

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

TESI DI DOTTORATO IN BIOLOGIA APPLICATA
XXI CICLO

SINTESI LOCALE DI UNA PROTEINA SINAPTICA INDOTTA DALL'
APPRENDIMENTO

Tutore
Dott.ssa Marianna Crispino

Candidata
Dott.ssa Anna Paola Bruno

Coordinatore
Prof. Amalia Virzo De Santo

Triennio 2005-2008

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Plasticità neuronale.....	3
1.2 Sintesi proteica locale.....	4
1.2.1 Sintesi proteica assonale.....	6
1.2.2 Sintesi proteica al terminale presinaptico: sinaptosomi di cervello di ratto.....	7
1.2.3 Trasferimento degli RNA assonali e presinaptici dalla glia periassonale e perisinaptica.....	9
1.3 Apprendimento associativo.....	10
2.SCOPO DEL LAVORO	10
3.MATERIALI E METODI	11
3.1 Animali.....	11
3.2Familiarizzazione.....	11
3.3 Test di evitamento attivo a due vie.....	11
3.4 Frazionamento subcellulare.....	12
3.5 Incorporazione di [³⁵ S]metionina nelle proteine sinaptosomali.....	13
3.6 Analisi elettroforetica delle proteine sinaptosomali neosintetizzate.....	14
3.7 Western blot.....	14
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	15
4.1 Effetto della familiarizzazione.....	15
4.1.1 Confronto dei profili elettroforetici.....	17
4.2 Effetti indotti da durate minori di addestramento.....	17
4.3 Proteina BAG 3.....	19
5. CONCLUSIONI	19
Figure.....	21
Bibliografia	36
Comunicazioni a congressi e pubblicazioni	39

1. INTRODUZIONE

Secondo la teoria darwiniana l'evoluzione dei sistemi viventi si basa su tre principali fattori: l'ereditarietà, la variabilità del materiale genetico e la selezione degli organismi in dipendenza della loro fitness. Con le scoperte di Mendel si giunge alla cosiddetta sintesi moderna secondo cui gli effetti della selezione naturale si riflettono sulle frequenze genetiche delle popolazioni, responsabili dei tratti fenotipici. Una volta che il genoma ha definito forma e funzione, saranno poi i fattori ambientali a stabilire se il grado di adattabilità di quella struttura vivente è sufficiente a garantirne la sopravvivenza.

Se tale meccanismo può valere per caratteri in cui il determinismo ereditario ha assoluta prevalenza su qualsiasi intromissione ambientale, è anche vero che molti geni possono essere modulati dall'ambiente sia interno che esterno all'organismo. Ne sono esempi la penetranza e l'espressività dei geni. D'altra parte, l'estensione della variazione fenotipica (la norma di reazione) è nulla o estremamente piccola per alcuni genotipi. Di conseguenza, il fenotipo prodotto da un certo genotipo rimane lo stesso in ambienti differenti, ma in altri casi esso varia moltissimo.

I caratteri comportamentali dell'uomo e delle altre specie animali sono un valido esempio della stretta interazione fra genotipo ed ambiente, forse più di ogni altro carattere. Ma è proprio la reciprocità di tale interazione che determina spesso la difficoltà di tali indagini. Il sistema nervoso centrale (SNC) che presiede a tali comportamenti mostra infatti estrema plasticità nei riguardi delle sollecitazioni ambientali. In effetti, il programma genetico che sovrintende allo sviluppo del sistema nervoso crea un'infrastruttura di base necessaria, ma non determinante per il riconoscimento e la selezione degli stimoli rilevanti e per la generazione dei meccanismi cellulari e molecolari che regolano le modificazioni plastiche. Queste ultime sono alla base dei processi di apprendimento e memoria il cui studio, soprattutto in quest'ultimo ventennio, è stato volto all'analisi dei loro correlati molecolari.

1.1 PLASTICITA' NEURONALE

Durante lo sviluppo embrionale, dopo un periodo d'intensa proliferazione, le cellule nervose emettono prolungamenti (assoni) che migrano verso specifiche regioni cerebrali dove entrano in contatto con altre cellule nervose. A questo punto l'attività elettrica, sia intrinseca sia guidata da stimoli ambientali, diventa essenziale per il rafforzamento di alcune connessioni piuttosto che di altre, e quindi per la costruzione dell'architettura fine che consente al cervello le più sofisticate prestazioni. Questa sorprendente capacità di crescita e modellamento delle connessioni tipica dello sviluppo (Shatz, 1990), ma persistente anche nell'adulto (Gilbert and Wiesel, 1992), viene definita plasticità neuronale.

Essa consiste in modificazioni funzionali e strutturali alla base dei processi di apprendimento e memoria, sia motoria che cognitiva, e quindi dell'adattamento

dell'organismo alle condizioni ambientali. In condizioni fisiologiche, la plasticità neuronale dell'adulto riguarda soprattutto le sinapsi. E' in queste strutture che l'esperienza induce un rafforzamento o un indebolimento dell'efficacia di trasmissione dell'impulso nervoso. Si tratta di modificazioni di durata variabile da pochi millisecondi a mesi. Da un punto di vista strutturale le sinapsi, specialmente quelle che si formano sulle spine dendritiche, possono aumentare o diminuire la loro superficie oppure variare di numero. Studi ultrastrutturali hanno infatti rivelato tracce di profondi rimaneggiamenti delle reti neuronali indotti da eventi plastici: cambiamenti di forma e dimensione delle sinapsi, aumento delle superfici di contatto fra elementi pre- e postsinaptici, trasformazione di sinapsi silenti in sinapsi attive e crescita di nuove sinapsi.

1.2 SINTESI PROTEICA LOCALE

Da quanto si è detto, risulta che nel SNC la riorganizzazione dei circuiti neuronali alla base dei fenomeni plastici a lungo termine riguarda principalmente le modificazioni dell'efficacia sinaptica e i cambiamenti morfologici delle connessioni sinaptiche. Tali modifiche implicano attivazione genica e variazioni del corredo proteico sia presinaptico che postsinaptico, ossia sintesi di RNA e proteine. (Montarolo et al., 1986; Otani et al., 1989). Data la presunta incapacità biosintetica della periferia neuronale, l'esigenza di un apporto trofico da parte del corpo cellulare indusse a postulare l'esistenza di un meccanismo di trasporto (flusso assoplasmatico), inizialmente evidenziato da Weiss e collaboratori. Questo gruppo, utilizzando tecniche di compressione dei nervi periferici, dimostrò l'esistenza di un flusso in direzione distale di organelli e componenti assoplasmatici (Weiss e Hiscoe, 1948). Da allora altri ricercatori hanno contribuito a chiarire il significato funzionale e le modalità di questo sistema di trasporto (Grafstein e Forman, 1980; Brady, 1991). E' attualmente accettato che il flusso in direzione distale (anterograde) comprende una componente rapida (100-400 mm/giorno) responsabile del trasporto di organelli, e una componente lenta (1-10 mm/giorno) mediante la quale l'assone viene rifornito di proteine prevalentemente del citoscheletro. Il sistema di scambi tra periferia sinaptica e pericario neuronale si completa con il flusso assoplasmatico retrogrado che procede in direzione opposta alla velocità di 100-200 mm/giorno.

Tuttavia, l'ipotesi che le proteine dell'assone e delle terminazioni nervose siano tutte prodotte nel soma e trasferite alla periferia neuronale con il flusso assoplasmatico lascia alcune questioni irrisolte. In primo luogo, è difficile comprendere come il flusso lento possa rifornire i distretti periferici di assoni che si estendono per lunghezze considerevoli (Fig. 1), dal momento che la vita media delle proteine è di gran lunga inferiore (pochi giorni per le proteine del citoscheletro) rispetto ai tempi di trasporto assonali (Nixon, 1980; Alvarez e Torres, 1985). Inoltre, l'estremità distale dell'assone è spesso riccamente arborizzata, e le sinapsi che ne fanno parte sono in grado di modulare la loro attività in maniera indipendente.

Risulta, quindi, difficile spiegare in che modo il flusso assoplasmatico possa determinare uno smistamento selettivo delle proteine sintetizzate nel soma ed inviate alle terminazioni nervose che ne fanno richiesta.

Altri punti poco chiari riguardano l'incompatibilità tra la rapidità delle modificazioni plastiche delle terminazioni nervose e i tempi lunghi di trasporto delle proteine che si muovono con il flusso assoplasmatico lento, nonché l'assenza di relazioni tra le dimensioni del corpo cellulare e del compartimento assonale (von Bernhardi e Alvarez 1989). In alcuni casi infatti il rapporto fra la massa dell'assone e quella del corpo cellulare raggiunge valori di oltre il 99%. Appare, dunque, altamente improbabile che il flusso assoplasmatico possa garantire da solo il mantenimento e la plasticità della periferia neuronale. D'altra parte, queste obiezioni verrebbero facilmente risolte se si ammettesse l'esistenza di un sistema di sintesi proteica locale in grado di contribuire al mantenimento delle regioni distali del neurone ed alle variazioni plastiche degli assoni e delle terminazioni nervose.

Mentre la presenza di un sistema di sintesi proteica nel compartimento dendritico è da tempo riconosciuta (Rao and Steward, 1991), solo di recente l'esistenza di un analogo processo è stato accettato nei riguardi della periferia assonale sulla base della convincente evidenza a favore dell'esistenza di un sistema di sintesi proteica assonale e presinaptica (Giuditta et al, 2008).

1.2.1 SINTESI PROTEICA ASSONALE

Nel disegno degli esperimenti sulla sintesi proteica assonale, una delle principali difficoltà sperimentali ha riguardato la necessità di distinguerla dall'analogo sistema presente nella glia periassonale, di cui è ben nota la stretta associazione anatomica con l'assone. Questo problema è stato risolto mediante l'utilizzo di sistemi assonali di notevoli dimensioni, quali l'assone gigante di calamaro e l'assone di Mauthner del pesce rosso. Questi preparati consentono infatti la separazione del comparto assonale da quello gliale.

In assoni giganti del calamaro *Loligo pealii* e *Loligo vulgaris*, l'incorporazione di amminoacidi radioattivi nelle proteine assonali è stata dimostrata in condizioni che escludevano il contributo dei corpi neuronali. Infatti, in assoni separati dal corpo cellulare, e immersi in acqua di mare contenente amminoacidi radioattivi, tali precursori venivano incorporati in proteine dell'assoplasma (Giuditta et al., 1968). Questi esperimenti non consentivano tuttavia di stabilire se tale processo fosse localizzato nell'assone o nelle cellule gliali periassonali. L'ipotesi di un trasferimento all'assone delle proteine sintetizzate nella glia periassonale fu proposta per la prima volta da Lasek e collaboratori (1974). Essa sembrava confermata da un esperimento di perfusione dell'assone gigante nel quale proteine di nuova sintesi comparivano nel perfusato anche in presenza di RNAsi aggiunta al liquido di perfusione (Gainer et al., 1977).

Una delle principali ragioni per cui gli assoni maturi erano ritenuti incapaci di sintetizzare proteine, diversamente da quelli in via di sviluppo (Tennyson, 1972), e dei neuriti di cellule in coltura (Bunge, 1973), era basata sull'apparente mancanza di ribosomi in preparati assonali osservati con tecniche di microscopia elettronica di tipo convenzionale (Peters et al., 1970). L'utilizzo di tecniche selettive di microscopia elettronica (ESI, electron spectroscopic imaging) ha tuttavia consentito di identificare polisomi nello strato corticale e nella porzione centrale dell'assone gigante di calamaro (Giuditta et al., 1991), nell'assone di Mauthner del pesce rosso (Koenig and Martin, 1996) e nella zona più esterna di assoni di mammifero (placche periassoplasmatiche) (Koenig et al., 2000).

L'assoplasma dell'assone gigante del calamaro contiene inoltre tutti i fattori solubili necessari per la sintesi proteica, compresi i fattori di trascrizione (Giuditta et al., 1977), tutte le specie di tRNA e delle corrispondenti aminoacil-tRNA sintetasi (Lasek et al, 1973), e una popolazione eterogenea di mRNA che codificano almeno 100-200 proteine (Giuditta et al., 1986; Perrone Capano et al., 1987). La clonazione di questi mRNA ha consentito di stabilire che essi specificano la sintesi di proteine del citoscheletro come β -actina e β -tubulina (Kaplan et al., 1992), chinesina (Gioio et al., 1994), e proteine del neurofilamento (Giuditta et al., 1991). Infine, polisomi associati a catene peptidiche nascenti sono stati individuati nelle regioni distali dell'assone gigante di calamaro (Giuditta et al., 1991).

