

1. INTRODUZIONE

Il sistema nervoso si è evoluto di pari passo con il grado di complessità degli organismi per la necessità che essi hanno di comunicare con l'ambiente esterno. Il crescente numero di informazioni e la necessità di rispondere a varie sollecitazioni, ha poi creato l'esigenza di una organizzazione strutturale e funzionale sempre più complessa che permetta di meglio acquisire le informazioni, di integrarle con quelle precedentemente acquisite, e di elaborare una risposta adeguata.

Queste funzioni basilari risiedono in circuiti neuronali caratterizzati da specifiche connessioni sinaptiche. E' proprio sulla capacità di modificare e rimaneggiare queste connessioni (plasticità sinaptica) che si basano i processi cognitivi e comportamentali. Il riarrangiamento di circuiti richiede variazioni nel corredo proteico sinaptico e quindi modulazioni dell'espressione genica.

Questo ultimo punto ha ispirato numerose ricerche volte ad indagare le caratteristiche e le modalità di attivazione del sistema locale di espressione genica operante per il territorio sinaptico, che rappresenta la sede primaria delle variazioni plastiche del sistema nervoso.

1.1 Generalità

Il sistema nervoso è costituito da due tipi principali di cellule: neuroni e cellule gliali. I neuroni sono cellule fortemente polarizzate, nelle quali si distinguono tre compartimenti funzionalmente distinti: soma (o corpo cellulare, o pericario); dendriti; assone e terminazioni nervose. Le distanze spesso notevoli che separano tra loro questi compartimenti giustificano la polarizzazione morfologica e funzionale che caratterizza le cellule nervose, la cui principale funzione è quella di captare, e trasmettere messaggi all'interno dell'organismo.

Tuttavia, le proprietà del sistema nervoso non risiedono tanto nella diversa specializzazione dei singoli elementi che lo compongono, quanto nelle particolari connessioni che essi intrattengono tra loro, e che ne permettono l'organizzazione in circuiti anatomicamente ben definiti.

Tali connessioni prendono il nome di sinapsi e rappresentano il punto di contatto tra la terminazione assonale di un neurone che invia lo stimolo (elemento presinaptico), ed il compartimento dendritico o somatico di un altro neurone che lo riceve (elemento postsinaptico). Se tra i due elementi esiste una continuità cellulare si parla di sinapsi elettriche. Tuttavia nella maggior parte dei casi un sottile spazio (fessura sinaptica) separa i due elementi che vengono a costituire una sinapsi chimica. In questo caso lo stimolo elettrico dell'elemento presinaptico si trasforma in un segnale chimico realizzato dal rilascio di un

neurotrasmettitore nella fessura sinaptica. Il successivo legame del neurotrasmettitore ai recettori della membrana postsinaptica genera variazioni di conduttanza che possono rigenerare il segnale elettrico.

Il compartimento dendritico è costituito da numerosi processi variamente ramificati che originano dal soma e sono principalmente deputati a ricevere gli stimoli.

D'altra parte, il soma oltre a contenere nucleo e citoplasma, promuove l'integrazione degli stimoli provenienti da contatti sinaptici che eventualmente danno luogo ad un nuovo segnale. L'assone infine è l'altro tipo di prolungamento che origina dal soma, a livello del cono di emergenza. Esso può raggiungere lunghezze notevoli e alla sua estremità distale produce una fitta arborizzazione, sfioccandosi in molti terminali nervosi, mediante i quali realizza contatti sinaptici con altre cellule.

Le cellule gliali fungono da elementi di sostegno per i neuroni. Durante lo sviluppo guidano la migrazione dei neuroni e la crescita dei loro assoni, dando forma e struttura al tessuto nervoso. Inoltre, esse garantiscono l'efficienza dei meccanismi di comunicazione dei segnali nervosi attraverso la formazione della guaina mielinica che ricopre gli assoni, e attraverso il controllo dell'ambiente interstiziale delle cellule nervose. Le cellule gliali contribuiscono infatti alla formazione della barriera emato-encefalica che regola gli scambi tra le cellule nervose ed i capillari cerebrali, e possono esercitare una funzione fagocitaria. Accanto a queste funzioni esse sono in grado di liberare fattori di crescita specifici.

