompany long-term but not short-term potentiation of the perforant path in the anaesthetized rat. *J. Physiol.* 363, 335-349.
- 2) **Acsády L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsáki G (1998).** GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 18(9), 3386-3403. **Ahlemeyer B, Baumgart-Vogt E (2005).** Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. *J. Neurosci. Methods* 149, 110-120.
- 3) **Ahmed OJ, Metha MR (2009).** The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Neuroscience* 32, 329-338.
- 4) **Aizawa H, Hu SC, Bobb K, Balakrishnan K, Ince G, Gurevich I, Cowan M, Ghosh A (2004).** Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science* 303, 197-202.
- 5) **Alberini CM (2005).** Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci.* 28(1), 51-6.
- 6) **Ali AB, Thomson AM (2008).** Synaptic alpha 5 subunit-containing GABAA receptors mediate IPSPs elicited by dendrite-preferring cells in rat neocortex. *Cereb. Cortex* 18(6), 1260-71.
- 7) **Ali C, Docagne F, Nicole O, Lesné S, Toutain J, Young A, Chazalviel L, Divoux D, Caly M, Cabal P, Derlon JM, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D (2001).** Increased expression of transforming growth factor-beta after cerebral ischemia in the baboon: an endogenous marker of neuronal stress? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21 (7), 820-7.
- 8) **Altman J, Bayer BA (1990a).** Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.* 301, 325-342.
- 9) **Altman J, Bayer SA (1990c).** Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 301:365-381.
- 10) **Altman J, Brunner RL, Bayer SA (1973).** The hippocampus and behavioral maturation. *Behav. Biol.* 8, 557-596.
- 11) **Amaral DG, Kurz J (1985).** The time of origin of cells demonstrating glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the rat. *Neurosci. Lett.* 59, 33-39.
- 12) **Amrein I, Dechmann DK, Winter Y, Lipp HP (2007).** Absent or low rate of adult neurogenesis in the hippocampus of bats (Chiroptera). *PLoS ONE.* 2(5), e455.
- 13) **Anborgh PH, Godin C, Pampillo M, Dhimi GK, Dale LB, Cregan SP, Truant R, Ferguson SSG (2005).** Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. *J. Biol. Chem.* 280, 34840-34848.
- 14) **Anderson GD, Miller JW (2002).** Benzodiazepines: chemistry, biotransformation, and pharmacokinetics. In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Peracca E, eds. *Antiepileptic drugs*, 5th edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 187-205.
- 15) **Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001).** Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, 353-363.
- 16) **Ang CW, Carlson GC, Coulter DA (2005).** Hippocampal CA1 circuitry dynamically gates direct cortical input preferentially at theta frequencies. *J. Neurosci.* 25, 9567-9580 (2005).
- 17) **Arancibia-Carcamo IL, Moss SJ (2006).** Molecular organization and assembly of the central inhibitory postsynapse. *Results Probl. Cell. Differ.* 43, 25-47.
- 18) **Atack JR, Wafford KA, Tye SJ, Cook SM, Sohal B, Pike A, Sur C, Melillo D, Bristow L, Bromidge F, Ragan I, Kerby J, Street L, Carling R, Castro JL, Whiting P, Dawson GR, McKernan RM (2006).** TPA023 [7-(1,1-dimethylethyl)-6-(2-ethyl-2H-1,2,4-triazol-3-ylmethoxy)-3-(2-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazine], an agonist selective for alpha2- and alpha3-containing GABA_A receptors, is a nonsedating anxiolytic in rodents and primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 410-422.

- 19) **Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S (2001).** Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* 497, 1-5.
- 20) **Arendt T (2004).** Neurodegeneration and plasticity. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22(7), 507-14.
- 21) **Baer K, Essrich C, Benson JA, Benke D, Bluethmann H, Fritschy JM, Luscher B (1999).** Postsynaptic clustering of γ -aminobutyric acid type A receptors by the $\gamma 3$ subunit in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12860-12865.
- 22) **Balland B, Lachamp P, Kessler JP, Tell F (2008).** Silent synapses in developing rat nucleus tractus solitarius have AMPA receptors. *J. Neurosci.* 28, 4624-4634.
- 23) **Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Nicholas J, Rawlins P, Bannerman DM (2010).** Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. *Eur. J. Pharmacol.* 626(1), 49-56.
- 24) **Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998).** International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50, 291-313.
- 25) **Barrera NP, Betts J, You H, Henderson RM, Martin IL, Dunn SMJ, Edwardson JM (2008).** Atomic force microscopy reveals the stoichiometry and subunit arrangement of the $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA_A receptor. *Mol. Pharmacol.* 73, 960-967.
- 26) **Bayer SA (1980a).** Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with ³H-thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 190, 87-114.
- 27) **Bayer SA (2004).** Development of the hippocampal region in the rat I. Neurogenesis examined with ³H-thymidine autoradiography. *The J. of comparative neurology* 1, 87-114.
- 28) **Bear MF, Malenka RC (1994).** Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 389-399.
- 29) **Bellion A, Wassef M, Metin C (2003).** Early differences in axonal outgrowth, cell migration and GABAergic differentiation properties between the dorsal and lateral cortex. *Cereb. Cortex.* 13, 203-214.
- 30) **Ben-Ari Y (2001).** Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* 24(6), 353-360.
- 31) **Ben Ari Y (2002).** Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728-739.
- 32) **Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007).** GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 87(4), 1215-84.
- 33) **Ben-Ari Y (2006).** Seizures beget seizures: the quest for GABA as a key player. *Crit. Rev. Neurobiol.* 18(1-2), 135-144.
- 34) **Beneyto M, Meador-Woodruff JH (2004).** Expression of transcripts encoding AMPA receptor subunits and associated postsynaptic proteins in the macaque brain. *J. Comp. Neurol.* 468, 530-554.
- 35) **Benfenati F (2007).** Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed.* 78, 58-66.
- 36) **Benowitz LI, Routtenberg A (1997).** GAP-43: An intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* 20, 84-91.
- 37) **Benveniste H (2009).** Glutamate, microdialysis, and cerebral ischemia: lost in translation? *Anesthesiology* 110, 422-425.
- 38) **Berninger B, Marty S, Zafra F, da Penha Berzaghi M, Thoenen H, Lindholm D (1995).** GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation *in vitro*. *Development* 121(8), 2327-2335.
- 39) **Bertrand S, Lacaille JC (2001).** Unitary synaptic currents between lacunosum-moleculare interneurons and pyramidal cells in rat hippocampus. *J. Physiol.* 532, 39-384.
- 40) **Bettler B, Tiao JY (2006).** Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol. Ther.* 110(3), 533-43.
- 41) **Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M (2004).** Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol. Rev.* 84, 835-867.

- 42) **Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, Friauf E, Nothwang HG (2006).** Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *J. Neurosci.* 26(41), 10407-19.
- 43) **Bleich S, Romer K, Wiltfang J, Kornhuber J (2003).** Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 18, S33-S40.
- 44) **Bogdanovic N, Davidsson P, Volkmann I, Winbland B, Blennow K (2000).** Growth-associated protein GAP-43 in the frontal cortex and in the hippocampus in Alzheimer's disease: An immunohistochemical and quantitative study. *J. Neural. Transm.* 107, 463-478.
- 45) **Borboni P, Porcio O, Fusco A, Sesti G, Lauro R, Marlier LN (1994).** Molecular and cellular characterization of the GABA_A receptor in the rat pancreas. *Mol. Cell. Endocrinol.* 103, 157-163.
- 46) **Bormann J, Feigenspan A (1995).** GABAC receptors. *Trends Neurosci.* 18, 515-519.
- 47) **Bormann J (2000).** The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21(1), 16-9.
- 48) **Born J, Rasch B, Gais S (2006).** Sleep to remember. *Neuroscientist* 12(5), 410-24.
- 49) **Bradley SR, Levey AI, Hersch SM (1996).** Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* 16, 2044-2056.
- 50) **Breitinger HG, Becker CM (2002).** The inhibitory glycine receptor-simple views of a complicated channel. *Chembiochem.* 3, 1042-1052.
- 51) **Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M (1999).** Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J. Neurosci.* 19, 2960-2973.
- 52) **Brickley SG, Revilla V, Cull-Candy SG, Wisden W, Farrant M (2001).** Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature* 409, 88-92.
- 53) **Brooks-Kayal AR, Jin H, Price M, Dichter MA (1998).** Developmental expression of GABA_A receptor subunit mRNAs in individual hippocampal neurons in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 70, 1017-1028.
- 54) **Bruel-Jungerman E, Davis S, Laroche S (2007).** Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *Neuroscientist* 13(5), 492-505.
- 55) **Brunig I, Scotti E, Sidler C, Fritschy JM (2002).** Intact sorting, targeting, and clustering of γ -aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons *in vitro*. *J. Comp. Neurol.* 443, 43-55.
- 56) **Bruno V, Battaglia G, Copani A, Giffard RG, Raciti G, Raffaele R, Shinozaki H, Nicoletti F (1995).** Activation of class II or III metabotropic glutamate receptors protects cultured cortical neurons against excitotoxic degeneration. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1906-1913.
- 57) **Brustovetsky N, Brustovetsky T, Jemmerson R, Dubinsky JM (2002).** Calcium-induced cytochrome *c* release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. *J. Neurochem.* 80, 207-18.
- 58) **Buck CL, Barnes BM (2000).** Effects of ambient temperature on metabolic rate respiratory quotient and torpor in an arctic hibernator. *Am. J. Physiol.* 279, R255-R262.
- 59) **Burnashev N, Zhou Z, Neher E (1995).** Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J. Physiol.* 485, 403-418.
- 60) **Burwell RD, Amaral DG (1998).** Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J. Comp. Neurol.* 398, 179-205.
- 61) **Burwell RD, Bucci DJ, Sanborn MR, Jutras MJ (2004).** Perirhinal and postrhinal contributions to remote memory for context. *J. Neurosci.* 24(49), 11023-8.
- 62) **Butler AB, Hodos W (1996).** Limbic telencephalon, in "Comparative Vertebrate neuroanatomy. Evolution and adaptation". *PSYCHOMEDIA*. pp. 438-460.
- 63) **Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005).** The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron.* 48, 591-604.