Queste ultime osservazioni hanno permesso di stabilire in maniera inequivocabile la presenza di un sistema di sintesi proteica locale nell'assone gigante del calamaro. Dati analoghi sulla presenza di mRNA assonali che codificano per diversi tipi di proteine sono stati ottenuti anche in assoni di altre specie. In assoni localizzati nel tratto posteriore della neuroipofisi del ratto sono presenti mRNA che codificano per l'ossitocina (Jirikowsky, 1990), neuropeptidi, vasopressina (Trembleau et al., 1996), e per il neurofilamento leggero (Mohr and Richter, 1992). La presenza di questi messaggeri nell'assone lascia supporre che essi siano coinvolti in processi locali di traduzione, come si è dimostrato in neuroni di *Lymnea stagnalis* in coltura (van Minnen et al., 1997). Nel loro complesso, questi dati provano l'esistenza nel compartimento assonale di un sistema locale di sintesi proteica di tipo eucariotico. Tale conclusione ha suggerito la possibilità che un sistema simile potesse essere presente anche nelle terminazioni nervose.

1.2.2 SINTESI PROTEICA AL TERMINALE PRESINAPTICO: SINAPTOSOMI DI CERVELLO DI RATTO

I sinaptosomi sono strutture subcellulari (organelli vescicolari) che si formano durante l'omogenizzazione del tessuto cerebrale per fusione delle membrane plasmatiche delle terminazioni nervose presinaptiche, oltre che da processi dendritici e di cellule gliali (Rao e Steward, 1991). Inizialmente definiti come organelli non mitocondriali nella frazione mitocondriale del cervello di ratto (Petrushka e Giuditta, 1959), i sinaptosomi furono poi identificati come terminazioni nervose per la presenza di mitocondri e vescicole sinaptiche intraterminali (De Robertis et al., 1961). Grazie alla loro diversa forma, dimensione e densità rispetto agli altri organuli subcellulari, i sinaptosomi possono essere separati per centrifugazione differenziale dell'omogenato e successiva purificazione su gradiente discontinuo di Ficoll (Whittaker e Greengard, 1971). C'è da sottolineare che essi contengono tutti i componenti citoplasmatici presenti in vivo. Osservazioni al microscopio elettronico, hanno evidenziato che la frazione sinaptosomale di cervello di ratto contiene strutture del diametro di 0,2-0,8 μm (Fig. 2). Circa il 60% di tali strutture è identificabile come terminazioni presinaptiche per la presenza di vescicole del diametro di 40-80 nm e di uno o più mitocondri intraterminali. Altre strutture rotondeggianti prive di vescicole sono componenti postsinaptiche (frammenti dendritici), processi gliali e mitocondri liberi (Autilio et al., 1968).

I sinaptosomi rappresentano pertanto un ottimo modello per lo studio delle funzioni sinaptiche in vitro. In particolare, essi costituiscono un preparato utile per verificare la presenza di un sistema di sintesi proteica presinaptico. I primi dati a sostegno di tale ipotesi risalgono ad esperimenti condotti su fettine di cervello di ratto incubate per circa un'ora con leucina radioattiva. In queste condizioni si verificava un'incorporazione lineare dell'amminoacido nelle proteine della frazione sinaptosomale (Austin e Morgan, 1967). In

successivi esperimenti nei quali la frazione sinaptosomale era direttamente incubata con amminoacidi radioattivi, si dimostrava l'intrinseca capacità dei sinaptosomi a sintetizzare proteine. In presenza di cloramfenicolo (CAP, inibitore specifico della sintesi proteica mitocondriale) l'incorporazione era inibita del 30%, mentre la cicloesimide (CHX, inibitore specifico della sintesi proteica citoplasmatica) inibiva la reazione di circa il 70%. D'altra parte, l'assenza di effetti indotti dall'aggiunta di RNAsi al mezzo d'incubazione dimostrava che il sistema di sintesi proteica dei sinaptosomi era protetto da una membrana plasmatica. Questi risultati portarono alla conclusione che nei sinaptosomi erano presenti due sistemi di sintesi proteica, uno mitocondriale sensibile al CAP, e uno citoplasmatico sensibile alla CHX (Austin e Morgan, 1968). Ulteriori esperimenti dimostrarono che la capacità d'incorporare amminoacidi radioattivi in proteine di nuova sintesi non richiedeva l'aggiunta di ATP o di altri supporti energetici. Ciò suggeriva la presenza di una fonte endogena di energia, molto probabilmente di origine mitocondriale (Autilio et al., 1968).

Si stabilì inoltre, che l'attività di sintesi richiedeva l'isotonicità del mezzo di incubazione e la simultanea presenza di ioni sodio e potassio alle rispettive concentrazioni di 100 mM e 10 mM. L'importanza di tali ioni fu confermata dall'effetto inibitorio esercitato dall'uabaina, inibitore specifico dell'ATPasi Na^+/K^+ dipendente (Autilio et al., 1968). Infine, analisi autoradiografiche a livello ultrastrutturale dimostrarono che circa metà delle proteine radioattive di nuova sintesi erano presenti in sinaptosomi di origine presinaptica, mentre il resto era localizzato in frammenti derivati dal corpo cellulare, in strutture non presinaptiche prive di ribosomi e in strutture non presinaptiche contenenti ribosomi di probabile origine gliale o postsinaptica (Cotman and Taylor, 1971; Gambetti et al., 1972). L'interpretazione di questi dati rimane tuttavia controversa, dato il permanere dell'opinione di una sostanziale assenza di sintesi proteica nel compartimento assonale e presinaptico, e di una prevalente localizzazione dendritica (Rao e Steward, 1991) e in minor misura gliale del sistema sinaptosomale di sintesi proteica (Sieghart e Singer, 1979). Questa opinione ha trovato conferma nell'esistenza di polisomi biologicamente attivi nelle spine dendritiche e nelle regioni sub-sinaptiche (Steward e Schuman, 2003).

L'ipotesi di una sintesi proteica presinaptica è tuttavia sostenuta da molti altri dati (Giuditta et al., 2008), tra cui quelli che dimostrano la presenza di mRNA nelle regioni presinaptiche (Alvarez et al. 2000), ad esempio dell'mRNA per l'olfactory marker protein (OMP) nelle terminazioni nervose dei neuroni olfattivi del ratto (Wensley et al 1995). Inoltre, risultati ottenuti con tecniche RT-PCR hanno dimostrato che l'mRNA per una proteina presinaptica, il GAT-1, è presente nella frazione sinaptosomale del cervello di ratto (Crispino et al 2001). In conclusione, la frazione sinaptosomale di cervello di ratto contiene organelli presinaptici e altri elementi subcellulari capaci di sintesi proteica, ma la componente presinaptica risulta comunque maggioritaria.

1.2.3 TRASFERIMENTO DEGLI RNA ASSONALI E PRESINAPTICI DALLA GLIA PERIASSONALE E PERISINAPTICA

La presenza di un sistema di sintesi proteica locale, localizzato nella periferia neuronale, solleva il problema dell'origine degli RNA assonali e presinaptici. Come nel caso dell'origine delle proteine assonali e presinaptiche, l'opinione generalmente accettata suggerisce che tali RNA derivino esclusivamente dal soma delle cellule nervose. Tuttavia, dati della letteratura soprattutto recente dimostrano la loro origine nelle cellule gliali periassonali e perisinaptiche. L'incubazione con uridina triziata di assoni giganti isolati di calamaro (*Loligo vulgaris*) ha fornito la dimostrazione più diretta della sintesi locale degli RNA assoplasmatici, confermata anche da esperimenti condotti in vivo (Cutillo et al., 1983). Tali RNA sono stati identificati come tRNA e rRNA per frazionamento elettroforetico, e come poly(A)⁺ RNA per assorbimento su cellulosa oligo(dT) (Rapallino et al., 1988). Negli esperimenti con assoni isolati, l'assenza dei corpi neuronali esclude l'origine somatica degli mRNA assoplasmatici, e dimostra al contrario che essi derivano dalle cellule gliali periassonali. Ulteriori esperimenti condotti su assoni giganti perfusi internamente hanno consentito l'analisi cinetica del processo di trasferimento degli RNA gliali all'assone grazie all'esame dei campioni di perfusato prelevati a differenti intervalli di tempo. Si è così osservato che gli RNA radioattivi entrano nell'assone perfuso pochi minuti dopo l'aggiunta di [³H]uridina nella camera d'incubazione. Essi si accumulano nel perfusato per diverse ore in modo approssimativamente lineare. Il processo è inibito da actinomicina D, inibitore specifico del processo di trascrizione. In analisi di sedimentazione su gradiente, gli RNA di nuova sintesi del perfusato sono per la maggior parte di basso peso molecolare, probabilmente tRNA e siRNA, ma una significativa frazione cosedimenta con particelle subribosomali (Giuditta et al., 2002b; Eyman et al., 2007a).

C'è inoltre da notare che analisi di sedimentazione dell'RNA estratto dall'assone di Mauthner incubato con uridina radioattiva avevano rilevato la presenza di rRNA e tRNA tra le specie assoplasmatiche neosintetizzate. In assenza delle cellule gliali periassonali, l'unica specie di RNA radioattivo di nuova sintesi era l'RNA 4S, di presumibile origine mitocondriale (Edstrom et al., 1969). Nel loro insieme questi risultati rappresentano prove convincenti dell'esistenza di un trasferimento di trascritti gliali nel compartimento assonale modulato da segnali glia-assone (Giuditta et al., 2002b) (Fig. 3). Tale trasferimento riguarda anche particelle ribosomali come dimostrato da analisi su gradienti di CsCl₂. (Menichini et al., 1990).

La presenza di un processo di trascrizione locale degli RNA presinaptici da parte di cellule perisinaptiche, presumibilmente gliali, è stata anche dimostrata nelle grandi terminazioni nervose dei fotocettori retinici del lobo ottico del calamaro. Questo esperimento ha richiesto l'incubazione di fettine del lobo ottico con uridina triziata e l'analisi degli RNA radioattivi della frazione sinaptosomale preparata dalle fettine incubate. L'identificazione di

RNA radioattivo nei grandi sinaptosomi presinaptici derivati dalle terminazioni nervose dei fotorecettori dimostra la loro origine locale in quanto i corpi cellulari di queste terminazioni non sono presenti nei lobi ottici bensì nella retina (Giuditta et al., 2004; Eyman et al., 2007a).

1.3 APPRENDIMENTO ASSOCIATIVO

Il termine apprendimento si riferisce a processi del SNC che portano all'acquisizione di informazioni provenienti dall'ambiente esterno, che possono indurre la formazione di un nuovo modulo comportamentale. Viene definito apprendimento associativo il processo mediante il quale l'animale impara ad associare la risposta ad uno stimolo biologicamente significativo (rinforzo o stimolo incondizionato come cibo, acqua, stimolo dolorifico) con la risposta ad uno stimolo neutro detto condizionato (suono, luce). Nel condizionamento classico, l'emissione della risposta (ad es. salivazione) non ha alcun effetto sulla somministrazione dello stimolo incondizionato (presentazione del cibo). D'altra parte, nell'apprendimento associativo di tipo operante, la comparsa del rinforzo (positivo o negativo) dipende dall'emissione di una particolare risposta (detta operante). In tale tipo di apprendimento si stabilisce una relazione tra risposta e stimolo incondizionato; la risposta diviene pertanto strumentale all'ottenimento del rinforzo. Il test di evitamento attivo a due vie è un paradigma comportamentale al quale viene sottoposto l'animale per saggiare la sua capacità di acquisizione di un apprendimento associativo di tipo operante.

2. SCOPO DEL LAVORO

Il lavoro da me svolto ha riguardato il coinvolgimento della sintesi proteica sinaptica nei fenomeni di plasticità neuronale. Recenti studi hanno dimostrato il selettivo coinvolgimento della sintesi locale di una proteina sinaptica da 66.5 kDa nell'apprendimento di un compito associativo quale l'evitamento attivo a due vie. Rispetto a ratti di controllo, la sintesi sinaptosomale di tale proteina aumenta negli emisferi cerebrali e nel cervelletto di ratti addestrati e sacrificati immediatamente dopo il termine della seduta di addestramento (Eyman et al., 2007b). Tuttavia si è anche dimostrato (dati non pubblicati) che tale aumento scompare in ratti sacrificati quattro ore dopo la fine della seduta di addestramento. Quest'ultimo dato ha suggerito di effettuare una dettagliata analisi cinetica dell'effetto sinaptico. Il mio lavoro ha pertanto riguardato l'individuazione del tempo minimo di addestramento in grado di indurre un incremento della sintesi sinaptosomale della proteina da 66.5 kDa negli emisferi cerebrali e nel cervelletto di ratti, e di stabilire eventuali relazioni fra tale incremento e le risposte comportamentali degli animali.