La particolare morfologia dei neuroni, e la presenza di assoni e terminazioni nervose che costituiscono fino al 90% della loro massa totale, ha portato all'evoluzione di un meccanismo di trasporto che provvede al supporto trofico della periferia da parte del corpo cellulare. Tale meccanismo, scoperto da Weiss ed Hiscoe nel 1948, prende il nome di flusso assoplasmatico. Esso affida esclusivamente al soma la sopravvivenza e la funzionalità dei compartimenti periferici. Sarebbe infatti il soma a sintetizzare le proteine necessarie per il mantenimento ed il riarrangiamento sinaptico alla base dei fenomeni plastici.

Quest'ultima affermazione ha dato adito a diverse critiche, che hanno suggerito nuove linee di ricerca i cui risultati hanno attribuito alla periferia neuronale un'importanza certamente maggiore.

1.2 Sintesi proteica locale nel compartimento assonale

Le principali obiezioni ad un'origine esclusivamente pericariale delle proteine assonali (Alvarez e Torres, 1985) riguardano:

- i) l'incompatibilità tra i tempi di trasporto verso le regioni più distali (Grafstein et al, 1980, Baas, e Brown, 1997) e la vita media delle proteine trasportate (Nixon, 1998)
- ii) la relativa autonomia trofica dell'assone (Bittner 1991) la necessità di un meccanismo di segnalazione a due vie tra pericario e terminazioni nervose al fine di garantire l'approvvigionamento di proteine alle sole sinapsi che ne abbiano fatto richiesta
- iii) L'indipendenza delle dimensioni del corpo cellulare da quelle del compartimento assonale (von Bernhardi e Alvarez 1989)

Appare quindi impossibile sostenere che il flusso assoplasmatico possa da solo rendere possibile il mantenimento della periferia neuronale. D'altra parte tutte le obiezioni verrebbero facilmente risolte dall'esistenza di un sistema di sintesi proteica locale in grado di contribuire in maniera rilevante al mantenimento delle regioni più distali del neurone ed alle variazioni plastiche esibite dalle ramificazioni assonali e dalle terminazioni nervose.

Questa visione ha incontrato un generale scetticismo ed è ancora oggi esclusa dai libri di testo (Kandel 2003; Principi di Neuroscienze) nonostante la convincente evidenza a favore di un sistema di sintesi proteica assonale e presinaptica (Koenig e Giuditta, 1999; Alvarez et al, 2000; Giuditta et al, 2002).

Gran parte di questi dati sono stati ottenuti su sistemi modello, come l'assone di Mauthner del pesce rosso e l'assone gigante del calamaro, le cui grandi dimensioni permettono di separare il compartimento assonale da quello gliale, e di ottenere un campione di assoplasma praticamente puro. In questi sistemi l'assone è capace di incorporare amminoacidi radioattivi in proteine assoplasmatiche grazie ad un meccanismo sensibile agli inibitori della sintesi proteica ed indipendente dal corpo cellulare (Giuditta et al, 1968; Koenig, 1984; Alvarez et al., 2000 per rassegna). Nell'assone di Mauthner alcune di queste proteine neosintetizzate sono state identificate come proteine del citoscheletro quali neurofilamento leggero e intermedio, α e β -tubuline, e actina (Koenig E., 1991).

1.2.1 RNA assonali

Una delle principali ragioni per cui gli assoni erano ritenuti incapaci di sintetizzare proteine era basata sulla presunta mancanza di ribosomi suggerita da osservazioni di microscopia elettronica convenzionale. Faceva eccezione il segmento iniziale degli assoni (Pannese e Ledda, 1991). Prove indirette dell'esistenza di ribosomi nel compartimento assonale sono venute dall'identificazione di rRNA nell'assone di Mauthner (Edstrom et al., 1969; Koenig, 1979) e nell'assone gigante di calamaro (Giuditta et al., 1980).