- 64) **Buttner B, Kannicht C, Reutter W, Horstkorte R (2003)**. The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 967-971.
- 65) **Cameron HA, McKay RDG (1999)**. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature Neurosci.* 2, 894-897.
- 66) **Cancedda L, Fiumelli H, Chen K, Poo M (2007)**. Excitatory GABA actions is essential for morphological maturation of cortical neurons *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* 27(19), 5224-5235.
- 67) **Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G (2002)**. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell Sci.* 115, 4727-34.
- 68) **Canepari M, Ogden D (2003)**. Evidence for protein tyrosine phosphatase, tyrosine kinase, and G-protein regulation of the parallel fiber metabotropic slow EPSC of rat cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 23, 4066-4071.
- 69) **Canonaco M, O'Connor LH, Pfaff DW, McEwen BS (1989)** Longer term progesterone treatment induces changes of GABAA receptor levels in forebrain sites in the female hamster: Quantitative autoradiography study. *Exp. Brain Res.* 77, 407-411.
- 70) **Canonaco M, Facciolo RM, Alò R (2002)**. Neuroactive steroid mechanisms and GABA type A receptor subunit assembly in hypothalamic and extrahypothalamic regions. *Int. Rev. Cytol.* 214, 63-101.
- 71) **Canonaco M, Madeo M, Alò R, Giusi G, Granata T, Carelli A, Canonaco A and Facciolo RM (2005)**. The histaminergic signaling system exerts a neuroprotective role against neurodegenerative-induced processes in the hamster. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 188-195.
- 72) **Cao G, Xing J, Xiao X (2007)**. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J. Neurosci.* 27, 9278-9293.
- 73) **Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002)**. Emotion and motivation: the role of the amygdale, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26(3), 321-352.
- 74) **Carlson BX, Engblom AC, Kristiansen U, Schousboe A, Olsen RW (2000)**. A single glycine residue at the entrance to the first membranesspanning domain of the gamma-aminobutyric acid typeA receptor beta2 subunit affects allosteric sensitivity to GABA and anesthetics. *Mol. Pharmacol.* 57, 474-484.
- 75) **Casoli T, Di Stefano G, Gracciotti N, Giovanetti S, Fattoretti P, Solazzi M, Bertoni-Freddari C (2001)**. Cellular Distribution of GAP-43 mRNA in Hippocampus and Cerebellum of Adult Rat Brain by *In Situ* RT-PCR. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1195-1196.
- 76) **Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA (1997)**. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388, 182-186.
- 77) **Casula MA, Bromidge FA, Pillai GV, Wingrove PB, Martin K, Maubach K, Seabrook GR, Whiting PJ, Hadingham KL (2001)**. Identification of amino acid residues responsible for the alpha5 subunit binding selectivity of L- 655,708, a benzodiazepine binding site ligand at the GABA_A receptor. *J. Neurochem.* 77, 445-451.
- 78) **Cenquizca LA, Swanson LW (2006)**. Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *J. Comp. Neurol.* 497, 101.
- 79) **Chakravarthy B, Rashid A, Brown L, Tessier L, Kelly J, Ménard M (2008)** Association of GAP-43 (neuromodulin) with microtubuleassociated protein MAP-2 in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 679-683.
- 80) **Chang S, De Camilli P (2001)**. Glutamate regulates actin-based motility in axonal filopodia. *Nat. Neurosci.* 4, 787-793.
- 81) **Changeux JP, Danchin A (1976)**. Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature* 264, 705-712.
- 82) **Chavis P, Shinozaki H, Bockaert J (1994)**. The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 14, 7067-7076.

- 84) **Chebib M, Johnston GA (2000)**. GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J. Med. Chem.* 43(8), 1427-47.
- 85) **Chen L, Segal DM, Mash D (1999)**. Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction: An approach for the measurement of target gene expression in human brain. *Brain Reserch. protocol.* 4, 132-139.
- 86) **Chouinard G (2004)**. Issues in the clinical use of benzodiazepines: potency, withdrawal, and rebound. *J. Clin. Psychiatry* 65, 7-12.
- 87) **Chugani DC, Muzik O, Juhasz C, Janisse JJ, Ager J, Chugani HT (2001)**. Postnatal maturation of human GABAA receptors measured with positron emission tomography. *Ann. Neurol.* 49(5), 618-26.
- 88) **Coleman SK, Moykkynen T, Cai C, Von Ossowski L, Kuismanen E, Korpi ER, Keinanen K (2006)**. Isoform-specific early trafficking of AMPA receptor flip and flop variants. *J. Neurosci.* 26, 11220-11229.
- 89) **Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004)**. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 952-962.
- 90) **Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M (2009)**. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2-5.
- 91) **Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, Sur C, Smith A, Otu FM, Howell O, Atack JR, McKernan RM, Seabrook GR, Dawson GR, Whiting PJ, Rosahl TW (2002)**. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J. Neurosci.* 22, 5572-5580.
- 92) **Cope DW, Hughes SW, Crunelli V (2005)**. GABA_A receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J. Neurosci.* 25, 11553-11563.
- 93) **Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP (2000)**. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 431-458.
- 94) **Costa E, Auta J, Grayson DR, Matsumoto K, Pappas GD, Zhang X, Guidotti A (2002)**. GABA_A receptors and benzodiazepines: a role for dendritic resident subunit mRNAs. *Neuropharmacology* 43, 925-937.
- 95) **Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Bluthmann H, Mohler H, Rudolph U (2002)**. Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8980-8985.
- 96) **Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001)**. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin Neurobiol.* 11, 327-335.
- 97) **Cunningham MD, Enna SJ (1996)**. Evidence for pharmacologically distinct GABAB receptors associated with cAMP production in rat brain. *Brain Res.* 720(1-2), 220-4.
- 98) **Czuczwar SJ, Patsalos PN (2001)**. The new generation of GABA enhancers. Potential in the treatment of epilepsy. *CNS Drugs*, 15 (5), 339-50.
- 99) **Danglot L, Triller A, Marty S (2006)**. The Development of Hippocampal Interneurons in Rodents. *Hippocampus* 16, 1032-1060.
- 100) **Daumas S, Halley H, Francés B, Lassalle JM (2005)**. Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn. mem* 12(4), 375-82.
- 101) **Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF (1999)**. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin receptor function. *Nature* 397, 359-363.
- 102) **Dawson GR, Maubach KA, Collinson N, Cobain M, Everitt J, MacLeod AM, Choudhury HI, McDonald LM, Pillai G, Rycroft W, Smith AJ, Sternfeld F, Tattersall FD, Wafford KA, Reynolds DS, Seabrook GR, Atack JR (2006)**. An inverse agonist selective for α_5 subunit-containing GABA_A receptors enhances cognition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 1335-1345.
- 103) **De Bartolo L, Rende M, Giusi G, Morelli S, Piscioneri A, Canonico M, Drioli E (2007)**. Membrane bio-hybrid systems: A valuable tool for the study of neuronal activities. In: Canonaco M, Facciolo RM, editors. *Evolutionary Molecular Strategies and Plasticity*. Kerala: Research Signpost Press, pp 379-396.

- 104) **De Bartolo L, Rende M, Morelli S, Giusi G, Piscioneri A, Gordano A, Di Vito A, Canonaco M, Drioli E (2008)**. Influence of membrane surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus. *J. Membrane Sci.* 325, 139-149.
- 105) **Debiasi RL, Squier MK, Pike B, Wynes M, Dermody TS, Cohen JJ, Tyler KL (1999)**. Reovirus-induced apoptosis is preceded by increased cellular calpain activity and is blocked by calpain inhibitors. *J. Virol.* 73(1), 695-701.
- 106) **Debiec J, LeDoux JE, Nader K (2002)**. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36(3), 527-38.
- 107) **Demyanenko GP, Tsai AY, Maness PF (1999)**. Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J. Neurosci.* 19, 4907-4920.
- 108) **Devor A, Fritschy JM, Yarom Y (2001)**. Spatial distribution and subunit composition of GABA_A receptors in the inferior olivary nucleus. *J. Neurophysiol.* 85, 1686-1696.
- 109) **Dhami GK, Dale LB, Anborgh PH, O'Connor-Halligan KE, Sterne-Marr R, Ferguson SSG (2004)**. Protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Gαq to attenuate signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 16614-166620.
- 110) **Di Stefano G, Casoli T, Fattoretti P, Gracciotti N, Solazzi M and Bertoni-Freddari C (2001)**. Distribution of MAP2 in Hippocampus and Cerebellum of Young and Old Rats by Quantitative Immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 49(8), 1065-1066.
- 111) **Dias R, Sheppard WF, Fradley RL, Garrett EM, Stanley JL, Tye SJ, Goodacre S, Lincoln RJ, Cook SM, Conley R, Hallett D, Humphries AC, Thompson SA, Wafford KA, Street LJ, Castro JL, Whiting PJ, Rosahl TW, Atack JR, McKernan RM, Dawson GR, Reynolds DS (2005)**. Evidence for a significant role of alpha 3-containing GABAA receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. *J. Neurosci.* 25(46), 10682-8.
- 112) **Dickson KS, Kind PC (2003)**. NMDA receptors: neural map designers and refiners? *Curr. Biol.* 13, R920-2.
- 113) **Di Vito A, Giusi G, Piscioneri A, Morelli S, De Bartolo L, Drioli E, Canonaco M (2010)**. α GABAAR subunits regulate structural and expression properties of CA1 hippocampal neuronal elements. *In preparation*.
- 114) **Dolorfo CL, Amaral DG (1998)**. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J. Comp. Neurol.* 398, 49-82.
- 115) **Dowell-Mesfin NM, Abdul-Karim MA, Turner AM, Schanz S, Craighead HG, Roysam B, Turner JN, Shain W (2004)**. Topographically modified surfaces affect orientation and growth of hippocampal neurons. *J. Neural. Eng.* 1, 78-90.
- 116) **Drioli E, De Bartolo L (2006)**. Membrane bioreactor for cell tissues and organoids. *Artificial organs* 30, 793-802.
- 117) **Dunn SM, Davies M, Muntoni AL, Lambert JJ (1999)**. Mutagenesis of the rat α1 subunit of the gamma-aminobutyric acid(A) receptor reveals the importance of residue 101 in determining the allosteric effects of benzodiazepine site ligands. *Mol. Pharmacol.* 56, 768-774.
- 118) **Dykens JA, Stern A, Trenkner E (1987)**. Mechanism of kainite toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. *J. Neurochem.* 49, 1222-1228.
- 119) **Eastwood SL, Harrison PJ (1999)**. Detection and quantification of hippocampal synaptophysin messenger RNA in schizophrenia using autoclaved, formalin-fixed, paraffin wax-embedded sections. *Neuroscience* 93(1), 99-106.
- 120) **Eichenbaum H (2000)**. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature Rev. Neurosci.* 1, 41-50.
- 121) **Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ (2000)**. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 7579-7584.
- 122) **Elowe S, Holland SJ, Kulkarni S, Pawson T (2001)**. Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7429-7441.
- 123) **Enari M, Sakahira H, Yokoyama H (1998)**. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