Dal momento che era necessario esporre i ratti a tempi di addestramento notevolmente ridotti, è sembrato utile cercare di favorire il processo di acquisizione della risposta di

evitamento familiarizzando i ratti con l'apparato sperimentale (la shuttle-box) prima della seduta di apprendimento. Si è quindi introdotta nel nostro protocollo sperimentale l'esperienza della familiarizzazione e se ne sono valutati gli effetti.

Un'altra parte del lavoro ha riguardato l'eventuale presenza della proteina BAG 3 in differenti frazioni subcellulari dell'omogenato di corteccia più ippocampo del cervello di ratto. BAG3 è una proteina citoplasmatica da 75 kDa che appartiene alla famiglia di proteine che presentano un dominio di legame (dominio BAG) per le proteine "heat shock" (hps) (Takayama *et al.* 1999). Queste ultime facilitano l'acquisizione della struttura tridimensionale da parte delle proteine appena sintetizzate. Le proteine BAG, inoltre, possono interagire con altre proteine implicate in numerosi processi cellulari come la proliferazione e l'apoptosi. L'interesse per la proteina BAG3 è nato da un rapporto di collaborazione con il gruppo della prof.ssa Maria Caterina Turco della Facoltà di Farmacia dell'Università di Salerno.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Animali

Per gli esperimenti descritti sono stati utilizzati ratti maschi adulti del ceppo Wistar forniti dalla ditta Charles River (Calco, Lecco) di età compresa tra i due e i tre mesi. Gli animali sono stati tenuti in gruppi di due per gabbia, con piena disponibilità di cibo ed acqua, in ambiente condizionato (23 °C) e con cicli luce-buio di 12 ore (luce dalle ore 6:00 alle ore 18:00).

3.2 Familiarizzazione

Un gruppo di 30 animali è stato sottoposto ad un protocollo di familiarizzazione costituito da due sedute: la prima, di 60 minuti, effettuata il giorno precedente il test di evitamento attivo a due vie; la seconda, di 30 minuti, subito prima dell'inizio del test di addestramento. La seduta di familiarizzazione prevede il trasferimento dell'animale dallo stabulario alla gabbia di condizionamento (shuttle box) in cui verrà poi effettuato l'addestramento. Gli animali vengono lasciati al buio, in condizioni di isolamento acustico e alla temperatura di 23°C. Gli escrementi e le urine prodotti dagli animali per marcare il nuovo ambiente, non vengono rimossi dalla shuttle box al fine di facilitare negli animali il riconoscimento dell'ambiente il giorno successivo.

3.3 Test di evitamento attivo a due vie

Il test viene effettuato in una gabbia di condizionamento (shuttle box) in perspex provvista di un coperchio trasparente che consente l'osservazione dell'animale. Al suo interno un setto separa la gabbia in due compartimenti identici. Nella sua parte inferiore c'è un foro che consente il passaggio dell'animale da un compartimento all'altro della gabbia. Il

pavimento della shuttle box è costituito da una griglia metallica basculante, collegata ad un generatore di corrente per la somministrazione dello stimolo avversivo (scossa elettrica alle zampe, 0.8 mA).

Il test di evitamento attivo a due vie si compone di tre sedute di addestramento della durata di 30 minuti, intervallate da 30 minuti di riposo. Ogni seduta prevede 60 cicli di addestramento della durata di 30 secondi. Ogni ciclo si compone di 6 secondi di luce (stimolo condizionato) e 24 secondi di buio che riguardano entrambi i compartimenti della gabbia. Dopo i primi 3 secondi di luce il ratto riceve una scossa elettrica (stimolo incondizionato) per 3 secondi che viene però interrotta se l'animale passa nell'altro compartimento della gabbia. Infatti, il pavimento basculante della gabbia si abbassa a causa del peso dell'animale, interrompendo così il circuito elettrico. Le risposte comportamentali degli animali sono di tre tipi: congelamento, fuga o evitamento. Nel primo e nel secondo caso (risposte innate) l'animale non si sposta nell'altro compartimento (congelamento) o lo fa solo dopo aver ricevuto la scossa (fuga). L'evitamento è invece una risposta acquisita. Essa richiede che il ratto si sposti nell'altro compartimento prima della somministrazione della scossa, che quindi viene evitata. Al termine della seduta gli animali vengono suddivisi in tre classi comportamentali (appresi o learning, fugaioli, congelati) in base alle risposte prevalenti sul totale delle sedute.

Gli animali sottoposti all'intera seduta di addestramento (3 periodi) sono stati 39. Negli esperimenti di cinetica di comparsa dell'effetto sinaptico sono stati sottoposti al test di evitamento attivo a due vie 17 animali, secondo il seguente schema:

- 13 animali sono stati sottoposti a due sedute di addestramento e sacrificati dopo 30 minuti di riposo.
- 1 animale è stato sottoposto a due sedute di addestramento e sacrificato dopo 60 minuti di riposo.
- 1 animale è stato sottoposto a due sedute di addestramento e sacrificato dopo 120 minuti di riposo.
- 2 animali sono stati sottoposti ad una seduta di addestramento e sacrificati dopo 30 minuti di riposo.

3.4 Frazionamento subcellulare

Gli animali sono stati sacrificati per decapitazione dopo anestesia, e dall'encefalo sono stati rapidamente prelevati cervelletto ed emisferi cerebrali. Il tessuto (1 gr circa) è stato omogenato in un omogenizzatore Dounce con 10 volumi di un tampone (tampone A) contenente saccarosio 0,32 M e Tris-Cl 10 mM pH 7,4 per ottenere l'omogenato (OM). L'omogenato è stato successivamente centrifugato in un rotore JA17 di una centrifuga Beckman JA21 (4200 rpm, 1 min.). Si è così ottenuto un sedimento costituito da nuclei e frammenti cellulari (P1) e un soprannatante (S1). Il sedimento P1 è stato risospeso nello stesso

volume di tampone A, e centrifugato nelle stesse condizioni per ottenere un sedimento più pulito. I due sopranatanti sono stati riuniti e centrifugati (13,200 rpm, 4 min, 4°C) per ottenere un sedimento contenente mitocondri liberi, sinaptosomi e mielina (definito frazione sinaptosomale grezza o P2), e un sopranatante (S2). Dopo aver prelevato il sopranatante, il sedimento è stato lavato con un egual volume di tampone A e ricentrifugato alle stesse condizioni. I due sopranatanti S2 sono stati riuniti e centrifugati (25000 rpm per 60 min. a 4°C) in una ultracentrifuga Beckman (rotore SW41) per ottenere un sopranatante che costituisce la frazione citosolica (S3), e un sedimento risospeso in tampone A che costituisce la frazione microsomale (P3) .

Il sedimento P2 è stato risospeso in un opportuno volume di tampone A e la sua concentrazione proteica è stata misurata con il metodo BIO-RAD. La sospensione è stata portata ad una concentrazione proteica di 4 mg/ml, e una sua aliquota (1 ml) è stata stratificata su un gradiente discontinuo di Ficoll in tampone A (2ml di Ficoll 13%; 2 ml di Ficoll 5%) preparato circa 1 ora prima e tenuto a 4°C. Il gradiente è stato centrifugato a 24400 rpm per 45 min a 4°C in una ultracentrifuga Beckman (rotore SW55). Si sono così ottenute due frazioni: mielinica (Miel) e sinaptosomale purificata (Syn). La frazione Syn prelevata all'interfase 13%-5% è stata diluita con 10 volumi di tampone A, centrifugata nel rotore JA17 (13200 rpm per 20 min, 4°C) per eliminare il Ficoll, e il sedimento è stato risospeso in un opportuno volume di tampone A. La frazione Miel è stata diluita in 10 volumi di tampone A e centrifugata in rotore JA17 (13200 rpm per 20 min, 4°C) per eliminare il Ficoll. Le concentrazioni proteiche sono state determinate con il metodo BIO-RAD.

3.5 Incorporazione di [³⁵S]metionina nelle proteine sinaptosomali

Per la misura della sintesi proteica sono state utilizzate le frazioni sinaptosomale grezza (P2) e purificata (Syn) ottenute dagli emisferi cerebrali e dal cervelletto di ratti di controllo e addestrati. Opportune aliquote di ciascuna frazione sono state incubate alla concentrazione di 250 µg/ml in un mezzo isotonico contenente NaCl 90 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 1mM, glucosio 1 mM, saccarosio 100 mM, al quale si sono aggiunti 200 µCi/ml [³⁵S]metionina (NEN; >1000 Ci/mmol) e 20 µg/ml di CAF per eliminare la sintesi proteica mitocondriale. La reazione è stata fatta partire aggiungendo i sinaptosomi al mezzo di incubazione a 37 °C. Dopo 1 h la miscela di incubazione è stata immersa in ghiaccio per arrestare la reazione di sintesi. L'incorporazione di [³⁵S]metionina nelle proteine sinaptosomali è stata determinata su aliquote della miscela di incubazione (da 20 a 100 µl) aggiunte ad 1 ml di acido tricloroacetico (TCA) 10% contenente 1 mg/ml di metionina (met) e 2-3 gocce di BSA. Dopo 30 minuti a 4 °C ciascun campione è stato centrifugato in una centrifuga Eppendorf (14000 rpm, 15 min., 4°C), e il sopranatante eliminato. Il sedimento, sciolto in 0,5 ml di NaOH 1N, 1mg/ml met (37 °C, 30 min), è stato riprecipitato con 4 volumi di TCA 25%. Dopo 30 min in ghiaccio, le proteine precipitate sono state raccolte su filtri GF/

C Whatman, lavati con un eccesso di TCA 8%, met 1mg/ml. I filtri sono stati quindi asciugati per esposizione ad una lampada a raggi infrarossi e contati in uno spettrofotometro a scintillazione liquida con un'efficienza del 90%.

3.6 Analisi elettroforetica delle proteine sinaptosomali neosintetizzate

Le proteine sinaptosomali neosintetizzate sono state recuperate dalla miscela di incubazione per centrifugazione nel rotore SW55 di una ultracentrifuga Beckman (50.000 rpm, 10 min, 4^o). Questa procedura ha permesso un recupero della quasi totalità delle proteine radioattive. Le proteine sedimentate sono state sciolte in 100 µl di un tampone (sample buffer: Tris-Cl 60 mM PH 6.8; SDS 2%; glicerolo 10%; blu di bromofenolo 0,01%; ditiotreitolo 100mM) utilizzato per il frazionamento elettroforetico. La quantità di campione da utilizzare nelle analisi SDS-PAGE è stata stabilita sulla base della radioattività di ciascun campione. In ogni pozzetto è stata caricata radioattività per un massimo di 10.000 cpm e proteine per un massimo di 80-100 µg. In uno dei pozzetti del gel è stata inserita una miscela di proteine radioattive, marcate con ¹⁴C di peso molecolare noto (Amersham; catena pesante della miosina, 200 kDa; fosforilasi B 94.7 kDa; albumina di siero bovino 68.0 kDa; ovalbumina 43.0 kDa; anidrasi carbonica 29 kDa; β- lattoglobulina 18.4 kDa; lisozima 14.3 kDa).

Per visualizzare le bande proteiche radioattive, al termine della corsa elettroforetica, i gel sono stati sottoposti a fluorografia con EN³HANCE (NEN, Perkin Elmer), essiccati su un supporto di carta da filtro (90 min a 65 °C), ed esposti ad una lastra fotografica (Fuji) a -80 °C per un adeguato numero di giorni (da 7 a 15 giorni). Lo sviluppo delle lastre (LifeRay APS fixer e developer, Ferrania) ha consentito di esaminare la presenza di eventuali differenze nelle proteine sinaptosomali neosintetizzate. I pesi molecolari delle bande elettroforetiche di interesse sono stati determinati costruendo una retta di taratura sulla base della mobilità relativa (distanza percorsa in mm) delle proteine a peso molecolare noto. Una volta individuate le bande proteiche di interesse, si è proceduto alla loro analisi densitometrica (Densitometro UltroScan XL LKB, Pharmacia). L'intensità delle bande è stata normalizzata esprimendola come intensità relativa rispetto ad una banda di riferimento di 41,2 kDa particolarmente intensa e non variabile. Dati preliminari hanno permesso di stabilire che l'intensità di questa banda dipende linearmente dal tempo di esposizione e dalla radioattività proteica.