Questi dati sono stati confermati da risultati ottenuti con la tecnica ESI (electron spectroscopic imaging) che rimuove le ambiguità legate alla microscopia elettronica convenzionale, e che ha permesso di rivelare la presenza di ribosomi e polisomi biologicamente attivi nell'assone gigante del calamaro (Martin et al., 1989; Giuditta et al., 1991). La presenza di ribosomi nell'assone gigante del calamaro è stata anche confermata con altri metodi di analisi (Bleher, e Martin, 2001; Sotelo et al., 1999).

Risultati simili sono stati ottenuti anche negli assoni di vertebrati (Koenig et al., 2000; Koenig e Martin, 1996), nei quali i ribosomi sono presenti in organelli periferici distribuiti lungo tutto l'assone (placche periassoplasmatiche). Il piccolo spessore di tali organelli e la loro distribuzione intermittente spiegano in gran parte il perchè della loro mancata identificazione con la microscopia elettronica convenzionale.

L'assoplasma dell'assone gigante del calamaro contiene anche tutti i fattori solubili necessari per la sintesi proteica, compresi fattori di trascrizione (Giuditta et al., 1977), tutte le specie di tRNA (Ingoglia et al., 1983) ed una popolazione eterogenea di mRNA che codifica per almeno 100-200 proteine (Giuditta et al., 1986; Perrone Capano et al., 1987).

La concentrazione degli mRNA assoplasmatici differisce da quella dei corrispondenti corpi neuronali (Koenig E. e Giuditta A., 1999; Giuditta et al., 2002). La clonazione di questi mRNA ha consentito di stabilire che essi codificano per molte proteine del citoscheletro come β -actina e β -tubulina (Kaplan et al., 1992), chinesina (Gioio et al., 1994), proteine del neurofilamento (Giuditta et al., 1991), ma anche enzimi come l'enolasi (Chun et al., 1995), e proteine canale come un peptide con alta omologia per una proteina del reticolo sarcoplasmatico (Chun et al., 1997). 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, hanno successivamente riguardato la presenza di mRNA che codificano per diversi tipi di proteine negli assoni di altri modelli animali. Negli assoni dei molluschi *Aplysia californica* e *Lymnea stagnalis* sono presenti mRNA per codificano per neuropeptidi (van Minnen J., 1994, Landry et al., 1991). Inoltre nell'assoplasma dell'assone di Mauthner è stato evidenziato l'mRNA per il neurofilamento intermedio (Weiner et al., 1996). In assoni localizzati nel tratto posteriore della neuroipofisi del ratto sono stati trovati mRNA codificanti per ossitocina (Jirikowsky, 1990), neuropeptidi e NF-L (Mohr e Richter, 1992), vasopressina (Trembleau et al., 1996). La presenza di questi messaggeri lascia supporre un loro coinvolgimento in processi locali di traduzione, come è stato effettivamente dimostrato in neuroni di *Lymnea stagnalis* in coltura (van Minnen et al., 1997).

1.3 Sintesi proteica nelle terminazioni nervose

La dimostrazione di un attivo sistema di sintesi proteica nell'assone gigante del calamaro e l'evidenza a favore di un'analoga situazione nel compartimento assonale dei vertebrati, hanno guidato una serie di indagini simili nelle terminazioni nervose, studiate prevalentemente *in vitro* come strutture vescicolari derivate dalle regioni sinaptiche: i **sinaptosomi**.

1.3.1 Sinaptosomi di cervello di ratto

In seguito ad omogeneizzazione del tessuto cerebrale le membrane plasmatiche delle terminazioni nervose e dei sottili prolungamenti dendritici e gliali tendono a fondersi, generando strutture vescicolari (Whittaker, 1993) che includono tutti i componenti presenti *in vivo*. Pertanto i sinaptosomi rappresentano un ottimo modello per lo studio delle funzioni sinaptiche *in vitro*.