- 124) **Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C Peterson DA, Gage FH (1998).** Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313-1317.
- 125) **Ernst M, Brauchart D, Boresch S, Sieghart W (2003).** Comparative modeling of GABA_A receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience* 119, 933-943.
- 126) **Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005).** Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development *The Journal of Neuroscience* 25(44), 10074-10086.
- 127) **Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005).** Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci.* 25, 10074–10086.
- 128) **Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B (1998).** Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat. Neurosci.* 1, 563–571.
- 129) **Evans GJ, Cousin MA (2005).** Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1350-1353.
- 130) **Ewald RC, Van Keuren-Jensen KR, Aizenman CD, Cline HT (2008).** Roles of NR2A and NR2B in the development of dendritic arbor morphology in vivo. *J. Neurosci.* 28, 850–861.
- 131) **Fahrner A, Kann G, Flubacher A, Heinrich C, Freiman TM, Zentner J, Frotscher M, Haas CA (2007).** Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis in temporal lobe epilepsy patients. *Exp. Neurol.* 203, 320–332.
- 132) **Farahani R, Pina-Benabou MH, Kyrozis A (2005).** Alterations in metabolism and gap junction expression may determine the role of astrocytes as “Good Samaritans” or executioners. *Glia* 50, 351–361.
- 133) **Farrant M, Kaila K (2007).** The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling [In GABA and the Basal Ganglia: from Molecules to Systems.]. *Prog. Brain Res.* 160, 59–87.
- 134) **Farrant M, Nusser Z (2005).** Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 215–229.
- 135) **Feligioni M, Holman D, Haglerod C, Davanger S, Henley JM (2006).** Ultrastructural localisation and differential agonist-induced regulation of AMPA and kainate receptors present at the presynaptic active zone and postsynaptic density. *Journal of Neurochemistry.* 99, 549–560.
- 136) **Ferraguti F, Shigemoto R (2004).** Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* 326, 483–504.
- 137) **Ferreira LT, Dale LB, Ribiero FM, Babwah AV, Pampillo M, Ferguson SSG (2009).** Calcineurin inhibitor protein (CAIN) attenuates group I metabotropic glutamate receptor endocytosis and signaling. *J. Biol. Chem.* 284, 28986-28994.
- 138) **Fici GJ, Althaus JS, VonVoigtlander PF (1997).** Effects of lazaroids and a peroxynitrite scavenger in a cell model of peroxynitrite toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 223–228.
- 139) **Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE Jr, Schulman H, Meyer T (2003).** Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron* 39, 283-297.
- 140) **Fix AS, Horn JW, Wightman KA (1993).** Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive Nmethyl- D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)-801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Exp. Neurol.* 123, 204–215.
- 141) **Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M, Mehlen P (2002).** Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 417, 443-447.
- 142) **Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (2003).** Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J. Neurosci.* 23, 1416-1423.
- 143) **Frankland PW, Bontempi B (2005).** The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 6(2), 119-30.

- 144) **Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004)**. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304(5672), 881-3.
- 145) **Frederickson CJ (1989)**. Neurobiology of zinc and zincontaining neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 31, 145–238.
- 146) **Frerking M, Schmitz D, Zhou Q (2001)**. Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3→CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J. Neurosci.* 21, 2958–2966.
- 147) **Freund TF (2003)**. Interneuron diversity series: rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci.* 26, 489–495.
- 148) **Fritschy JM, Kiener T, Boulleret V, Loup F (1999)**. GABAergic neurons and GABA_A-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem. Inter.* 34, 435-445.
- 149) **Fuentealba P, Klausberger T, Huck JHJ, Sakatani T, Suen WY, Roberts JDB, Studer M, Somogyi P (2006)**. Firing pattern and synaptic targets of GABAergic neurogliaform cells in the rat hippocampus in vivo. *FENS Abstr* 3:A151.7.
- 150) **Fukata Y, Kimura T, Kaibuchi K (2002)**. Axon specification in hippocampal cells. *Neurosci. Res.* 43, 305-315.
- 151) **Furtak SC, Wei SM, Agster KL, Burwell RD (2007)**. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus* 17, 709–722.
- 152) **Gage FH (2000)**. Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–1438.
- 153) **Galanopoulou AS (2008)**. GABA_A receptors in normal development and seizures: friends or foes? *Current Neuropharm.* 6, 1-20.
- 154) **Galanopoulou AS, Kyrozis A, Claudio OI, Stanton PK, Moshé SL (2003)**. Sex-specific KCC2 expression and GABA_A receptor function in rat substantia nigra. *Exp. Neurol.* 183 (2), 628-637.
- 155) **Galanopoulou AS (2006)**. Sex- and cell-type-specific patterns of GABA_A receptor and estradiol-mediated signaling in the immature rat substantia nigra. *Eur. J. Neurosci.* 23 (9), 2423-30.
- 156) **Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, Henkemeyer M, Strebhardt K, Hirai H, Wilkinson DG, Pawson T, Davis S, Yancopoulos GD (1996)**. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17, 9-19.
- 157) **Gassmann M, Shaban H, Vigot R, Sansig G, Haller C, Barbieri S, Humeau Y, Schuler V, Müller M, Kinzel B, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, Heid J, Kelly PH, Gentry C, Jatton AL, Van der Putten H, Mombereau C, Lecourtier L, Mosbacher J, Cryan JF, Fritschy JM, Lüthi A, Kaupmann K, Bettler B (2004)**. Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J. Neurosci.* 24(27), 6086-97.
- 158) **Gaudilliere B, Konishi Y, de la Iglesia N, Yao G, Bonni A (2004)**. A CaMKII–NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron* 41, 229-241.
- 159) **Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H (2007)**. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci.* 30, 1-8.
- 160) **Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995)**. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15, 193–204.
- 161) **Gereau RW, Heinemann SF (1998)**. Role of protein kinase C phosphorylation in rapid desensitization of metabotropic glutamate receptor 5. *Neuron* 20, 143-151.
- 162) **Gilbert PE, Kesner RP, Lee I (2001)**. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11(6), 626-36.
- 163) **Ginsberg SD, Che S (2005)**. Expression profile analysis within human hippocampus: comparison of CA1 and CA3 pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.* 487, 107-118.
- 164) **Giusi G, Facciolo RM, Rende M, Alò R, Di Vito A, Salerno S, Morelli S, De Bartolo L, Drioli E, Canonaco M (2009)**. Distinct a Subunits of the GABA_A Receptor are

- Responsible for Early Hippocampal Silent Neuron-Related Activities. *HIPPOCAMPUS* 19, 1103-1114.
- 165) **Glickfeld LL, Scanziani M (2006)**. Distinct timing in the activity of cannabinoid-sensitive and cannabinoid-insensitive basket cells. *Nat. Neurosci.* 9, 807.
- 166) **Glykys J, Mann EO, Mody I (2008)**. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J. Neurosci.* 28,1421-1426.
- 167) **Gold AE, Kesner RP (2005)**. The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus* 15(6), 808-14.
- 168) **Goldberg JL, Cameron ME, Dugas JC, Barres BA (2003)**. Molecular mechanism for the loss of intrinsic axon regenerative ability by retinal ganglion cells. *Soc Neurosci Abstracts* 358.
- 169) **Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS (1992)**. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J. Neurosci.* 12, 3642-50.
- 170) **Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E (1999)**. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5263–5267.
- 171) **Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L (2004)**. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine orphogenesis. *Nat. Neurosci.* 7, 364–372.
- 172) **Gozlan H, Ben-Ari Y (2003)**. Interneurons are the source and the targets of the first synapses formed in the rat developing hippocampal circuit. *Cereb. Cortex.* 13, 684–692.
- 173) **Grooms SY, Noh KM, Regis R, Bassell GJ, Bryan MK, Carroll RC, Zukin RS (2006)**. Activity bidirectionally regulates AMPA receptor mRNA abundance in dendrites of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 26, 8339–8351.
- 174) **Gulyas AI, Sik A, Payne JA, Kaila K, Freund TF (2001)**. The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur. J. of Neurosci.* 13, 2205-2217.
- 175) **Haas K, Li J, Cline HT (2006)**. AMPA receptors regulate experience-dependent dendritic arbor growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12127–12131.
- 176) **Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N (2002)**. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J. Cell. Biol.* 158, 541-549.
- 177) **Harris E, Witter MP, Weinstein G, Stewart M (2001)**. Intrinsic connectivity of the rat subiculum: I. Dendritic morphology and patterns of axonal arborization by pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.* 435, 490-505.
- 178) **Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, Sander T, Ramirez A, Poser B, Maljevic S, Hebeisen S, Kubisch C, Rebstock J, Horvath S, Hallmann K, Dullinger JS, Rau B, Haverkamp F, Beyenburg S, Schulz H, Janz D, Giese B, Muller-Newen G, Propping P, Elger CE, Fahlke C, Lerche H, Heils A (2003)**. Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat. Genet.* 33(4), 527-32.
- 179) **Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000)**. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J. Neurosci.* 20(15), 5764-74.
- 180) **He Q, Meiri KF (2002)**. Isolation and characterization of detergent-resistant microdomains responsive to NCAM-mediated signalling from growth cones. *Mol. Cell. Neurosci.* 19, 18-31.
- 181) **Heidinger V, Manzerra P, Wang XQ, Strasser U, Yu SP, Choi DW, Behrens MM (2002)**. Metabotropic glutamate receptor 1-induced upregulation of NMDA receptor current: mediation through the Pyk2/Src-family kinase pathway in cortical neurons. *J. Neurosci.* 22, 5452-5461.
- 182) **Heldt SA, Ressler KJ (2007)**. Forebrain and midbrain distribution of major benzodiazepine-sensitive GABAA receptor subunits in the adult C57 mouse as assessed with in situ hybridization. *Neuroscience* 150, 370-385.
- 183) **Henneberger C, Juttner R, Schmidt SA, Walter J, Meier JC, Rothe T, Grantyn R (2005)**. GluR- and TrkB-mediated maturation of GABA receptor function during the period of eye opening. *Eur. J. Neurosci.* 21(2), 431-40.