3.7 Western blot

Omogenati di cervello (corteccia + ippocampo) di ratto, sono stati sottoposti a frazionamento subcellulare (paragrafo 3.4). La determinazione proteica delle frazioni raccolte è stata effettuata mediante il saggio colorimetrico di Bradford (BioRad). 50 µg di proteine totali sono state denaturate in Laemmli buffer (25 mmoli/L Tris -HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10%

Glicerolo, 10% mercaptoetanolo, Blu di bromofenolo) e separate su 10% SDS-PAGE in condizioni riducenti. La corsa elettroforetica è stata condotta a 30 mA, successivamente il gel è stato trasferito su membrana di nitrocellulosa Hybond ECL (Amersham) mediante elettroblotting a 100 volts costanti per 1 ora in buffer di trasferimento contenente 25mM Tris , 192 mM Glicina, 0.1% SDS e 20% Metanolo. L'efficienza del trasferimento è stata controllata mediante colorazione con Rosso Ponceau. In seguito, siti di legami liberi sul filtro di nitrocellulosa sono stati bloccati incubando con 10% di latte scremato (BioRad) per 2 ore a temperatura ambiente. I filtri sono stati incubati con l'anticorpo primario specifico (TOS-2 policlonale, AC-1 monoclonale), in 5% latte- TBST buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 500mM NaCl e 0.01% Tween 20) per 16 ore a 4°C e successivamente con l'anticorpo secondario coniugato ad HRP (*horseradish peroxidase*) in TBST per 1 ora a TA. L'incubazione dell'anticorpo primario e secondario è stata seguita da 5 lavaggi di 10 minuti ciascuno con 1X PBS-0.5% Tween. I segnali sono stati rivelati mediante chemiluminescenza (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) su lastra autoradiografica (Hyperfilm™ ;Amersham).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Effetto della familiarizzazione

Ratti precedentemente familiarizzati sono stati paragonati a ratti non esposti al procedimento di familiarizzazione in relazione alle risposte comportamentali da essi espresse durante l'intera seduta di addestramento. I ratti addestrati sono stati suddivisi nelle tre classi comportamentali (learning, fugaioli, congelati) identificate sulla base della maggioranza di evitamenti, fughe o congelamenti espressi da ciascun animale.

Dal confronto tra ratti non familiarizzati (n=26) e familiarizzati (n=13) è risultato che la percentuale di ratti con prevalenza di evitamenti è più del doppio nei ratti familiarizzati (38%) che in quelli non familiarizzati (15%). Al contrario, la percentuale dei ratti con prevalenza di fughe è notevolmente minore nei ratti familiarizzati (31%) che in quelli non familiarizzati (54%). Infine, la percentuale di ratti con prevalenza di congelamenti (31%) resta sostanzialmente invariata in ambedue i gruppi (Fig.4). Dal confronto fra ratti familiarizzati (n=5) e non familiarizzati (n=4) appartenenti al gruppo con prevalenza di evitamenti (learning), è risultato che il numero medio di evitamenti è significativamente maggiore nel gruppo dei familiarizzati (t-test di Student per dati non appaiati), mentre il numero medio delle fughe risulta minore (Fig.5). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nel numero medio di congelamenti. D'altro canto non sono emerse differenze significative tra evitamenti, fughe o congelamenti nella classe con prevalenza di fughe (familiarizzati, n=4; non familiarizzati n=14), e nella classe con prevalenza di congelamenti (familiarizzati, n=4; non familiarizzati, n=8) (Fig.6; Fig.7).

Nei ratti appartenenti al gruppo learning si è inoltre misurato il tempo di latenza nei cicli di addestramento della prima seduta. Per tempo di latenza si intende l'intervallo che intercorre tra l'accensione della luce (stimolo condizionato) e il passaggio dell'animale nell'altra metà della gabbia. Poiché, lo stimolo doloroso (non condizionato) viene somministrato per tre secondi dopo l'accensione della luce, il passaggio del ratto nell'altra metà della gabbia si considera evitamento se esso si manifesta con latenza inferiore ai 3 secondi, e fuga se la latenza varia tra 3 e 6 secondi. Come mostrato in Figura 5, i ratti con prevalenza di evitamenti presentano latenze inferiori ai tre secondi sin dal 16° ciclo se sono stati preventivamente familiarizzati (n=5), mentre nei ratti non familiarizzati (n=4) le latenze inferiori a tre secondi appaiono solo a partire dal 29° ciclo di addestramento (Fig. 8). La procedura di familiarizzazione sembra quindi non avere effetto sul comportamento dei ratti che non apprendono, ma essa è in grado di spostare una cospicua percentuale di animali (23%) da una maggioranza di fughe ad una maggioranza di evitamenti. La familiarizzazione aumenta inoltre il numero degli evitamenti espressi dai ratti appartenenti alla classe learning. L'aumento si riscontra già nel primo periodo di addestramento, nel quale si osserva un anticipo degli evitamenti dal 29° al 16° ciclo di addestramento. Sulla base di questi dati, l'esame della cinetica di comparsa dell'effetto sinaptico è stato esaminato utilizzando animali familiarizzati.

L'influenza della familiarizzazione sulla risposta innata di fuga piuttosto che di congelamento trova una giustificazione nella dinamica stessa del test comportamentale. I ratti che esibiscono come risposta comportamentale la fuga esperiscono che una riduzione del tempo di risposta allo stimolo condizionato (luce) porta ad una riduzione della durata della scossa. Inoltre, lo spostamento dell'animale nell'altro compartimento della gabbia determina l'interruzione della stimolo incondizionato (scossa). L'animale quindi è in grado di associare l'interruzione della scossa con lo spegnimento della luce, il che faciliterà il riconoscimento della luce come segnale di pericolo. Occorre inoltre sottolineare che in ratti che dimostrano di aver appreso il compito di evitamento, ossia che mostrano una maggioranza di evitamenti sul totale dei tre periodi di addestramento, gli evitamenti iniziano sempre dopo che gli animali hanno espresso un certo numero di fughe.

I dati indicano che la familiarizzazione ha effetto sia sul gruppo di animali che esprimono una maggioranza di fughe, sia in quelli che esprimono una maggioranza di evitamenti. Appare dunque possibile sostenere che negli animali che esprimono fughe, l'esplorazione preventiva della gabbia di condizionamento e la riduzione dello stress indotto dal nuovo ambiente, determina il loro cambiamento da potenziali fugaioli ad appresi, e porta in questi ultimi un anticipo nell'inizio degli evitamenti.

4.1.1 Confronto dei profili elettroforetici

Per stabilire se il procedimento di familiarizzazione avesse effetto sulla sintesi della proteina sinaptosomale da 66.5 kDa, si sono confrontati i profili elettroforetici dei ratti sottoposti alla familiarizzazione (n=3) con quelli dei ratti non familiarizzati (n=4). In ambedue i casi gli animali non sono stati sottoposti alla seduta di addestramento. Da analisi effettuate sulla frazione sinaptosomale grezza (P2) degli emisferi cerebrali (neocorteccia e ippocampo) non è risultata alcuna differenza nei profili elettroforetici e nell'intensità di sintesi della proteina da 66.5 kDa tra ratti familiarizzati e non familiarizzati. Questo dato ha confermato che l'esame cinetico dell'effetto sinaptico poteva essere condotto utilizzando animali familiarizzati (Fig.9).

4.2 Effetti indotti da durate minori di addestramento

- *Dati ottenuti dalla frazione sinaptosomale grezza (P2) in ratti esposti a un solo periodo di addestramento seguito da un periodo di riposo di 30 minuti:*

In animali (n=2) che mostrano una percentuale di evitamenti del 15% e del 22% nel primo periodo di apprendimento, si riscontra un incremento della sintesi della proteina di 66.5 kDa rispetto al controllo (n=1) sia negli emisferi cerebrali (Fig.10) che nel cervelletto (Fig.11). La difficoltà di ottenere un numero sufficiente di animali in grado di esibire un adeguato numero di evitamenti nel primo periodo di addestramento, ci ha indotto a focalizzare le nostre analisi su animali sottoposti a due sedute di addestramento.

- *Dati ottenuti dalla frazione sinaptosomale grezza (P2) di ratti esposti a due sedute di addestramento seguite da un periodo di riposo di 30 minuti:*

Nella frazione P2 degli emisferi cerebrali l'intensità media della proteina neosintetizzata da 66.5 kDa è risultata significativamente maggiore (t-test di Student) nei ratti addestrati e sacrificati dopo un periodo di riposo di 30 minuti (n=5) rispetto ai ratti di controllo (n=2) (Fig. 12). L'analisi correlativa (metodo non parametrico di Spearman) fra l'intensità di sintesi della proteina ed il numero di evitamenti, fughe e congelamenti registrati nel primo e secondo periodo di addestramento e durante l'intera seduta ha mostrato correlazioni consistentemente positive con il numero di evitamenti (E) e fughe (F) e negative con il numero di congelamenti (C) (Fig. 13).

Nella frazione sinaptosomale P2 del cervelletto l'intensità della proteina da 66.5 kDa risulta maggiore nei ratti addestrati (n=5) rispetto ai ratti di controllo (n=2), ma senza che si raggiunga la significatività (Fig.14). Tuttavia, l'analisi correlativa tra la sintesi della proteina e le risposte comportamentali espresse dai ratti hanno mostrato risultati simili a quelli emersi dall'analogo esame relativo agli emisferi cerebrali. In particolare si sono osservate correlazioni positive con gli evitamenti e le fughe e negative con i congelamenti (Fig.15).

○ *Dati ottenuti dalla frazione sinaptosomale purificata (syn) di ratti esposti a due sedute di addestramento seguite da un periodo di riposo di 30 minuti:*

Analisi analoghe sono state effettuate sulla frazione sinaptosomale degli emisferi cerebrali purificata per sedimentazione su gradiente di Ficoll. Anche in questa frazione l'intensità della proteina da 66.5 kDa è risultata significativamente maggiore nei ratti addestrati (n=8) rispetto ai ratti di controllo (n=4) (Fig.16). Tuttavia, diversamente da quanto osservato nella frazione P2 (Fig.13), l'analisi correlativa tra l'intensità di sintesi della proteina da 66.5 kDa nella frazione sinaptosomale purificata e le risposte comportamentali espresse dai ratti ha mostrato una tendenza a correlazioni negative con gli evitamenti e positive con fughe e congelamenti (Fig17).

Anche nel caso del cervelletto i dati ottenuti con la frazione P2 sono stati paragonati a quelli osservati nella frazione sinaptosomale purificata. I dati di queste ultime analisi hanno fatto rilevare una maggiore intensità di sintesi della proteina da 66.5 kDa nei ratti addestrati (n=7) rispetto ai ratti di controllo (n=4) (Fig.18). Ma come nel caso della frazione sinaptosomale purificata dagli emisferi cerebrali, l'analisi correlativa tra intensità di sintesi della proteina e risposte comportamentali non ha riprodotto i risultati ottenuti con la frazione sinaptosomale P2, dal momento che i coefficienti di correlazione sono risultati estremamente bassi (Fig.19).

○ *Dati ottenuti dalla frazione sinaptosomale grezza (P2) di ratti esposti a due sedute di addestramento seguite da periodi di riposo di 60 o 120 minuti:*

Analisi preliminari di cinetica di scomparsa dell'effetto sinaptico sono state condotte in un ratto con percentuale di evitamento del 55 % sacrificato un'ora dopo la seconda seduta di addestramento. La sintesi della proteina sinaptica da 66.5 kDa in questo animale appare aumentata negli emisferi cerebrali ed in minore misura nel cervelletto (Fig.20-21) rispetto al controllo (n=1); d'altra parte in un ratto con una percentuale di evitamenti del 25% l'effetto è del tutto assente in entrambe le regioni cerebrali due ore dopo il termine della seduta di addestramento.

I dati fin qui esposti indicano che, già a partire dalla prima seduta di addestramento di ratti che esibiscono un certo numero di evitamenti, la sintesi della proteina da 66.5 kDa risulta incrementata negli emisferi cerebrali e nel cervelletto. Tale incremento è ancora riscontrabile, in entrambe le regioni cerebrali, 30 minuti dopo il termine di due sedute di addestramento. L'effetto scompare in ratti sacrificati 60 e 120 minuti dopo il termine dei due periodi di addestramento. Questi dati indicano che l'incremento della sintesi della proteina da 66.5 kDa inizia già durante la prima seduta di addestramento e confermano che tale incremento è temporaneo in quanto scompare due ore dopo il termine della seconda seduta.

I dati ottenuti dalle analisi correlative effettuate sulle due frazioni sinaptosomali grezza (P2) e purificata (Syn) nelle due regioni cerebrali analizzate indicano che nella

frazione P2 vi è una tendenza ad una correlazione positiva con gli evitamenti e le fughe e negativa con i congelamenti in ratti sacrificati dopo due sedute di addestramento. D'altra parte, nelle frazioni Syn delle medesime regioni cerebrali, le analisi correlative mostrano correlazioni negative con gli evitamenti e positive con le fughe ed i congelamenti. L'assenza di significatività potrebbe trovare giustificazione nel numero esiguo di animali analizzati. Le differenze tra le frazioni P2 e Syn nel tipo di correlazioni da esse mostrato potrebbero indicare che la procedura di purificazione su Ficoll induce una perdita selettiva di una popolazione di sinaptosomi specificamente coinvolta nel processo di apprendimento.