I sinaptosomi si ottengono per centrifugazione differenziale dell'omogenato e successiva purificazione attraverso un gradiente discontinuo di Ficoll; si giunge così alla separazione di tre frazioni principali. La frazione mitocondriale al fondo del gradiente, la frazione sinaptosomale nella parte intermedia e la frazione mielinica nella parte meno densa.

Al microscopio elettronico la frazione sinaptosomale si presenta costituita quasi esclusivamente da strutture rotondeggianti limitate da membrana, del diametro di 0,2-0,8 μm . Le terminazioni nervose, identificabili grazie alla presenza di vescicole sinaptiche ed uno o più mitocondri intraterminali, rappresentano la componente maggiore della preparazione, che contiene anche mitocondri liberi, frammenti dendritici, e processi gliali (Autilio et al., 1968).

Una moltitudine di dati della letteratura (per rassegna Whittaker 1993 e Alvarez et al 2000) hanno evidenziato che un sistema di sintesi proteica è presente nei sinaptosomi, e che tale sistema:

- è racchiuso da membrana perché protetto dall'azione dell'RNAsi (Morgan e Austin 1968);
- include l'attività di almeno due sistemi di sintesi proteica: uno mitocondriale sensibile al cloramfenicolo ed uno citoplasmatico sensibile alla cicloesimide;
- è fortemente influenzato dalla composizione ionica del mezzo ed è indipendente da fonti di energia esogene (Autilio et al., 1968).

La localizzazione di questo sistema è molto controversa. Infatti studi iniziali, condotti in particolare con metodi autoradiografici, hanno mostrato la prevalente localizzazione delle

proteine neosintetizzate in strutture presinaptiche (Cotman e Taylor, 1972; Gambetti et al., 1972). Una serie di risultati successivi, basati sulla opinione di una sostanziale assenza di sintesi proteica nel compartimento assonale e presinaptico, erano invece a favore di una esclusiva localizzazione dendritica (Rao e Steward, 1991) e in minor misura gliale (Henn et al., 1976; Sieghart e Singer, 1979). Questa diversa opinione ha trovato conferma nella dimostrazione di polisomi biologicamente attivi nelle spine dendritiche e nelle regioni sub-sinaptiche (Steward e Shuman, 2003).

Tuttavia diverse linee di ricerca hanno continuato a sostenere l'ipotesi di una sintesi proteica presinaptica (Koenig e Giuditta, 1999; Alvarez et al., 2000; Giuditta et al., 2002). In particolare numerosi dati ottenuti nei sinaptosomi del calamaro hanno dimostrato inequivocabilmente la localizzazione presinaptica di un sistema di sintesi proteica (vedi paragrafo successivo). In accordo con queste linee di ricerca sono anche i dati relativi alla presenza di diversi mRNA nelle regioni presinaptiche (Alvarez et al 2000) come ad esempio l'mRNA per OMP (olfactory marker protein) presente nelle terminazioni nervose dei neuroni olfattivi del ratto (Wensley et al 1995). Inoltre risultati ottenuti con tecniche RT-PCR semiquantitative hanno dimostrato il selettivo arricchimento di mRNA per GAT-1, una proteina presinaptica nella frazione sinaptosomale di cervello di ratto (Crispino et al 2001).

In recenti esperimenti, indirizzati alla valutazione della dipendenza della sintesi proteica sinaptosomale dalla composizione ionica del mezzo e dalla concentrazione citosolica dello ione calcio, è emerso che nel cervello di ratto la sintesi proteica sinaptosomale riflette l'attività di più di un sistema citoplasmatico di sintesi proteica (Eyman et al., manoscritto inviato per la pubblicazione) uno dei quali a localizzazione sicuramente presinaptica come emerso da indagini di tipo morfologico. Questi ultimi dati sono in pieno accordo con l'estrema eterogeneità della frazione sinaptosomale di cervello di mammifero che, come accennato, contiene anche elementi di derivazione gliale e post-sinaptica.