- 184) **Hennou S, Khalilov I, Diabira D, Ben Ari Y, Gozlan H (2002)**. Early sequential formation of functional GABAA and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat fetal hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 16, 197-208.
- 185) **Hentschke M, Wiemann M, Hentschke S, Kurth I, Hermans-Borgmeyer I, Seidenbecher T, Jentsch TJ, Gal A, Hubner CA (2006)**. Mice with a targeted disruption of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger AE3 display a reduced seizure threshold. *Mol. Cell Biol.* 26 (1), 182-91..
- 186) **Henze DA, Wittner L, Buzsaki G (2002)**. Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat. Neurosci.* 5, 790-795.
- 187) **Herrera F, Martin V, Garcia-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Antolin I, Rodriguez C (2007)**. Melatonin prevents glutamate-induced oxytosis in the HT22 mouse hippocampal cell line through an antioxidant effect specifically targeting mitochondria. *J. Neurochem.* 100, 736-746.
- 188) **Hescham S, Grace L, Kellaway LA, Bugarith K, Russell VA (2009)**. Effect of exercise on synaptophysin and calcium-calmodulin-dependent protein kinase levels in prefrontal cortex and hippocampus of a rat model of developmental stress. *Metab. Brain Dis.* 24(4), 701-709.
- 189) **Heuss C, Scanziani M, Gahwiler BH (1999)**. G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat. Neurosci.* 2, 1070-1077.
- 190) **Hevers W, Luddens H (1998)**. The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol. Neurobiol.* 18, 35-86.
- 191) **Hinsby AM, Berezin V, Bock E (2004)**. Molecular mechanisms of NCAM function. *Front. Biosci.* 9, 2227-2244.
- 192) **Honda Y, Umitsu Y, Ishizuka N (1999)**. Efferent projections of the subiculum to the retrohippocampal and retrosplenial cortices of the rat. *Neurosci. Res.* 22 (Suppl.), S265.
- 193) **Honda Y, Umitsu Y, Ishizuka N (2008)**. Organization of connectivity of the rat presubiculum: II. Associational and commissural connections. *J. Comp. Neurol.* 506, 640-658.
- 194) **Hornung JP, Fritschy JM (1996)**. Developmental profile of GABAA-receptors in the marmoset monkey: expression of distinct subtypes in pre- and postnatal brain. *J. Comp. Neurol.* 367(3), 413-430.
- 195) **Hsueh YP (2009)**. Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase and mental retardation. *Ann. Neurol.* 66, 438-443.
- 196) **Huang Z (2009)**. Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 11-22.
- 197) **Hubner CA, Lorke DE, Hermans-Borgmeyer I (2004)**. Expression of the Na-K-2Cl-cotransporter NKCC1 during mouse development. *Mech. Dev.* 102 (1-2), 267-9.
- 198) **Hung AY, Futai K, Sala C, Valtschanoff JG, Ryu J, Woodworth MA, Kidd FL, Sung CC, Miyakawa T, Bear MF, Weinberg RJ, Sheng M (2008)**. Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *J. Neurosci.* 28, 1697-1708.
- 199) **Hur EM, Kim KT (2007)**. A role of local signalling in the establishment and maintenance of the asymmetrical architecture of a neuron. *J Neurochem* 101: 600-610.
- 200) **Husi H., Grant S. G., (2001)**. Isolation of 2000-kDa complexes of Nmethyl- D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *J. Neurochem.* 77(1), 281-91.
- 201) **Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000)**. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat. Neurosci.* 3, 661-669.
- 202) **Hutcheon B, Morley P, Poulter MO (2000)**. Developmental change in GABA_A receptor desensitization kinetics and its role in synapse function in rat cortical neurons. *J. Physiol.* 522, 3-17.
- 203) **Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008)**. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* 11, 1153-1161.
- 204) **Irie F, Yamaguchi Y (2002)**. EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat. Neurosci.* 5, 1117-1118.

- 205) **Izquierdo I, Medina JH (1991)**. GABA_A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 260-265.
- 206) **Jackson TC, Foster TC (2009)**. Regional Health and Function in the hippocampus: Evolutionary compromises for a critical brain region. *Biosci. Hypotheses* 2(4), 245-251.
- 207) **Jang IS, Ito Y, Akaike N (2005)**. Feed-forward facilitation of glutamate release by presynaptic GABA(A) receptors. *Neuroscience* 135, 737-748.
- 208) **Jarsky T et al. (2005)** Conditional dendritic spike propagation following distal synaptic activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 8, 1667-1676.
- 209) **Jechlinger M, Pelz R, Tretter V, Klausberger T, Sieghart W (1998)**. Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABA_A receptors containing alpha6 subunits. *J. Neurosci.* 18, 2449-2457.
- 210) **Jin P, Zhang J, Rowe-Teeter C, Yang J, Stuve LL, Fu GK (2004)**. Cloning and characterization of a GABA_A receptor gamma2 subunit variant. *J. Biol. Chem.* 279 (2), 1408-14.
- 211) **Jinno S, Kosaka T (2006)**. Cellular architecture of the mouse hippocampus: A quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci. Res.* 56, 229-245.
- 212) **Jinno S, Kosaka T (2003)**. Heterogeneous expression of the cholecystininlike immunoreactivity in the mouse hippocampus, with special reference to the dorsoventral difference. *Neuroscience* 122, 869-884.
- 213) **Jinno S, Klausberger T, Marton LF, Dalezios Y, Roberts JD, Fuentealba P, Bushong EA, Henze D, Buzsaki G, Somogyi P (2007)**. Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 8790-8804.
- 214) **Johnson GVW, Jope RS (1992)**. The role of MAP2 in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J. Neurosci. Res.* 33, 505-512.
- 215) **Johnston GAR (2002)**. Medicinal chemistry and molecular pharmacology of GABA_C receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 903-913.
- 216) **Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC (2004)**. Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* 7, 244-253.
- 217) **Kajiwara R, Wouterlood FG, Anupam Sah, Boekel AJ, Baks-te Bulte LTG, Witter MP (2008)**. Convergence of Entorhinal and CA3 Inputs Onto Pyramidal Neurons and Interneurons in Hippocampal Area CA1 – An Anatomical Study in the Rat. *Hippocampus* 18, 266-280.
- 218) **Kanaumi T, Takashima S, Iwasaki H, Mitsudome A, Hirose S (2006)**. Developmental changes in the expression of GABA_A receptor alpha 1 and gamma 2 subunits in human temporal lobe, hippocampus and basal ganglia: an implication for consideration on age-related epilepsy. *Epilepsy Res.* 71(1), 47-53.
- 219) **Kandel ER, Pittenger C (1999)**. The past, the future and the biology of memory storage. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 354, 2027-52.
- 220) **Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997)**. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
- 221) **Kenney JW, Gould TJ (2008)**. Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Mol neurobiol* 38(1), 101-21.
- 222) **Keramides A, Moorhouse AJ, Schofield PRP, Barry PH (2004)**. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 86, 161-204.
- 223) **Kerr KM, Agster KL, Furtak SC, Burwell RD (2007)**. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17, 697-708.
- 224) **Khan GM, Smolders I, Lindekens H, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1999)** Effects of diazepam on extracellular brain neurotransmitters in pilocarpine-induced seizures in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 373, 153-161.
- 225) **Khazipov R, Esclapez M, Caillard O, Bernard C, Khalilov I, Tyzio R, Hirsch J, Dzhala V, Berger B, Ben Ari Y (2001)**. Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J Neurosci.* 21, 9770-9781.