4.3 Proteina BAG 3

I Western blots ottenuti dalle frazioni subcellulari (paragrafo 3.7) sono stati esaminati con due diversi anticorpi anti-BAG3, uno di tipo policlonale (TOS-2) che consentiva l'identificazione della proteina BAG3 da 75 kDa, e l'altro di tipo monoclonale (AC-1) che era in grado di rilevare la presenza della BAG3 di circa 40 kDa. Dai dati ottenuti è risultato che la BAG3 con elevato PM era molto meno evidente nelle frazioni mielinica, citosolica e sinaptosomale purificata ottenute. Al contrario, la BAG3 di basso PM era presente in misura molto maggiore nella frazione sinaptosomale purificata (Fig. 22). Questi risultati hanno dimostrato che la BAG 3 è espressa nel cervello di ratto e che la sua forma di basso peso molecolare è soprattutto abbondante nella frazione sinaptosomale purificata. Analisi di spettrometria di massa hanno confermato che quest'ultima proteina è effettivamente una BAG3 modificata dal momento che essa presenta l'estremità ammino-terminale ma non quella carbossi-terminale (Bruno et al., 2008). Resta ancora da stabilire se la BAG3 sinaptosomale deriva da un diverso trascritto genico specifico per questa forma o da un taglio proteolitico della BAG3 da 75kDa. D'altra parte, il ruolo svolto nei sinaptosomi dalla BAG3 a basso PM richiede ulteriori indagini.

5. CONCLUSIONI

I dati sinora esposti ci indicano l'effetto positivo dell'esperienza di familiarizzazione sulla performance esibita dagli animali durante il corso dell'addestramento. In particolare, l'aumento del numero di evitamenti riscontrato nei ratti familiarizzati ha consentito una riduzione a due sedute e in due casi ad una seduta del protocollo classico di addestramento, rendendo in tal modo realizzabili gli esperimenti di cinetica di comparsa dell'effetto sinaptico. Questi ultimi hanno evidenziato l'incremento della sintesi della proteina da 66.5kDa in ratti sacrificati dopo 30 minuti dal termine della seconda seduta di addestramento nelle regioni cerebrali degli emisferi e del cervelletto di ratti che esprimevano una certa percentuale di

evitamenti. Tale incremento è stato riscontrato in entrambe le frazioni (sinaptosomale grezza e purificata) analizzate. Inoltre, dati preliminari ci indicano che tale effetto decade dopo 90 minuti dal termine del test, confermando i dati precedentemente ottenuti in ratti sacrificati dopo 4 ore di riposo. Dunque, l'effetto sinaptico associato all'apprendimento si rivela essere un fenomeno a carattere transitorio. Future indagini riguarderanno il ruolo del sonno associato ai periodi di riposo sulla cinetica di decadimento dell'effetto sinaptico. E', infatti, ben noto il coinvolgimento del sonno negli eventi plastici legati all'apprendimento. Infine le analisi condotte sulla proteina BAG3 hanno evidenziato che la sua forma tipica da 75 kDa è presente nelle frazione sinaptosomale grezza (P2) ma risulta poco espressa nella frazione purificata (Syn). Per contro, una forma di BAG3 a più basso peso molecolare (40 kDa) risulta espressa in entrambe le frazioni. Future indagini saranno volte a stabilire se tale forma modificata di BAG3 deriva da un differente trascritto genico o da taglio proteolitica della forma a più elevato peso molecolare.

FIGURE

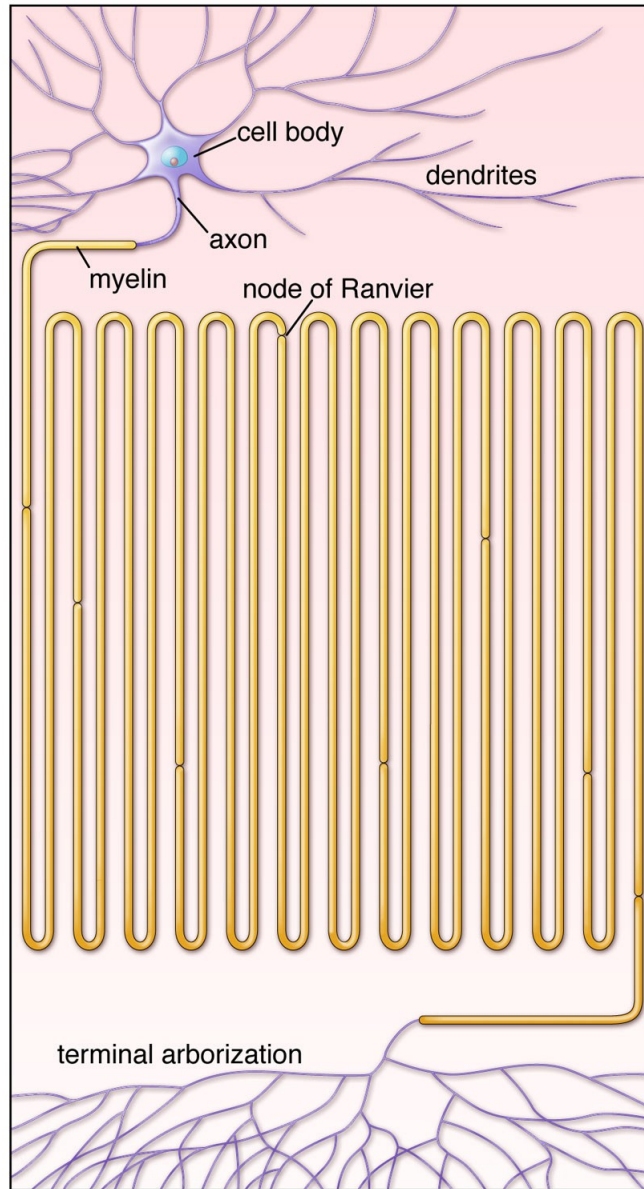


Figura 1: Rappresentazione schematica di un neurone di vertebrato adulto il cui assone ha una lunghezza di 1 cm. Diversi neuroni presentano assoni di lunghezza maggiore di un 1 mt. e possono formare centinaia di sinapsi in corrispondenza dell'arborizzazione terminale. [Modificato da D'Angelo e Peres, 2006]

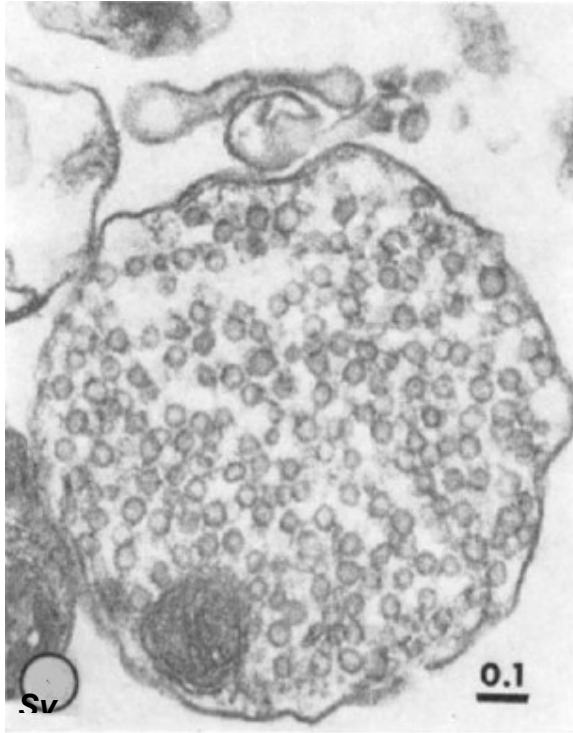


Figura 2: Terminazione presinaptica di ratto adulto ricca in vescicole presinaptiche, 300-650 Å in diametro. [Modificato da Gonatas.1971]

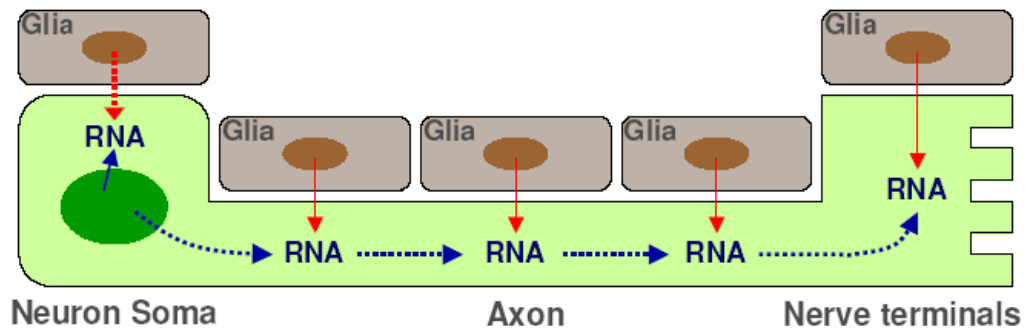
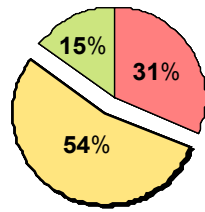


Figura 3: Rappresentazione schematica del trasferimento glia-neurone degli RNA. [Modificato da Giuditta et al.,2008]

Non Familiarizzati



Familiarizzati

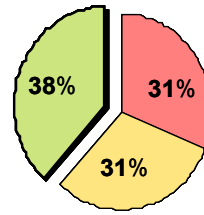


Figura 4: Distribuzione percentuale del numero di ratti familiarizzati (n=13) e non familiarizzati (n=26) nelle tre classi comportamentali : ■ **Learning** ■ **Fugaioli** ■ **Congelati**

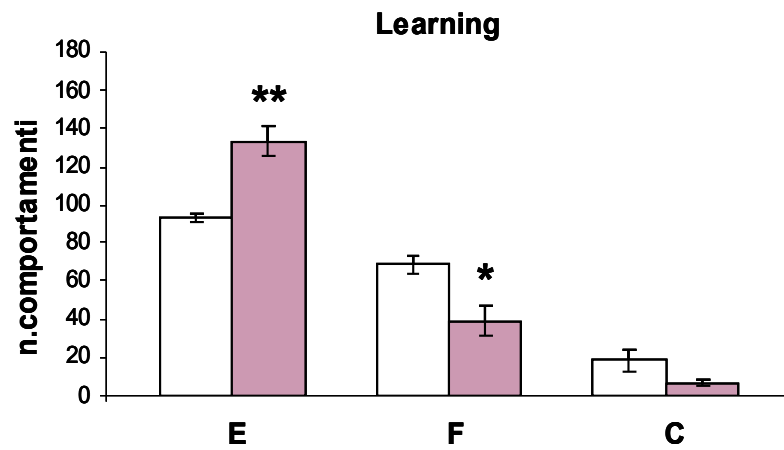


Figura 5: numero medio di evitamenti **E**, fughe **F** e congelamenti **C** di ratti non familiarizzati □ (n=4) familiarizzati ■ (n=5) e di ratti appartenenti alla classe learning; t-test di Student per dati non appaiati $P < 0.05$ *, $P < 0.01$ **.

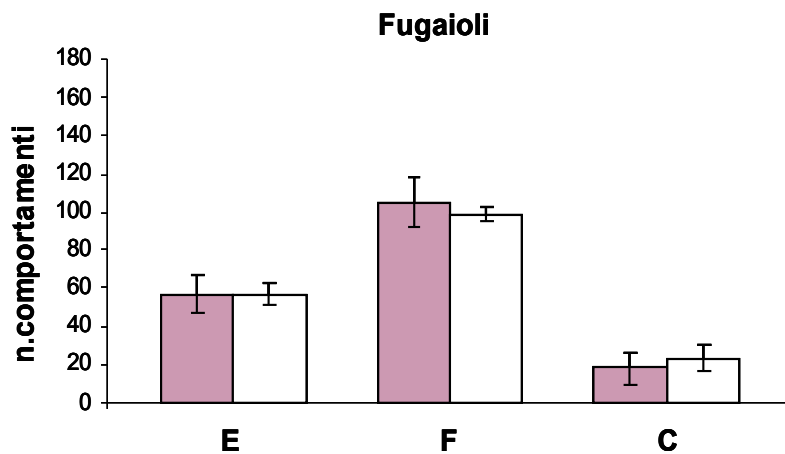


Figura 6: numero medio di evitamenti **E**, fughe **F** e congelamenti **C** di ratti familiarizzati ■ (n=4) e non familiarizzati □ (n=14) di ratti appartenenti alla classe fugaioli.