1.3.2 Sinaptosomi di lobo ottico di calamaro

Molte delle difficoltà legate all'eterogeneità della frazione sinaptosomale di cervello di mammifero non sussistono negli invertebrati, il cui utilizzo per la preparazione di sinaptosomi offre i seguenti vantaggi:

- assoni privi di guaina mielinica, il che riduce l'eterogeneità delle particelle presenti nell'omogenato;
- minor numero di cellule gliali, che riduce notevolmente il grado di contaminazione da parte di queste strutture;

- sinapsi di tipo asso-assonico, che esclude la contaminazione da parte dei frammenti dendritici;
- isolamento della frazione sinaptosomale come pellicola galleggiante, che protegge la struttura dei sinaptosomi.

In particolare, il calamaro offre un modello particolarmente vantaggioso sia per i motivi sopraesposti, sia per la particolare struttura dei lobi ottici che costituiscono la parte prevalente del cervello. Come mostrato nello schema della Fig. 1, le grandi terminazioni nervose dei fotorecettori retinici terminano appunto nei lobi ottici dove, in seguito all'omogenizzazione del tessuto, danno origine a sinaptosomi altrettanto grandi (Crispino et al. 1993a).

Una prima indicazione della presenza di un sistema di traduzione nelle grandi terminazioni nervose del lobo ottico è venuta da analisi immunochimiche che hanno dimostrato la loro capacità di sintetizzare proteine del neurofilamento diverse dalle quelle sintetizzate nei corpi cellulari (Crispino et al., 1993b).

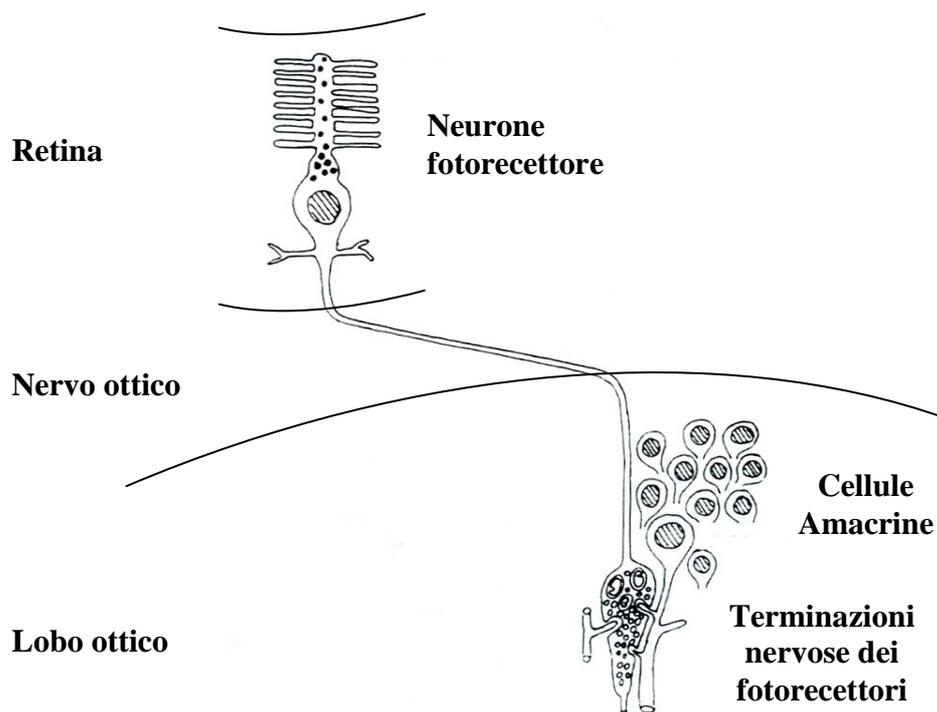


FIGURA 1, schema della localizzazione anatomica del corpo cellulare e della terminazione nervosa del fotorecettore retinico del calamaro.