- 226) **Kimura K, Mizoguchi A, Ide C (2003)**. Regulation of growth cone extension by SNARE proteins. *Histochem. Cytochem.* 51, 429-433.
- 227) **Kiryushko D, Korshunova I, Berezin V, Bock E (2006)**. Neural cell adhesion molecule induces intracellular signaling via multiple mechanisms of Ca²⁺ homeostasis. *Mol. Biol. Cell.* 17, 2278-228.
- 228) **Kiselyov VV, Skladchikova G, Hinsby AM (2003)**. Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure* 11, 691-701.
- 229) **Kiselyov VV, Soroka V, Berezin V, Bock E (2005)**. Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J. Neurochem.* 94, 1169-1179.
- 230) **Klausberger T, Somogyi P (2008)**. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321, 53-57.
- 231) **Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsàki G, Somogyi P (2003)**. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421, 844-848.
- 232) **Kloosterman F, Van haften T, Witter MP, Lopes Da Silva FH (2003)**. Electrophysiological characterization of interlaminar entorhinal connections: an essential link for re-entrance in the hippocampal-entorhinal system. *Eur. J. Neurosci.* 18, 3037-3052.
- 233) **Kohara K, Kitamura A, Adachi N, Nishida M, Itami C, Nakamura S, Tsumoto T (2003)**. Inhibitory but not excitatory cortical neurons require presynaptic brain-derived neurotrophic factor for dendritic development, as revealed by chimera cell culture. *J. Neurosci.* 23, 6123-6131.
- 234) **Kolarow R, Brigadski T, Lessmann V (2007)**. Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J. Neurosci.* 27, 10350-10364.
- 235) **Korber C, Werner M, Hoffmann J, Sager C, Tietze M, Schmid SM, Kott S, Hollmann M (2007)**. Stargazin interaction with amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) receptors is critically dependent on the amino acid at the narrow constriction of the ion channel. *J. Biol. Chem.* 282, 18758-18766.
- 236) **Korpi ER, Grunder G, Luddens H (2002)**. Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog. Neurobiol.* 67, 113-159.
- 237) **Korshunova I, Novitskaya V, Kiryushko D, Pedersen N, Kolkova K, Kropotova E, Mosevitsky M, Rayko M, Morrow JS, Ginzburg I, Berezin V, Bock E (2007)**. GAP-43 regulates NCAM-180-mediated neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 100, 1599-1612.
- 238) **Koss DJ, Hindley KP, Riedel G, Platt B (2007)**. Modulation of hippocampal calcium signalling and plasticity by serine/threonine protein phosphatases. *J. Neurochem.* 102, 1009-1023.
- 239) **Koss DJ, Riedel G, Platt B (2009)**. Intracellular Ca²⁺ stores modulate SOCCs and NMDA receptors via tyrosine kinases in rat hippocampal neurons. *Cell Calcium* 46, 39-48.
- 240) **Kriegstein AR, Noctor SC (2004)**. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27, 392-399.
- 241) **Kuo TY, Chen CY, Hsueh YP (2010)**. Bcl11A/CTIP1 mediates the effect of the glutamate receptor on axon branching and dendrite outgrowth. *J. Neurochem.* 114, 1381-1392.
- 242) **Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, Kushiya E, Natsume R, Watanabe M, Inoue Y, Yagi T, Aizawa S, Arakawa M, Takahashi T, Nakamura Y, Mori H, Mishina M (1996)**. Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* 16, 333-344.
- 243) **Kyrozis A, Chudomel O, Moshe SL, Galanopoulou AS (2006)**. Sex-dependent maturation of GABA_A receptor-mediated synaptic events in rat substantia nigra reticulata. *Neurosci. Lett.* 398 (1-2), 1-5.
- 244) **Lau A, Tymianski M (2010)**. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Eur. J. Physiol.* 460, 525-542.

- 245) **Laux T, Fukami K, Thelen M, Golub T, Frey D, Caroni P (2000)**. GAP43, MARCKS, CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell. Biol.* 149, 1455-472.
- 246) **Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL (2003)**. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell.* 112(5), 631-43.
- 247) **Lee L, Kesner RP (2002)**. Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat. Neurosci.* 5, 162-168.
- 248) **Lee LJ, Lo FS, Erzurumlu RS (2005a)**. NMDA receptor-dependent regulation of axonal and dendritic branching. *J. Neurosci.* 25, 2304-2311.
- 249) **Leshchyn'ska I, Sytnyk V, Morrow JS, Schachner M (2003)**. Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC β 2 via β I spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* 161, 625-639.
- 250) **Letinic K, Zoncu R, Rakic P (2002)**. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417, 645-649.
- 251) **Li M, Cui Z, Niu Y, Liu B, Fan W, Yu D, Deng J (2009)** Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex. *Brain Res. Bull.* 81(1), 107-13.
- 252) **Liebl DJ, Morris CJ, Henkemeyer M, Parada LF (2003)**. mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 71, 7-22.
- 253) **Lin SC, Bergles DE (2004)**. Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia* 47, 290-298.
- 254) **Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K (2005)**. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J. Neurosci. Res.* 79(3), 295-302.
- 255) **Lipp HP, Wolfer DP (1995)**. New paths towards old dreams: microphenology or the study of intact brains in intact worlds. In *Behavioural brain research in naturalistic and semi-naturalistic settings: possibilities and perspectives*. pp.1-39.
- 256) **Lipton SA, Rosenberg PA (1994)**. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 330, 613-622.
- 257) **Liu B, Liao M, Mielke JG, Ning K, Chen Y, Li L, El-Hayek YH, Gomez E, Zukin RS, Fehlings MG, Wan Q (2006)**. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J. Neurosci.* 26(20), 5309-5319.
- 258) **Liu Y, Zhang LI, Tao HW (2007)**. Heterosynaptic scaling of developing GABAergic synapses: Dependence on glutamatergic input and developmental stage. *J. Neurosci.* 27, 5301-5312.
- 259) **Lorente de No R (1934)**. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Y. Psychol. Neurol.* 46, 113-177.
- 260) **Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Bluethmann H, Mohler H, Rudolph U (2000)**. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290, 131-134.
- 261) **Lukas RJ, Bencherif M (2006)**. Recent developments in nicotinic acetylcholine receptor biology, in *Biological and Biophysical Aspects of Ligand-gated Ion Channel Receptor Superfamilies* (Arias HR eds) pp 2-33, Research Signpost, Kerala, India.
- 262) **Luo L (2002)**. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18, 601-35.
- 263) **Lüscher B, Keller CA (2004)**. Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol. Ther.* 102, 195-221.
- 264) **Maccaferri G, Roberts JDB, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P (2000)**. Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 524, 91-116.
- 265) **Maccioni RB, Cambiazo V (1995)**. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol. Rev.* 75, 835-864.
- 266) **Madden DR (2002)**. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 91-101.

- 267) **Magariños AM, McEwen BS, Saboureau M, Pevet P (2006)**. Rapid and reversible changes in intrahippocampal connectivity during the course of hibernation in European hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(49), 18775-80.
- 268) **Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000)**. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *J. Neuroscience.* 20(24), 9104-9110.
- 269) **Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TVP, Vanhose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM (2001)**. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104, 675-686.
- 270) **Maric D, Maric I, Ma W, Lahojuji F, Somogyi R, Wen X, Sieghart W, Fritschy JM, Barker JL (1997)**. Anatomical gradients in proliferation and differentiation of embryonic rat CNS accessed by buoyant density fractionation: alpha 3, beta 3 and gamma2 GABA_A receptor subunit co-expression by post-mitotic neocortical neurons correlates directly with cell buoyancy. *Eur. J. Neurosci.* 9(3), 507-22.
- 271) **Markus A, Patel TD, Snider WD (2002)**. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 523-531.
- 272) **Marrone DF, Petit TL (2002)**. The role of synaptic morphology in neural plasticity: structural interactions underlying synaptic power. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38(3), 291-308.
- 273) **Martin KC, Zukin RS (2006)**. RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J. Neurosci.* 26, 7131-7134.
- 274) **Martínez A, Soriano E (2005)**. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: Emphasis on the hippocampal system. *Brain Res. Rev.* 49, 211-226.
- 275) **Matsunaga W, Miyata S, Itoh M, Kiyohara T, Maekawa S (2002)**. Expression of high levels of tubulin and microtubule-associated protein 2d in the neurohypophysial astrocytes of adult rat. *Neuroscience* 111, 151-162.
- 276) **Mayer ML (2005)**. Glutamate receptor ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 282-288.
- 277) **McBain CJ (2008)**. Differential mechanisms of transmission and plasticity at mossy fiber synapses. *Prog. Brain Res.* 169, 225-240.
- 278) **McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ (2000)**. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat. Neurosci.* 3, 587-592.
- 279) **Medvedev NI, Rodríguez-Arellano JJ, Popov VI, Davies HA, Tigaret CM, Schoepfer R, Stewart MG (2008)**. The glutamate receptor 2 subunit controls post-synaptic density complexity and spine shape in the dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 27, 315-325.
- 280) **Mehta AK, Ticku MK (1999)**. An update on GABA_A receptors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2-3, 196-217.
- 281) **Meier J, Akyeli J, Kirischuk S, Grantyn R (2003)**. GABA(A) receptor activity and PKC control inhibitory synaptogenesis in CNS tissue slices. *Mol. Cell Neurosci.* 23(4), 600-13.
- 282) **Meldrum BS, Rogawski MA (2007)**. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurother.* 4(1), 18-61.
- 283) **Menzel P, Valencia F, Godement P, Dodelet VC, Pasquale EB (2001)**. Ephrin-A6, a new ligand for EphA receptors in the developing visual system. *Dev. Biol.* 230, 74-88.
- 284) **Mezzogiorno V, Esposito V, Papa M, Passiatore C, Valentino B (1999)**. Testo atlante di anatomia umana. Piccin (pag. 500-502).
- 285) **Miller R (1996)**. Neural assemblies and laminar interactions in the cerebral cortex. *Biol. Cybern.* 75(3), 253-61.
- 286) **Ming GL, Song H (2005)**. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 223-250.