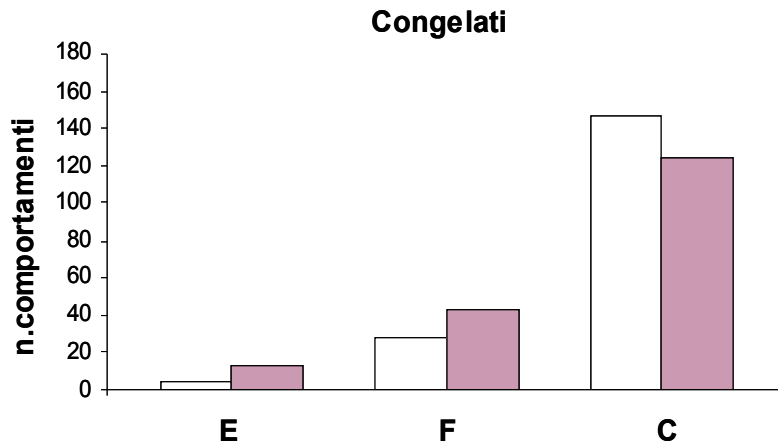


Figura 7: numero medio di evitamenti **E**, fughe **F** e congelamenti **C** di ratti familiarizzati □ (n=4) e non familiarizzati ■ (n=8) di ratti appartenenti alla classe congelati.

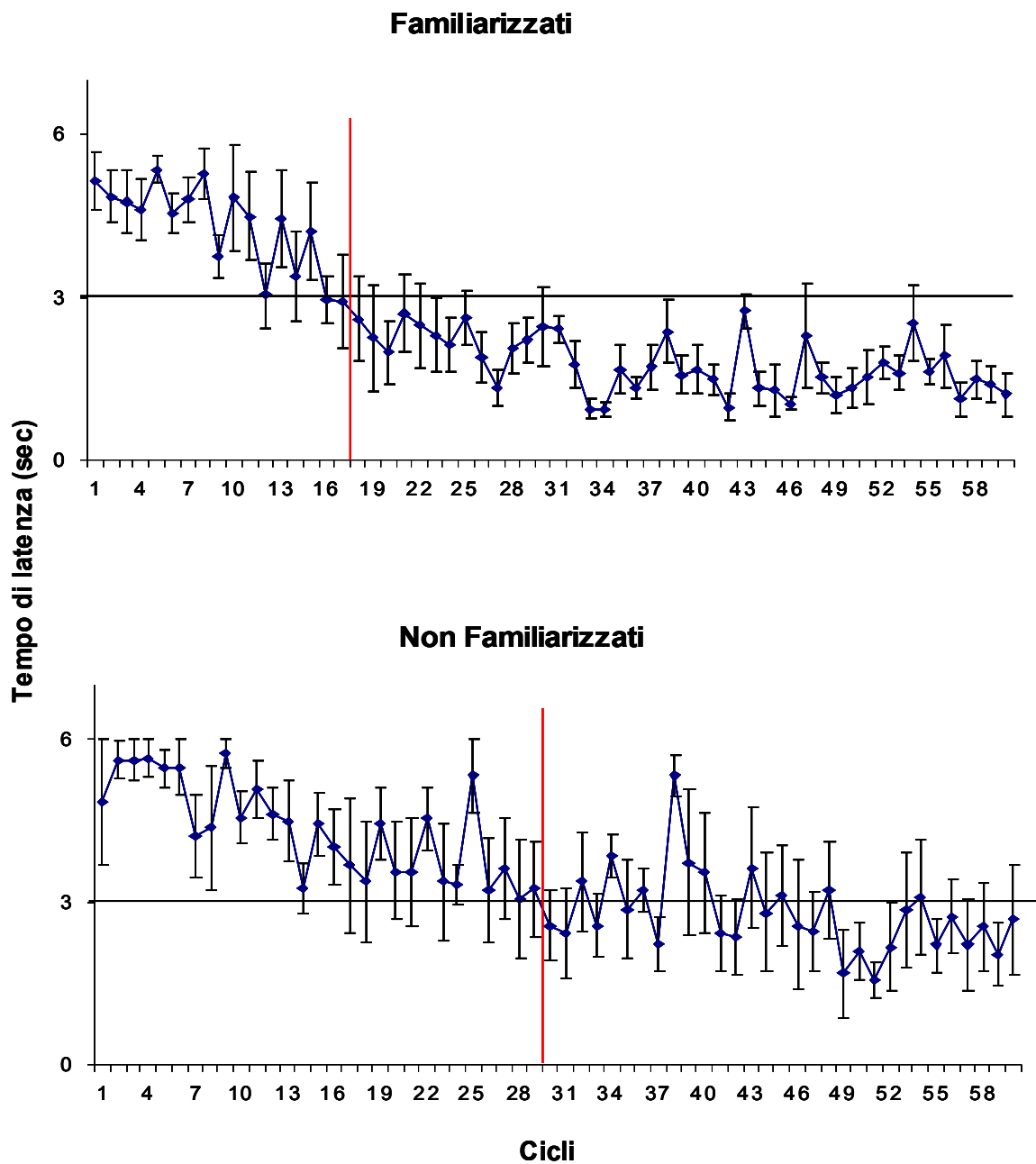


Figura 8 : tempo di latenza medio in secondi per ogni ciclo della prima seduta di addestramento in animali familiarizzati e non familiarizzati appartenenti alla classe learning.

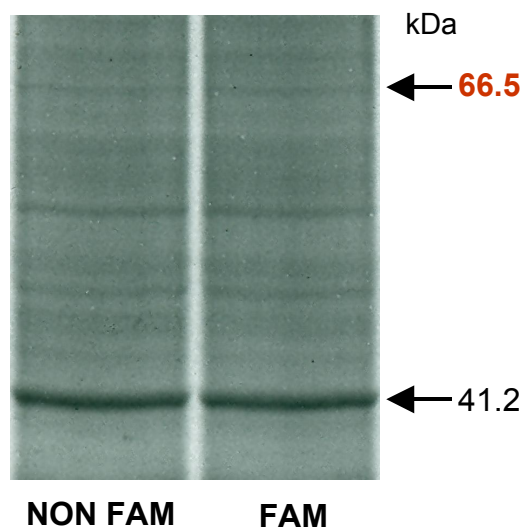


Figura 9: profilo elettroforetico di un ratto non familiarizzato **NON FAM**, e familiarizzato **FAM**.

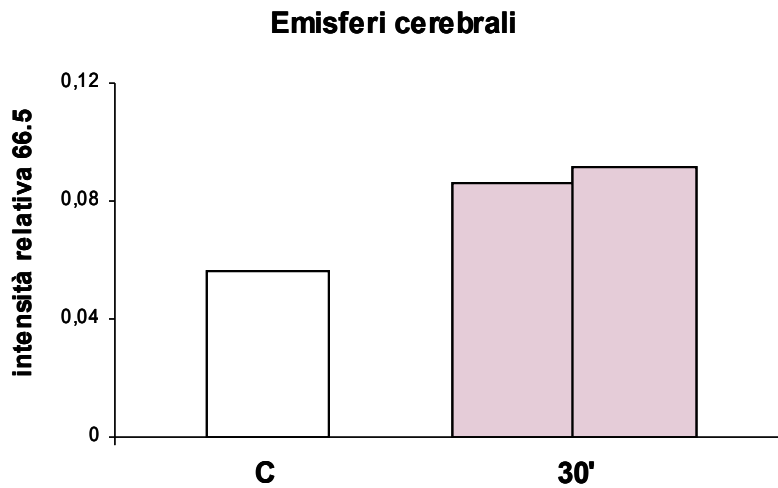


Figura 10: intensità relativa della proteina da 66.5 kDa nella frazione P2 degli emisferi cerebrali di un ratto di controllo **C** □ e di ratti (n=2) sacrificati dopo 30' dal termine della prima seduta di addestramento □.

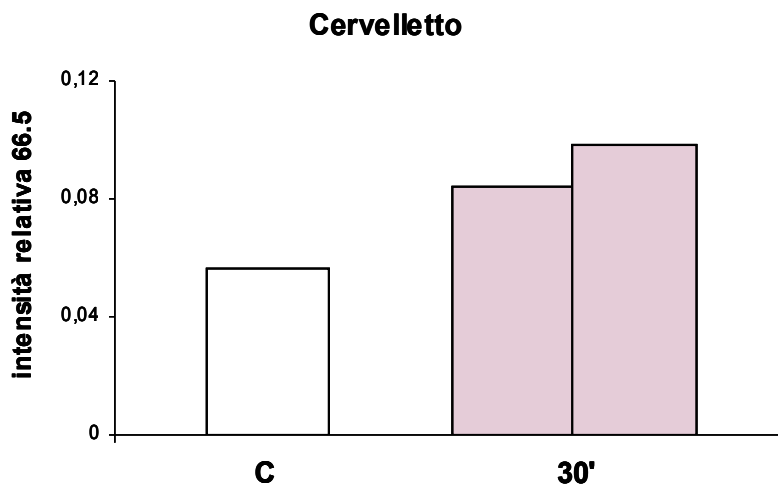


Figura 11: intensità relativa della proteina da 66.5 kDa nella frazione P2 del cervelletto di un ratto di controllo **C** □ e di ratti (n=2) sacrificati dopo 30' dal termine della prima seduta di addestramento □.

Emisferi cerebrali

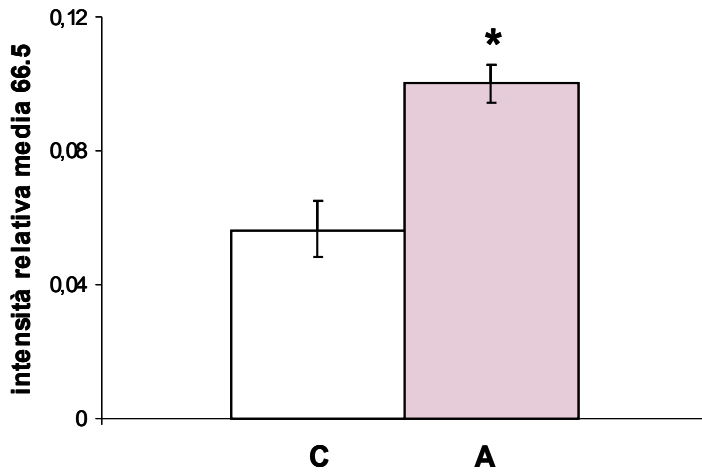


Figura 12: intensità relativa media della proteina da 66.5 kDa nella frazione P2 degli emisferi cerebrali di un ratto di controllo (n=2) **C** □, e di ratti (n=5) sacrificati dopo 30' dal termine della seconda seduta di addestramento **A** ■.

Emisferi cerebrali

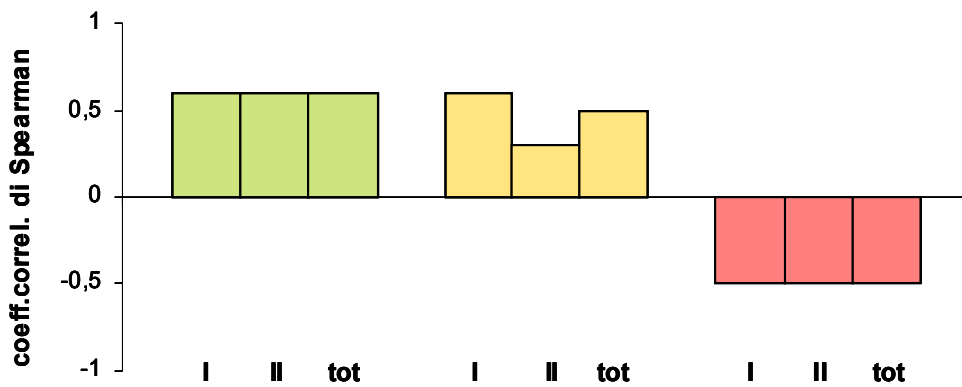


Figura13: analisi correlativa (coefficiente di correlazione di Spearman) fra l'intensità relativa della proteina da 66.5 kDa nella frazione P2 degli emisferi cerebrali ed il numero di risposte comportamentali esibite dagli animali (n=5) in I, II e sul totale (**tot**) delle sedute. Evitamenti ■, fughe ■, congelamenti ■.