Tuttavia, come per l'assone gigante del calamaro, l'evidenza più convincente è stata di tipo morfologico. Si è infatti dimostrato che questi grandi sinaptosomi sono le uniche strutture sinaptosomali che mostrano un'attività di sintesi proteica rilevabile da analisi autoradiografiche e sono anche le uniche strutture contenenti polisomi attivi (Crispino et al., 1997). Questi ultimi dati sono stati confermati con altri metodi di analisi (Martin et al., 1998) e sono la prova inequivocabile dell'esistenza di un sistema di sintesi proteica nelle terminazioni nervose.

Anche nel calamaro la sintesi proteica sinaptosomale è strettamente dipendente dalla composizione ionica del mezzo nonché fortemente influenzata dalla concentrazione citoplasmatica dello ione calcio (Crispino et al., 1993a, Benech et al., 1999).

Nei grandi sinaptosomi del lobo ottico è stata identificata una famiglia eterogenea di mRNA (Gioio et al., 2004), che in un recente studio con metodi di spettrometria di massa, sono in grado di sintetizzare almeno 80 specie proteiche, tra cui proteine mitocondriali codificate dal nucleo, proteine del citoscheletro, enzimi, calcexina (una proteina legata all'apprendimento) e la proteina hsp70 (Jimenez et al., 2002; Gioio et al., 2001; Crispino et al., 1993b; Eyman et al., 2003).

E' opportuno sottolineare che gli mRNA presinaptici del calamaro codificano per proteine mitocondriali codificate dal DNA nucleare. Questi ultimi dati puntualizzano infatti l'importanza della sintesi proteica locale nel processo di mantenimento e proliferazione dei mitocondri presinaptici e giustificano la stretta vicinanza di aggregati di ribosomi ai mitocondri presinaptici ed assionali (Bleher et al 2001).

1.3 Origine degli RNA extrasomatici

La dimostrazione di un attivo sistema di sintesi proteica negli assoni e nelle terminazioni nervose ha sollevato il problema dell'origine degli RNA necessari al processo locale di traduzione. Le obiezioni sollevate dall'idea di un'esclusiva origine pericariale delle proteine della periferia neuronale valgono anche per l'RNA. Pertanto anche per gli RNA assionali e presinaptici si è valutata la possibilità di una sintesi locale.

Questa ultima ipotesi ha guidato diversi esperimenti condotti principalmente su sistemi modello di grandi dimensioni. Analisi di sedimentazione di RNA estratto dall'assone di Mauthner incubato con uridina radioattiva, hanno rilevato la presenza di rRNA e tRNA tra le specie assoplasmatiche neosintetizzate. In assenza delle cellule gliali periassionali l'unica specie rinvenibile era RNA 4S presumibilmente di origine mitocondriale (Edstrom et al., 1969). Risultati simili sono stati ottenuti anche con l'assone gigante del calamaro (Cuttillo et

al.1983). Successivi studi hanno caratterizzato le specie di RNA assoplasmatico sintetizzato dall' assone gigante isolato, identificandoli nelle tre principali classi di tRNA, rRNA e mRNA (Rapallino et al., 1988). Poiché nell'assone isolato sono assenti i corpi neuronali, l' RNA neosintetizzato può provenire solo dalle cellule gliali periassonali, le uniche fornite del templatato di DNA nucleare necessario al processo di trascrizione. Questi risultati hanno fornito le prime indicazioni a favore di un trasferimento di RNA glia-assone. Tale trasferimento riguarda anche particelle ribosomali come dimostrato da analisi della velocità di sedimentazione su gradienti di CsCl₂. (Menichini et al., 1990).