- 287) **Mishra GR, Suresh M, Kumaran K, Kannabiran N, Suresh S, Bala P, Shivakumar K, Anuradha N, Reddy R, Raghavan TM, Menon S, Hanumanthu G, Gupta M, Upendran S, Gupta S, Mahesh M, Jacob B, Mathew P, Chatterjee P, Arun KS, Sharma S, Chandrika KN, Deshpande N, Palvankar K, Raghavnath R, Krishnakanth R, Karathia H, Rekha B, Nayak R, Vishnupriya G, Kumar HG, Nagini M, Kumar GS, Jose R, Deepthi P, Mohan SS, Gandhi TK, Harsha HC, Deshpande KS, Sarker M, Prasad TS, Pandey A (2006).** Human protein reference database. *Nucleic Acids Res.* 34, D411-4.
- 288) **Mody I, Nusser Z (2000).** Differential activation of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors. *Eur. J. Neurosci.* 12, 398.
- 289) **Mohler H (2007).** Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABA_A receptors. *J. Neurochem.* 102, 1-12.
- 290) **Möhler H (2006).** GABA_A receptor diversity and pharmacology. *Cell. Tissue Res.* 326, 505-516.
- 291) **Mokin M, Zheng Z, Keifer J (2007).** Conversion of silent synapses into the active pool by selective GluR1-3 and GluR4 AMPAR trafficking during in vitro classical conditioning. *J. Neurophysiol.* 98, 1278-1286.
- 292) **Montgomery JM, Pavlidis P, Madison DV (2001).** Pair recordings reveal all silent synaptic connections and the postsynaptic expression of long-term potentiation. *Neuron* 29, 691-701.
- 293) **Morelli S, Salerno S, Piscioneri A, Papenburg BJ, Di Vito A, Giusi G, Canonaco M, Stamatialis D, Drioli E, De Bartolo L (2010).** INFLUENCE OF MICROPATTERNED PLLA MEMBRANES ON THE ORIENTATION AND NEURITE OUTGROWTH OF HIPPOCAMPAL NEURONS. *Biomaterials* 31(22), 5827-5837.
- 294) **Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998).** Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green monitoring during amplification. *Biotechniques* 24(6), 954-958, 960, 962.
- 295) **Moulder KL, Jiang X, Taylor AA, Shin W, Gillis KD, Mennerick S (2007).** Vesicle pool heterogeneity at hippocampal glutamate and GABA synapses. *J. Neurosci.* 27, 9846-9854.
- 296) **Mtchedlishvili Z, Sun CS, Harrison MB, Kapur J (2003).** Increased neurosteroid sensitivity of hippocampal GABA_A receptors during postnatal development. *Neuroscience* 118(3), 655-66.
- 297) **Mundell SJ, Pula G, McIlhinney RA, Roberts PJ, Kelly E (2004).** Desensitization and internalization of metabotropic glutamate receptor 1a following activation of heterologous Gq/11-coupled receptors. *Biochemistry* 43, 7541-7551.
- 298) **Naber PA, Witter MP (1998).** Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a doublelabeling, retrograde-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 393, 284-297.
- 299) **Naber PA, Lopes da Silva FH, Witter MP (2001).** Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus* 11, 99-104.
- 300) **Nadarajah B, Parnavelas JG (2002).** Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 423-432.
- 301) **Naidich TP, Daniels DL, Haughton VH, Pech P, Williams A, Pojunas K, Palacios E (1987).** Hippocampal formation and related structures of the limbic lobe: anatomic-MR correlation. *Radiology* 162, 755-761.
- 302) **Nakamura M, Sekino Y, Manabe T (2007).** GABAergic interneurons facilitate mossy fiber excitability in the developing hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 1365-1373.
- 303) **Neal AP, Stansfield KH, Worley PF, Thompson RE, Guilarte TR (2010).** Lead exposure during synaptogenesis alters vesicular proteins and impairs vesicular release: potential role of NMDA receptor-dependent BDNF signaling. *Toxicol. Sci.* 116(1), 249-263.
- 304) **Nery S, Fishell G, Corbin JG (2002).** The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat. Neurosci.* 5, 1279-1287.

- 305) **Neve RL, Coopersmith R, McPhie DL, Santeufemio C, Pratt KG, Murphy CJ, Lynn SD (1998)**. The neuronal Growth-Associated Protein GAP-43 interacts with rabaptin-5 and participates in endocytosis. *J. Neurosci.* 18, 7757-7767.
- 306) **Nicodemo AA, Pampillo M, Ferreira LT, Dale LB, Cregan T, Ribeiro FM, Ferguson SSG (2010)**. Pyk2 uncouples metabotropic glutamate receptor G protein signaling but facilitates ERK1/2 activation. *Molecular Brain* (3:4), 1-17.
- 307) **Nutt DJ, Glue P, Lawson C (1990)**. The neurochemistry of anxiety: an update. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 14, 737-752.
- 308) **Nyiri G, Freund TF, Somogyi P (2001)**. Input-dependent synaptic targeting of $\alpha 2$ -subunit-containing GABA_A receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 13, 428-442.
- 309) **Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R (1994)**. Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, in rat cerebellar cortex. *Neuron* 13, 55-66.
- 310) **O'Keefe J, Nadel L (1978)**. *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press.
- 311) **Olsen RW, Sieghart W (2009)**. GABA_A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56, 141-148.
- 312) **Olsen RW, Avoli M (1997)**. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* 38, 399-407.
- 313) **Olsen RW, Homanics GE (2000)**. Function of GABA_A receptors: insights from mutant and knockout mice. In: **Martin D.L. & Olsen R.W.** (Eds.), *GABA in the Nervous System: the view at 50 years*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 81-96.
- 314) **Olsen RW, Sieghart W (2008)**. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid_A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update, *Pharmacol. Rev.* 60, 243-260.
- 315) **Olsson T, Wieloch T, Smith ML (2003)**. Brain damage in a mouse model of global cerebral ischemia. Effect of NMDA receptor blockade. *Brain Res.* 982, 260-269.
- 316) **Osborne PG, Hashimoto M (2003)**. State-dependent regulation of cortical blood flow and respiration in hamsters: Response to hypercapnia during arousal from hibernation. *J. Physiol.* 547, 963-970.
- 317) **Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998)**. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54, 581-618.
- 318) **Paoletti R, Nicosia S, Clementi F and Fumagalli G (2004)**. *Farmacologia generale e molecolare*. Terza edizione, UTET,
- 319) **Papathodoropoulos C, Moschovos C, Kostopoulos G (2002)**. Greater contribution of N-methyl-d-aspartic acid receptors in ventral compared to dorsal hippocampal slices in the expression and long-term maintenance of epileptiform activity. *Neuroscience* 135, 765-779.
- 320) **Papp EC, Hajos N, Acsady L, Freund TF (1999)**. Medial septal and median raphe innervations of vasoactive intestinal polypeptide-containing interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 90, 369.
- 321) **Passafaro M, Piech V, Sheng M (2001)**. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 917-926.
- 322) **Payne HL, Donoghue PS, Connelly WM, Hinterreiter S, Tiwari P, Ives JH, Hann V, Sieghart W, Lees G, Thompson CL (2006)**. Aberrant GABA(A) receptor expression in the dentate gyrus of the epileptic mutant mouse stargazer. *J. Neurosci.* 26(33), 8600-8.
- 323) **Peng Z, Hauer B, Mihalek RM, Homanics GE, Sieghart W, Olsen RW, Houser CR (2002)**. GABA_A receptor subunit changes in δ subunit-deficient mice: altered expression of $\alpha 4$ and $\gamma 2$ subunits in the forebrain. *J. Comp. Neurol.* 446, 179-197.
- 324) **Penttonen M, Kamondi A, Acsady L, Buzsaki G (1998)**. Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 10, 718.
- 325) **Penttonen M, Kamondi A, Sik A, Acsady L, Buzsaki G (1997)**. Feed-forward and feed-back activation of the dentate gyrus in vivo during dentate spikes and sharp wave bursts. *Hippocampus* 7, 437-450.

- 326) **Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Huganir RL (2003)**. Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37, 263-274.
- 327) **Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000)**. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815-850.
- 328) **Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O, Lowenstein DH, Rubenstein JL (2000)**. Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* 28, 727-740.
- 329) **Poleszak E (2008)**. Benzodiazepine/GABAA receptors are involved in magnesium-induced anxiolytic-like behavior in mice. *Pharmacol. Rep.* 60, 483-489.
- 330) **Polti A, Hauer B, Fuchs K, Tretter V, Sieghart W (2003)**. Subunit composition and quantitative importance of GABA_A receptor subtypes in the cerebellum of mouse and rat. *J. Neurochem.* 87, 1444-1455.
- 331) **Pratt JA (1992)**. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmac. Ther.* 55, 149-181.
- 332) **Punnoose A, Miskevich F, Townsend M, Constantine-Paton M (2004)**. The Effects of NMDA Receptor Activation on Synaptogenesis. *Reports & Proposals.* 10, 48-51.
- 333) **Quilichini PP, Chiron C, Ben-Ari Y, Gozlan H (2006)**. Stiripentol, a putative antiepileptic drug, enhances the duration of opening of GABA-A receptor channels. *Epilepsia* 47(4), 704-16.
- 334) **Ramadan E, Fu Z, Losi G, Homanics GE, Neale JH, Vicini S (2003)**. GABA_A receptor β 3 subunit deletion decreases α 2/3 subunits and IPSC duration. *J. Neurophysiol.* 89, 128-134.
- 335) **Rami A (2003)**. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiol. Dis.* 13, 75-88.
- 336) **Redmond L, Kashani AH, Ghosh A (2002)**. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34, 999-1010.
- 337) **Remondes M, Schuman EM (2004)**. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature* 431(7009), 699-703.
- 338) **Rensing L, Koch M, Becker A (2009)**. A comparative approach to the principal mechanisms of different memory systems. *Naturwissenschaften* 96(12), 1373-84.
- 339) **Rensing L (2009)**. A comparative approach to the principal mechanisms of different memory systems. *Nature wissenschaften* 96, 1373-1384.
- 340) **Represa A, Ben-Ari Y (2005)**. Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci.* 28, 278-283.
- 341) **Rex CS, Lin CY, Kramár EA, Chen LY, Gall CM, Lynch G (2007)**. Brain derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 3017-3029.
- 342) **Ribeiro FM, Ferreira LT, Paquet M, Cregan T, Ding Q, Gros R, Ferguson SSG (2009)**. Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 5 desensitization and internalization by G protein-coupled receptor kinase 2 in striatal neurons. *J. Biol. Chem.* 284, 23444-23453.
- 343) **Riederer BM (2007)**. Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res. Bull.* 71, 541-558.
- 344) **Riss JR, Cloyd JC, Gates J, Collins SD (2008)**. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurol. Scand.* 118, 68-86.
- 345) **Rivera C, Voipio J, Kaila K (2005)**. Two developmental switches in GABAergic signalling, the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J. Physiol.* 562(Pt 1), 27-36.
- 346) **Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori F, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999)**. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255.
- 347) **Romo-Parra H, Trevino M, Heinemann U, Gutierrez R (2008)**. GABA actions in hippocampal area CA3 during postnatal development: differential shift from depolarizing to hyperpolarizing in somatic and dendritic compartments. *J. Neurophysiol.* 99, 1523-1534.