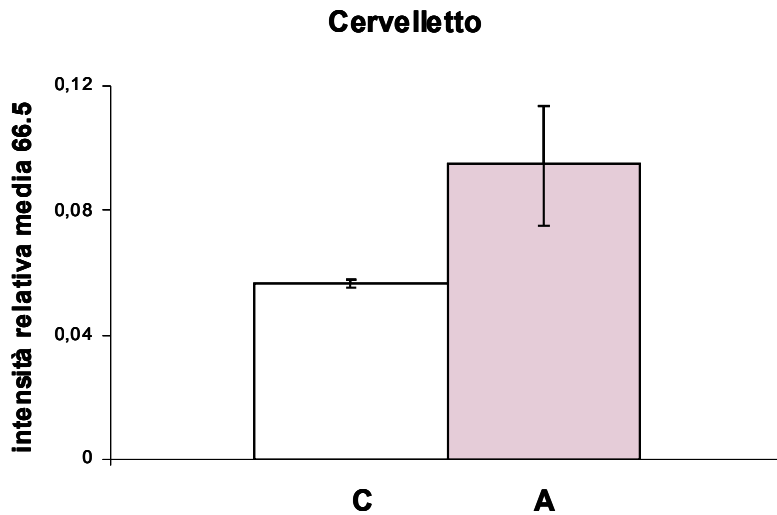


Figura 14: intensità relativa media della proteina da 66.5 kDa nella frazione P2 del cervelletto di ratti di controllo (n=2) **C** □, e di ratti (n=5) sacrificati dopo 30' dal termine della seconda seduta di addestramento □.

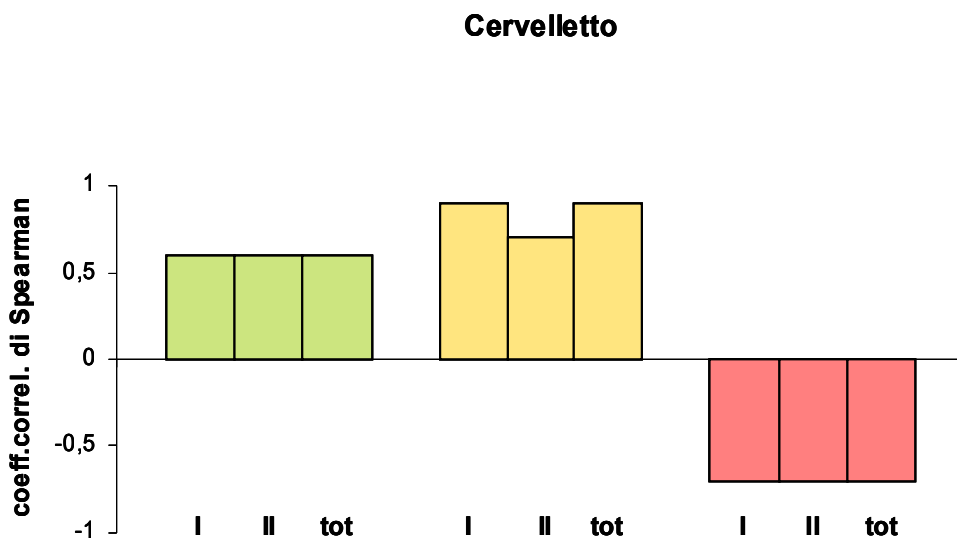


Figura 15: analisi correlativa (coefficiente di correlazione di Spearman fra l'intensità relativa della proteina da 66.5 kDa nella frazione P2 del cervelletto ed il numero di risposte comportamentali esibite dagli animali (n=5) in I, II e sul totale (tot) delle sedute. Evitamenti □, fughe □, congelamenti □.

Emisferi cerebrali

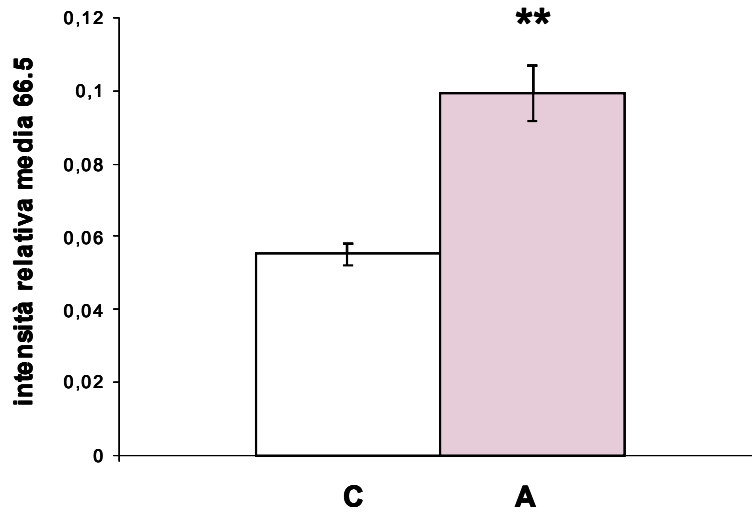


Figura 16 : intensità relativa media della proteina da 66.5 kDa nella frazione Syn degli emisferi cerebrali di un ratto di controllo (n=4) **C** e di ratti (n=8) sacrificati dopo 30' dal termine della seconda seduta di addestramento **A**.

Emisferi cerebrali

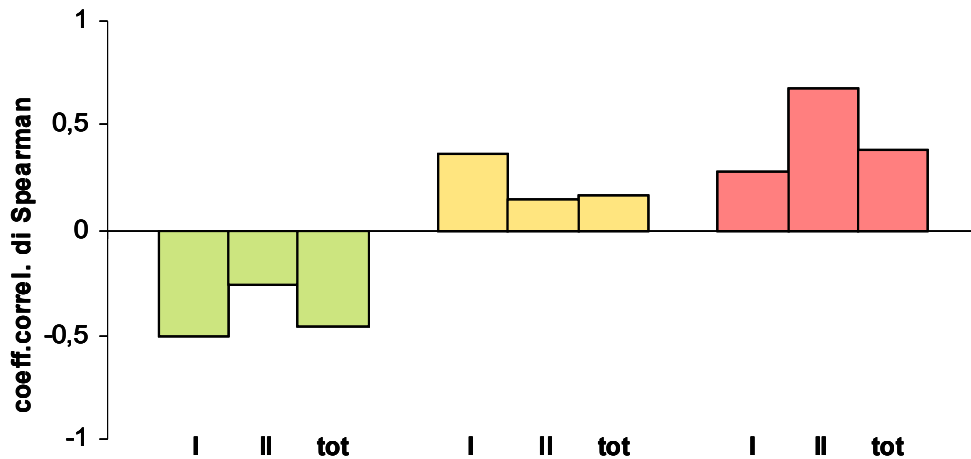


Figura 17: analisi correlativa (coefficiente di correlazione di Spearman) fra l'intensità relativa della proteina da 66.5 kDa nella frazione Syn degli emisferi cerebrali ed il numero di risposte comportamentali esibite dagli animali (n=8) in I, II e sul totale (**tot**) delle sedute.

Evitamenti █, fughe █, congelamenti █.

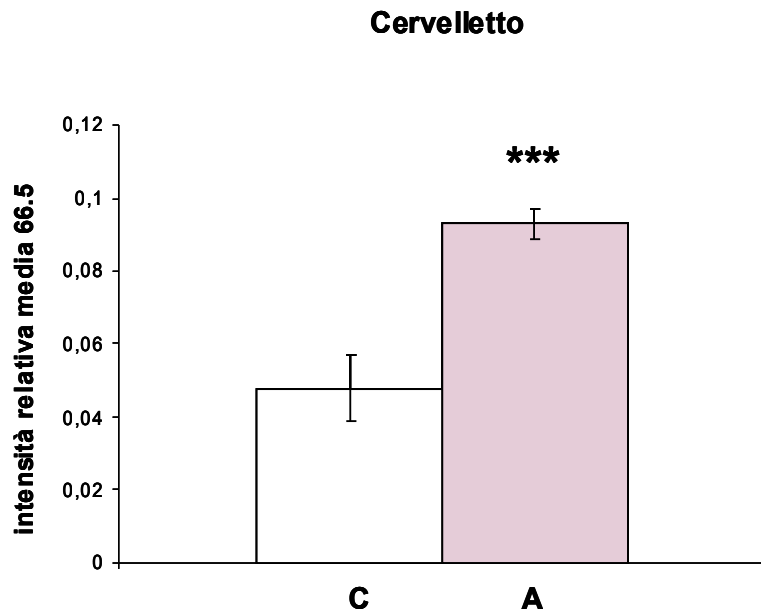


Figura 18: intensità relativa media della proteina da 66.5 kDa nella frazione Syn de l cervelletto di ratti di controllo (n=4) **C** □, e di ratti (n=8) sacrificati dopo 30' dal termine della seconda seduta di addestramento **A** ■.

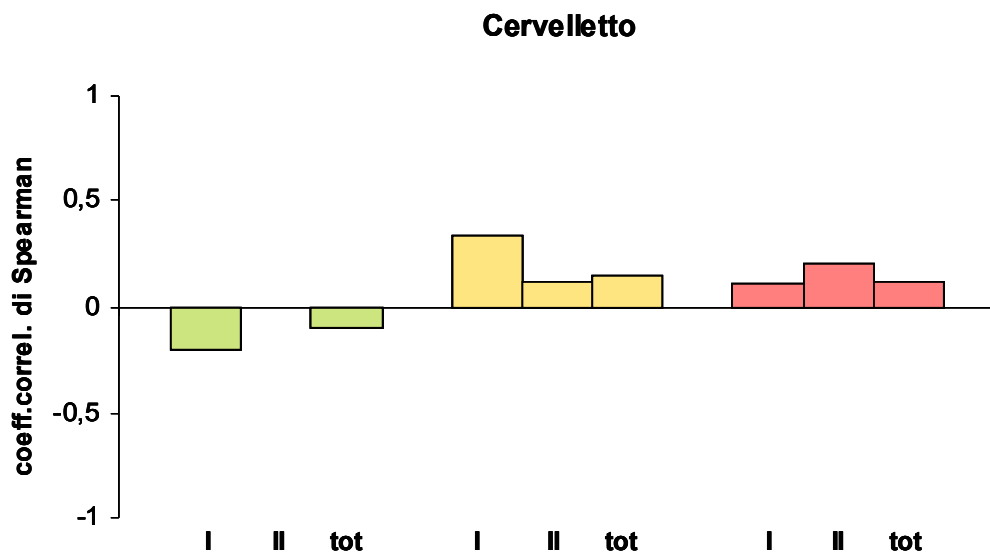
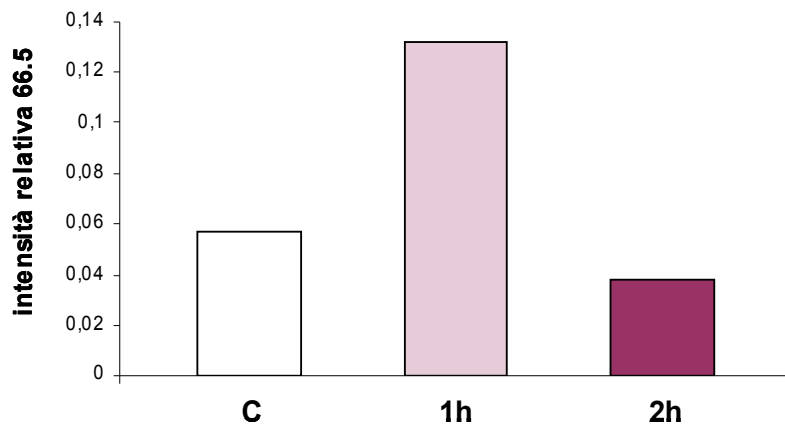


Figura 19: analisi correlativa (coefficiente di correlazione di Spearman fr a l'intensità relativa della proteina da 66.5 kDa nella frazione Syn del cervelletto ed il numero di risposte comportamentali esibite dagli animali (n=8) in I, II e sul totale (tot) delle sedute.

Evitamenti ■, fughe ■, congelamenti ■.

Emisferi cerebrali



Cervelletto

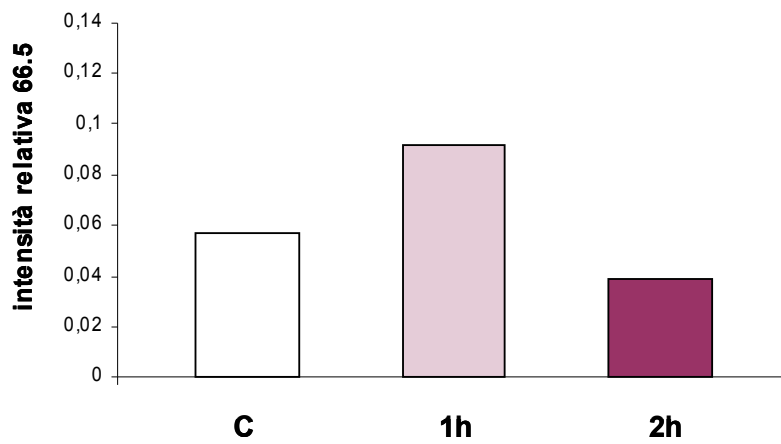





Figura 21: intensità relativa della proteina da 66.5 kDa nella frazione P2 del cervelletto di un ratto di controllo **C**  e di ratti (n=2) sacrificati dopo 60'  e 120'  dal termine della seconda seduta di addestramento.

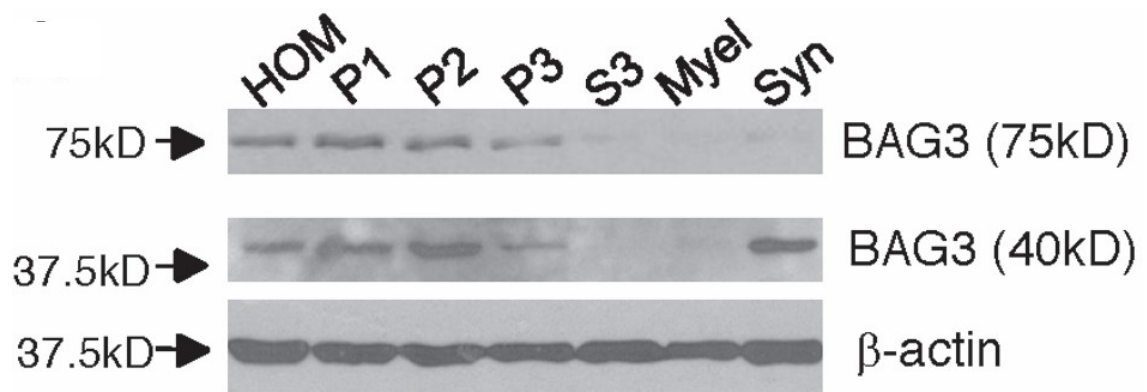


Figura 22: presenza della forma ad alto (75kDa) e a basso (40kDa) peso molecolare della proteina BAG3 nelle frazioni subcellulari degli emisferi cerebrali.

Bibliografia

- Alemà S. and Giuditta A., (1976). *Site of biosynthesis of brain-specific proteins in the giant fibre system of the squid*. J. Neurochem. 26: 995-999.
- Alvarez J., Giuditta A., Koenig E., (2000). *Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory*. Progr. Neurobiol. 62: 1-62.
- Alvarez J., Torres J.C., (1985). *Slow axoplasmic transport: a fiction?* J. Theor. Biol. 112: 627-651.
- Austin L. and Morgan I.G., (1967). *Incorporation of ¹⁴C-labelled leucine into synaptosomes from rat cerebral cortex in vitro*. J. Neurochem. 14: 377-387.
- Austin L., Morgan I.G., (1968). *Synaptosomal protein synthesis in a cell-free system*. J. Neurochem. 15: 41-45.
- Autilio L.A., Appel S.H., Pettis P., Gambetti P.L., (1968). *Biochemical studies of synapses in vitro*. I. Protein synthesis. Biochemistry, 7: 2615- 2622.
- Brady S.T., (1991). *Molecular motors in the nervous system*. Neuron, 7: 521-533.
- Bruno A.P., Festa M., Dal Piaz F., Rosati A., Turco M.C., Giuditta A., Marzullo L., (Epub 2008 Oct 12). *Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein*. Cell Cycle, 2008 Oct; 7(19): 3104-5.
- Bunge M.B., (1973). *Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture*. J. Cell. Biol. 56:713-735.
- Cotman C.W. and Taylor D.A., (1971). *Autoradiographic analysis of protein synthesis in synaptosomal fractions*. Brain. Res. 29: 366-372.
- Crispino M., Perrone Capano C., Aiello A., Iannetti E., Capello A., & Giuditta A., (2001). *Messenger RNAs in synaptosomal fractions from rat brain*. Mol. Brain Res. 97: 91-96.
- Cutillo V., Montagnese P., Gremo F., Casola L. & Giuditta A., (1983). *Origin of axoplasmic RNA in the squid giant fibre*. Neurochem. Res. 8, 1621-1634.
- De Robertis E., De Iraldi A.P., Rodriguez G., and Gomez J., (1961). *On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 229-235.
- Edström A., Edström J.E., and Hökfelt T., (1969). *Sedimentation analysis of ribonucleic acid extracted from isolated Mauthner nerve fibre components*. J. Neurochem. 16, 53-66.
- Eyman M., Cefaliello C., Ferrara E., De Stefano R., Scotto Lavina Z., Crispino M., Squillace A., van Minnen J., Kaplan B.B. and Giuditta A., (2007a). *Local synthesis of RNA in axons and nerve terminals*. Eur. J. Neurosci. 25: 341-350.
- Eyman M., Cefaliello C., Ferrara E., Mandile P., Crispino M., and Giuditta A., (2007b). *Synaptosomal protein synthesis from rat brain is selectively modulated by learning*. Brain Res. 1132: 148-157.
- Gainer H., Tasaki I. and Lasek R.J., (1977). *Evidence for the glia-neuron protein transfer hypothesis from intracellular perfusion studies of squid giant axons*. J. Cell. Biol. 52: 526-535.
- Gambetti P., Autilio-Gambetti L.A., Gonatas N.K., and Shafer B., (1972). *Protein synthesis in synaptosomal fractions. Ultrastructural radioautographic study*. J. Cell. Biol. 52: 526-535.
- Gilbert C.D. and Wiesel T.N., (1992). *Receptive field dynamics in adult primary visual cortex*. Nature, 356:150-152.

- Giuditta A., Chun J.T., Eyman M., Cefaliello C., Bruno A.P. and Crispino M., (2008). *Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit*. *Physiol. Rev.* 88: 515-555.
- Gioio A.E., Chun J.T., Crispino M., Capano C.P., Giuditta A. Kaplan B.B., (1994). *Kinesin mRNA is present in the squid giant axon*. *J. Neurochem.* 63: 13-18.
- Giuditta A, Dettbarn W.D, and Brzin M., (1968). *Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 1284-1287.
- Giuditta A., Eyman M., Cefaliello C., Ferrara E., Kaplan B.B., Scotto Lavina Z., and De Stefano R., (2004). *Local synthesis of presynaptic RNA in squid optic lobe slices*. *Biol. Bull.* 207: 156.
- Giuditta A., Eyman, M. & Kaplan, B.B., (2002b). *Gene expression in the squid giant axon: neurotransmitter modulation of RNA transfer from periaxonal glia to the axon*. *Biol. Bull.* 203, 189-190.
- Giuditta A., Hunt T., and Santella L., (1986). *Messenger RNA in squid axoplasm*. *Neurochem. Intern.* 8: 435- 442.
- Giuditta A., Menichini E., Perrone Capano C., Langella M., Martin R., Castigli E., and Kaplan B.B., (1991). *Active polysomes in the axoplasm of the squid giant axon*. *J. Neurosci. Res.* 26: 18-28.
- Giuditta A., Metafora S., Felsani A., and Del Rio A.,(1977). *Factors for protein synthesis in the axoplasm of squid giant axons*. *J Neurochem* 28: 1393-1395.
- Giuditta A., Kaplan B.B., van Minnen J., Alvarez J., Koenig E., (2002a). *Axonal and presynaptic protein synthesis: New insights into the biology of the neuron*. *TINS* 25: 400-404.
- Grafstein B. and Forman D.S., (1980). *Intracellular transport in neurons*. *Physiol. Rev.* 60: 1167-1283.
- Jirikowsky G.F., Sanna, P.P., Bloom, F.E., (1990). *mRNA coding for oxytocin is present in axons of hypothalamo-neurohypophyseal tract*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 7400-7404.
- Kaplan, B.B., Gioio, A.E., Perrone Capano, C., Crispino, M., Giuditta, A., (1992). *β -actin and β -tubulin are components of heterogeneous mRNA population present in squid giant axon*. *Mol. Cell. Neurosci.* 3: 133-144.
- Koenig E. and Martin R., (1996). *Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon*. *J. Neurosci.* 16: 1400-1411.
- Koenig E., Martin R., Titmus M., and Sotelo-Silveira J.R., (2000). *Criptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons*. *J. Neurosci.* 20: 8390-8400.
- Lasek R.J., Dabrowski C., and Nordlander R., (1973). *Analysis of axoplasmic RNA from invertebrate giant axons*. *Nature New Biol.* 244: 162-165.
- Lasek R.J., Gainer H., and Przybylski R.J., (1974). *Transfer of newly-synthesized proteins from Schwann cells to the squid giant axon*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1188-1192.
- Menichini E., Castigli E., Kaplan B.B. & Giuditta, A., (1990). *Synthesis of axoplasmic RNA particles in the isolated squid giant axon*. *Neurosci. Res. Commun.* 7, 89-96.
- Montarolo P. G., Goelet P., Castellucci V .F., Morgan J., Kandel E.R., Schacher S., (1986). *A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia*. *Science*, 234: 1249-1254.
- Mohr E. and Richter D., (1992). *Diversity of messenger RNAs in the axonal compartment of peptidergic neurons in the rat*. *Eur. J. Neurosci.* 4: 870-876.
- Nixon R., (1980). *Protein degradation in the mouse visual system. Part I: Degradation of axonally transported and retinal proteins*. *Brain. Res.* 200:69-83.

Otani S., Marshall C.J., Tate W.P., Goddard G.V., Abraham W.C., (1989). *Maintenance of long-term potentiation in rat dentate gyrus requires protein synthesis but not messenger RNA synthesis immediately post-tetanzation*. Neuroscience, 28: 519-526.

Peters A., Palay S.L., Webster H. F. (1970). *The fine structure of the nervous system*. Harper & Row.

Perrone Capano C., Giuditta A., Castigli E., Kaplan B.B., (1987). *Occurrence and sequence complexity of polyadenylated RNA in squid axoplasm*. J. Neurochem. 49: 698-704.

Petrushka E. and Giuditta A., (1959). *Electron microscopy of two subcellular fractions isolated from cerebral cortex homogenate*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 6: 129-132.

Rao A. and Steward O., (1991). *Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specialization are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes*. J. Neurosci. 11: 2881-2895.

Rapallino M.V., Cupello A. & Giuditta A., (1988). *Axoplasmic RNA species synthesized in the isolated squid giant axon*. Neurochem. Res. 13, 625-631.

Shartz C.J., (1990). *Impulse activity and the patterning of connection during CNS development*. Neuron, 5:745-756.

Sieghart W. and Singer E., (1979). *Sedimentation and release properties of glial particles present in P2-fractions isolated from rat cerebral cortex*. Brain. Res. 170: 203-208.

Steward, O. & Schuman, E.M., (2003). *Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons*. Neuron, 40: 347-359.

Takayama S., Xie Z., Reed J.C., (1999). *An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators*. J. Biol. Chem. 274:781-786.

Tennyson VM., (1972). *The Fine structure of the axon growth cone of the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo*. J. Cell. Biol.44: 62-79.

Trembleau A., Morales M., Bloom, F.E., (1996). *Differential compartmentalization of vasopressin mRNA and neuropeptide within the rat hypothalamo-neurohypophyseal axonal tracts: light and electron microscopic evidence*. Neurosci. 70: 113-125.

van Minnen J., Bergman J.J., van Kesteren E.R., Smit A.B., Garaerts W.P., Lukowiak K., Hasan S.U., Syed N.I., (1997). *De novo protein synthesis in isolated axons of identified neurons*. Neuroscience, 80: 1-7.

von Bernhardi R. and Alvarez, J., (1989). *Is the supply of axoplasmic proteins a burden for the cell body? Morphometry of sensory neurons and amino acid incorporation into their cell bodies*. Brain Res. 478: 301-308.

Weiss P. and Hiscoe H.B., (1948). *Experiments on the mechanism of nerve growth*. J. Exp. Zool. 107: 315-393.

Wensley C.H., Stone D.M., Kauer J.S., Margolis F.L., Chikaraishi D.M., (1995). *Olfactory marker protein mRNA is found in axon of olfactory neurons*. J. Neurosci.15: 4827-4837.

Whittaker V.P., and Greengard P., (1971). *The isolation of synaptosomes from the brain of a teleost fish, Centripristes striatus*. J. Neurochem., 18: 173-176.

Comunicazioni a congressi e pubblicazioni

Bruno A.P., Festa M., Dal Piaz F., Rosati A., Turco M.C., Giuditta A., Marzullo L., (Epub 2008 Oct 12). *Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein*. Cell Cycle, 2008 Oct; 7(19): 3104-5.

Giuditta A., Chun J.T., Eyman M., Cefaliello C., Bruno A.P. and Crispino M., (2008). *Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit*. Physiol. Rev.88: 515-555.

Giuditta A., Chun J.T., Eyman M., Cefaliello C., Bruno A.P., Crispino M. (2007). *Axonal and presynaptic RNAs are locally transcribed in glial cells*. Riv. Biol. May-Aug;100(2):203-19. Review.

Giuditta A., Cefaliello C., Bruno A.P., Castaldo S. and Crispino M. (2008). *Memory processing times in rat neocortex and cerebellum*. Proceedings of the Meeting “Genes at work on time”, page 28; Torino 15-18 ottobre.