- 348) **Rudolph U, Mohler H (2004)**. Analysis of GABA_A receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 475-498.
- 349) **Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Mohler H (1999)**. Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Nature* 401, 796–800.
- 350) **Ruiz A, Fabian-Fine R, Scott R, Walker MC, Rusakov DA, Kullman DM (2003)**. GABA_A receptors at hippocampal mossy fibers. *Neurosci.* 39, 961-973.
- 351) **Russek SJ (1999)**. Evolution of GABA_A receptor diversity in the human genome. *Gene* 227, 213-222.
- 352) **Rutten BP, Van der Kolk NM, Schafer S, van Zandvoort MA, Bayer TA, Steinbusch HW, Schmitz C (2005)**. Age-related loss of synaptophysin immunoreactive presynaptic boutons within the hippocampus of APP751SL, PS1M146L, and APP751SL/PS1M146L transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 167, 161-173.
- 353) **Ryan TJ, Emes RD, Grant SGN, Komiyama NH (2008)**. Evolution of NMDA receptor cytoplasmic interaction domains: implications for organisation of synaptic signalling complexes. *BMC Neuroscience* 9:6.
- 354) **Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H (1995)**. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373, 151-155.
- 355) **Salzman C (1999)**. An 87-year-old woman taking a benzodiazepine. *JAMA* 281, 1121-5.
- 356) **Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J (2000)**. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.* 61(2), 133-168.
- 357) **Sanchez-Pulido L, Martin-Belmonte F, Valencia A, Alonso MA (2002)**. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem. Sci.* 27, 599-601.
- 358) **Sarantis K, Sotiriou E, Papatheodoropoulos C, Matsokis N, Angelatou F (2008)**. Differential pharmacological properties of GABA_A/benzodiazepine receptor complex in dorsal compared to ventral rat hippocampus. *Neurochem. Int.* 52, 1019-1029.
- 359) **Sassoe-Pognetto M., Fritschy JM (2000)**. Gephyrin, a major postsynaptic protein of GABAergic synapses. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2205-2210.
- 360) **Saxe MD (2006)**. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl Acad. Sci.* 103, 17-501,17- 506.
- 361) **Schenk U, Verderio C, Benfenati F, Matteoli M (2003)**. Regulated delivery of AMPA receptor subunits to the presynaptic membrane. *EMBO J.* 22, 558-568.
- 362) **Schlesinger F, Meywirth J, Krampfl K, Grosskreutz J, Petri S, Mauth C, Just L, Bader A, Bufler J (2004)**. Ligand-gated channels in early mesencephalic neuronal precursors: immunocytochemical and electrophysiological analysis. *Eur. J. Neurosci.* 19 (9), 2371-6.
- 363) **Schuman EM, Dynes JL, Steward O (2006)**. Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *J Neurosci.* 26, 7143-7146.
- 364) **Serafini R, Ma W, Maric D, Maric I, Lahjouji F, Sieghart W, Barker JL (1998)**, Initially expressed early rat embryonic GABA(A) receptor Cl⁻ ion channels exhibit heterogeneous channel properties. *Eur. J. Neurosci.* 10(5), 1771-83.
- 365) **Sernagor E, Chabrol F, Bony G, Cancedda L (2010)**. GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Frontiers in Cellular Neuroscience* , 11
- 366) **Serwanski DR, Miralles CP, Christie SB, Mehta AK, Li X, De Blas AL (2006)**. Synaptic and nonsynaptic localization of GABA_A receptors containing the alpha5 subunit in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 499, 458-470.
- 367) **Shamah SM, Lin MZ, Goldberg JL, Estrach S, Sahin M, Hu L, Bazalakova M, Neve RL, Corfas G, Debant A, Greenberg ME (2001)**. EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105, 233-244.

- 368) **Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R (2001)**. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell*. 105, 331–343.
- 369) **Shijie J, Takeuchi H, Yawata I, Harada Y, Sonobe Y, Doi Y, Liang J, Hua L, Yasuoka S, Zhou Y, Noda M, Kawanokuchi J, Mizuno T, Suzumura A (2009)**. Blockade of glutamate release from microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Tohoku J. Exp. Med.* 217, 87-92.
- 370) **Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001)**. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372-376.
- 371) **Shoukimas GM, Hinds JW (1978)**. The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: An electron microscopic serial section analysis. *J. Comp. Neurol.* 179, 795-830.
- 372) **Sieghart W, Sperk G (2002)**. Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 795-816.
- 373) **Sieghart W (1995)**. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid- receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* 47, 181-234.
- 374) **Sik A, Smith RL, Freund TF (2000)**. Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience* 101 (1), 51-65.
- 375) **Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA (2004)**. Analysis of the set of GABAA receptor genes in the human genome. *J. Biol. Chem.* 279, 41422-41435.
- 376) **Sine S, Engel A (2006)**. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440, 448-455.
- 377) **Skolnick P, Hu RJ, Cook CM, Hurt SD, Trometer JD, Liu R, Huang Q, Cook JM (1997)**. [3H]RY 80: A high-affinity, selective ligand for γ -aminobutyric acid A receptors containing alpha-5 subunits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 488-493.
- 378) **Smith WB, Starck SR, Roberts RW, Schuman EM (2005)**. Dopaminergic stimulation of local protein synthesis enhances surface expression of GluR1 and synaptic transmission in hippocampal neurons. *Neuron* 45, 765-779.
- 379) **Soltani MH, Pichardo R, Song Z, Sangha N, Camacho F, Satyamoorthy K, Sanguenza OP, Setaluri V (2005)** Microtubule-associated protein 2, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. *Am. J. Pathol.* 166(6), 1841-50.
- 380) **Somogyi P, Klausberger T (2005)**. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol.* 562, 9-26.
- 381) **Soriano E, Cobas A, Fairen A (1989a)**. Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. I. Regio superior and regio inferior. *J. Comp. Neurol.* 281, 586-602.
- 382) **Soriano E, Cobas A, Fairen A (1989b)**. Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. II. Area dentata. *J. Comp. Neurol.* 281, 603-611.
- 383) **Soroka V, Kolkova K, Kastrup JS, Diederichs K, Breed J, Kiselyov VV, Poulsen FM, Larsen IK, Welte W, Berezin V (2003)**. Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure* 11, 1291-1301.
- 384) **Sotiriou E, Papatheodoropoulos C, Angelatou F (2005)**. Differential expression of γ -aminobutyric acid-a receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 82, 690-700.
- 385) **Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Fuchs K, Sieghart W (1997)**. GABA_A-receptor subunits in the rat hippocampus. Immunocytochemical distribution of thirteen subunits. *Neuroscience* 80, 987-1000.
- 386) **Sporns O, Tononi G (2007)**. In *Handbook of Brain Connectivity* (eds Jirsa, V. K. & McIntosh, A. R.) 117-147 (Springer, Berlin).
- 387) **Spreafico R, Frassoni C, Arcelli P, Battaglia G, Wenthold RJ, De Biasi S (1994)**. Distribution of AMPA selective glutamate receptors in the thalamus of adult rats and during postnatal development. A light and ultrastructural immunocytochemical study. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 82, 231-244.

- 388) **Spruston N, McBain CJ (2006)**. Structural and functional properties of hippocampal neurons. In: Andersen, P.; Morris, R.; Amaral, D.; Bliss, T.; O'Keefe, J., editors. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- 389) **Stanic D, Brumovsky P, Fetissov S, Shuster S, Herzog H, Hökfelt T (2006)**. Characterization of neuropeptide Y2 receptor protein expression in the mouse brain. I. Distribution in cell bodies and nerve terminals. *J. Comp. Neurol.* 499, 357-390.
- 390) **Steiger JL, Russek SJ (2004)**. GABA_A receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. *Pharmacol. Ther.* 101, 259-281.
- 391) **Stein E, Savaskan NE, Ninnemann O, Nitsch R, Zhou R, Skutella T (1999)**. A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting. *J. Neurosci.* 19, 8885-8893.
- 392) **Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Jentsch TJ, Hubner CA (2004)**. Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J. Comp. Neurol.* 468(1), 57-64.
- 393) **Stoppelkamp S, Riedel G, Platt B (2010)**. Culturing conditions determine neuronal and glial excitability. *J. Neurosci. Methods*, doi:10.1016/j.jneumeth.2010.10.008.
- 394) **Swanwick CC, Murthy NR, Mtchedlishvili Z, Sieghart W, Kapur J (2006)**. Development of γ -aminobutyric acidergic synapses in cultured hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.* 495, 497-510.
- 395) **Szabadics J, Varga C, Molnar G, Olah S, Barzo P, Tamasa G (2006)**. Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311, 233-235.
- 396) **Takemura M, Mishima T, Wang Y, Kasahara J, Fukunaga K, Ohashi K, Mizuno K (2009)**. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-mediated LIM kinase activation is critical for calcium signal-induced neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 284, 28554-28562.
- 397) **Talos DM, Follett PL, Folkerth RD, Fishman RE, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Jensen FE (2006)**. Developmental regulation of amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury II. Human cerebral white matter and cortex. *J. Comp. Neurol.* 497, 61-77.
- 398) **Tan S, Schubert D, Maher P (2001)**. Oxytosis: a novel form of programmed cell death. *Curr. Top Med. Chem.* 1, 497-506.
- 399) **Tanabe Y, Nomura A, Masu M (1993)**. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* 13, 1372-1378.
- 400) **Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R, Sugimura H (2004)**. Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *Embo J* 23, 1075-1088.
- 401) **Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S (2007)**. Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR. *J. Mol. Neurosci.* 32(1), 38-46.
- 402) **Ten S, New M, Maclaren N (2001)**. Clinical review 130: Addison's disease 2001. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(7), 2909-2922.
- 403) **Thompson AJ, Lummis SCR (2006)**. 5-HT₃ receptors. *Curr. Pharm. Des.* 12, 3615-3630.
- 404) **Thomson AM, Bannister AP, Hughes DI, and Pawelzik H (2000)**. Differential sensitivity to Zolpidem of IPSPs activated by morphologically identified CA1 interneurons in slices of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 12, 425-436.
- 405) **Thuault SJ, Brown JT, Sheardown SA, Jourdain S, Fairfax B, Spencer JP, Restituto S, Nation JH, Topps S, Medhurst AD, Randall AD, Couve A, Moss SJ, Collingridge GL, Pangalos MN, Davies CH, Calver AR (2004)**. The GABA(B) subunit is critical for the trafficking and function of native GABA(B) receptors. *Biochem. Pharmacol.* 68(8), 1655-66.
- 406) **Tietz EI, Kapur J, Macdonald RL (1999)**. Functional GABA_A receptor heterogeneity of acutely dissociated hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 81(4), 1575-1586.

- 407) **Toth K, Soares G, Lawrence JJ, Philips-Tansey E, McBain CJ (2000)**. Differential mechanisms of transmission at three types of mossy fiber synapse. *J. Neurosci.* 20(22), 8279-8289.
- 408) **Tozzi A, Guatteo E, Caputi L, Bernardi G, Mercuri NB (2001)**. Group I mGluRs coupled to G proteins are regulated by tyrosine kinase in dopamine neurons of the rat midbrain. *J. Neurophysiol.* 85, 2490-2497.
- 409) **Tretter V, Jacob TC, Mukherjee J, Fritschy JM, Pangalos MN, Moss SJ. (2008)**. The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* 28:1356-1365.
- 410) **Trigo FF, Marty A, Stell BM (2008)**. Axonal GABA_A receptors. *Eur. J. of Neurosci.* 28, 841-848.
- 411) **Tyzio R, Minlebaev M, Rheims S, Ivanov A, Jorquera I, Holmes GL, Zilberter Y, Ben-Ari Y, Khazipov R (2008)**. Postnatal changes in somatic gamma-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 27(10), 2515-28.
- 412) **Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Gozlan H, Aniksztejn L (1999)**. The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J. Neurosci.* 19, 10372-10382.
- 413) **Uesaka N, Hirai S, Maruyama T, Ruthazer ES, Yamamoto N (2005)**. Activity dependence of cortical axon branch formation: a morphological and electrophysiological study using organotypic slice cultures. *J. Neurosci.* 25, 1-9.
- 414) **van Groen T, Miettinen P, Kadish I (2003)**. The entorhinal cortex of the mouse: Organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* 13, 133-149.
- 415) **Van Haeften T, Wouterlood FG, Witter MP (2000)**. Presubicular input to the dendrites of layer-V entorhinal neurons in the rat. *Ann. NY Acad. Sci.* 911, 471-473.
- 416) **Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999)**. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266-270.
- 417) **van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP (2009)**. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Neurosci.* 10, 272-282.
- 418) **Viberg H (2009)**. Neonatal ontogeny and neurotoxic effect of decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) on levels of synaptophysin and tau. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27(5), 423-9.
- 419) **Vida I, Halasy K, Szinyei C, Somogyi P, Buhl EH (1998)**. Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus *in vitro*. *J. Physiol.* 506, 755-773.
- 420) **Vignes M, Collingridge GL (1997)**. The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388, 179-182.
- 421) **Virkki LV, Choi I, Davis BA, Boron WF (2003)**. Cloning of a Na⁺-driven Cl/HCO₃ exchanger from squid giant fiber lobe. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285(4), C771-80.
- 422) **Voigt T, Opitz T, Dolabela de Lima A (2005)**. Activation of Early Silent Synapses by Spontaneous Synchronous Network Activity Limits the Range of Neocortical Connections. *J. Neurosci.* 25(18), 4605-4615.
- 423) **Wafford KA, Macaulay AJ, Fradley R, O'Meara GF, Reynolds DS, Rosahl TW (2004)**. Differentiating the role of gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor subtypes. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 553-556.
- 424) **Walmod PS, Kolkova K, Berezin Vand, Bock E (2004)**. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem. Res.* 29, 2015-2035.
- 425) **Walther C (2002)**. Hippocampal terminology: concepts, misconceptions origins. *Endeavour* 26, 41-44.
- 426) **Wang DD, Kriegstein AR (2008)**. GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 28(21), 5547-58.
- 427) **Wang SW, Gan L, Martin SE, Klein WH (2000)**. Abnormal polarization and axon outgrowth in retinal ganglion cells lacking the POU domain transcription factor Brn-3b. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 141-156.

- 428) **Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J (2006)**. The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. *Br. J. Pharmacol.* 38(1), 101-21.
- 429) **Wayman GA, Kaech S, Grant WF, Davare M, Impey S, Tokumitsu H, Nozaki N, Banker G, Soderling TR (2004)**. Regulation of axonal extension and growth cone motility by calmodulin-dependent protein kinase I. *J. Neurosci.* 24, 3786-3794.
- 430) **Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I (2003)**. Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 23, 10650-10661.
- 431) **Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001)**. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128, 3759-3771.
- 432) **Wiltgen BJ, Brown RA, Talton LE, Silva AJ (2004)**. New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron* 44(1), 101-8.
- 433) **Wittenberg GM, Tsien JZ (2002)**. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *Trend neurosci.* 25(10), 501-5.
- 434) **Witter MP, Amaral DG (2004)**. In *The Rat Nervous System* 3rd edn (ed. Paxinos, G.) 637-703 (Elsevier Academic Press, San Diego).
- 435) **Wittner L, Henze DA, Zaborszky L, Buzsaki G (2007)**. Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled *in vivo*. *Brain Struct. funct.* 212, 75-83.
- 436) **Wojtowicz JM, Askew ML, Winocur G (2008)**. The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1494-1502.
- 437) **Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW (2001)**. Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nature Neurosci.* 4, 151-8.
- 438) **Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002)**. Mediation of poly(ADPribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-63.
- 439) **Yu ZY, Wang W, Fritschy JM, Witte OW, Redecker C (2006)**. Changes in neocortical and hippocampal GABAA receptor subunit distribution during brain maturation and aging. *Brain Res.* 1099, 73-81.
- 440) **Yun K, Potter S, Rubenstein JL (2001)**. Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128, 193-205.
- 441) **Yun ME, Johnson RR, Antic A, Donoghue MJ (2003)**. EphA family gene expression in the developing mouse neocortex: regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *J. Comp. Neurol.* 456, 203-216.
- 442) **Yuste R (2005)**. Origin and classification of neocortical interneurons. *Neuron* 48, 524-527.
- 443) **Zablocka A, Janusz M (2008)**. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 62, 118-124.
- 444) **Zapatero-Caballero H, Sanchez-Franco F, Guerra-Perez N, Fernandez-Mendez C, Fernandez-Vazquez G (2003)**. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of male rats. *Biol. Reprod.* 68(5), 1764-70.
- 445) **Zhang X, Chen J, Graham SH, Du L, Kochanek PM, Draviam R, Guo F, Nathaniel PD, Szabo C, Watkins SC, Clark R (2002)**. Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J. Neurochem.* 82, 181-91.
- 446) **Zhang YM, Bhavnani BR (2005)**. Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release. *BMC Neurosci.* 6, 13.
- 447) **Zhang YM, Lu XF, Bhavnani BR (2003)**. Equine estrogens differentially inhibit DNA fragmentation induced by glutamate in neuronal cells by modulation of regulatory proteins involved in programmed cell death. *BMC Neurosci.* 4,32.
- 448) **Ziff EB (2007)**. TARPs and the AMPA receptor trafficking paradox. *Neuron.* 53, 627-633.

“Questa notte ho fatto un sogno:

*Ho sognato che ho camminato sulla sabbia
accompagnato dal Signore e sullo schermo della
notte erano proiettati tutti i giorni della mia vita.
Ho guardato indietro e ho visto che ad ogni giorno
della mia vita proiettato nel film apparivano orme
sulla sabbia: una mia e una del Signore.*

*Così sono andato avanti, finché tutti i miei giorni si
esaurirono. Allora mi fermai guardando indietro,
notando che in certi posti c'era solo un'orma....*

*Questi posti coincidevano con i giorni più difficili
della mia vita: i giorni di maggiore angustia, di
maggiore paura e di maggiore dolore....*

*Ho domandato allora: Signore, Tu avevi detto che
saresti stato con me in tutti i giorni della mia vita,
ed io ho accettato di vivere con Te, ma perché mi
hai lasciato solo proprio nei momenti peggiori della
mia vita?*

*Ed il Signore mi ha risposto: Figlio mio, io ti amo e
ti dissi che sarei stato con te durante tutta la
camminata e che non ti avrei lasciato solo neppure
per un attimo, ebbene non ti ho lasciato.....*

*I giorni in cui tu hai visto solo un'orma sulla
sabbia, sono stati i giorni in cui io ti ho portato in
braccio.”*