Prove più dirette sono venute da esperimenti condotti sull'assone gigante perfuso, nei quali si è osservato che la depolarizzazione selettiva della membrana assonale, ottenuta riducendo la concentrazione dello ione potassio nel liquido di perfusione, induce un marcato aumento della quantità di RNA radioattivo che compare nel perfusato. Un aumento simile è stato anche ottenuto aumentando la concentrazione dello stesso ione nel mezzo di incubazione, e quindi producendo la depolarizzazione anche delle cellule gliali periassonali. Questi effetti sono spiegabili ammettendo il rilascio di neurotrasmettitori da parte dell'assone, e la conseguente attivazione di recettori gliali (Lieberman et al 1994; Gafurov et al 2001). Questa ipotesi è stata verificata aggiungendo al mezzo di incubazione diversi agonisti dei recettori glutammatergici e colinergici presenti sulle cellule gliali periassonali (Giuditta et al., 2002). Anche in questo caso si è osservato un marcato aumento della quantità di RNA radioattivo che compare nel perfusato. Questi ultimi risultati sono in pieno accordo con l'ipotesi di un'origine gliale degli RNA assoplasmatici e forniscono la prima convincente prova di un trasferimento glia-assone mediato da un complesso sistema di segnalazione che regola la sintesi e/o il rilascio di RNA da parte delle cellule gliali.

Il meccanismo che permette un trasferimento intercellulare relativamente rapido di macromolecole e particelle subribosomali non è attualmente noto, ma qualche indizio in proposito è dato dall'osservazione che l'ingresso nell'assoplasma di proteine aggiunte al mezzo di incubazione dell'assone gigante del calamaro è potenziato dalla stimolazione elettrofisiologica dell'assone. (Giuditta et al 1971). Un origine gliale è stata inoltre proposta per spiegare la sintesi locale di proteine nell'assone gigante isolato (Gainer et al.1977; Lasek et al 1977) e la sopravvivenza prolungata degli assoni di gambero separati dai rispettivi corpi cellulari (Sheller et al 1992). D'altra parte, al di fuori del sistema nervoso, è ben noto che RNA sintetizzati nelle adiacenti cellule follicolari sono trasferiti agli oociti di vertebrati ed invertebrati (Mahajan-Miklos et al., 1994, Motta et al., 1995).

1.4 Plasticità sinaptica: apprendimento

Sebbene i dati fin qui descritti derivino da un numero relativamente limitato di sistemi sinaptici di invertebrati, essi aprono una nuova prospettiva nello studio dei fenomeni plastici del sistema nervoso, che includono, tra l'altro, fenomeni di crescita, differenziazione, e mantenimento della periferia neuronale.

D'altra parte numerosi dati sperimentali hanno sottolineato il coinvolgimento dei sistemi locali di sintesi proteica in questo tipo di processi. Ad esempio, in colture primarie di neuroni di *Aplysia*, assoni separati dai corpi cellulari crescono e sviluppano connessioni sinaptiche a condizione che la sintesi proteica locale non sia bloccata dall'anisomicina (Schacher et al., 2002). Inoltre la resezione del nervo sciatico del gatto causa un drastico aumento di sintesi proteica all'estremità del moncone prossimale rigenerante (Tobias et al., 1975).

Tuttavia uno degli aspetti più affascinanti riguarda il coinvolgimento dei processi locali di espressione genica nelle complesse funzioni cognitive e comportamentali.

Come inizialmente accennato, le funzioni cognitive sono basate in gran parte su variazioni plastiche a lungo termine delle regioni sinaptiche che richiedono attivazione genica e sintesi di nuove proteine (Montarolo et al., 1986; Otani et al., 1989). Pertanto, tra i problemi posti dall'esistenza di sistemi locali di sintesi proteica assonale e presinaptica risaltano in particolare quelli relativi al ruolo da essi svolto nella plasticità cerebrale.

In questo contesto si inseriscono i numerosi studi effettuati sul gasteropode marino *Aplysia* (per rassegna vedi Kandel 2001) che offre il vantaggio di possedere un numero limitato di neuroni facilmente identificabili, e si presta bene all'analisi di forme semplici di apprendimento (scheda 1). In neuroni di *Aplysia* in coltura si è dimostrata l'esistenza di un sistema di sintesi locale presinaptico che svolge un ruolo cruciale nella sensibilizzazione a lungo termine (Martin KC et al., 1997 e 2000; Kang e Shuman, 1996; Casadio et al., 1999). Una simile dipendenza è stata riportata anche per la facilitazione a lungo termine nel gambero (Beaumont et al., 2001).

In considerazione del fatto che le strategie cellulari e molecolari degli invertebrati sono presumibilmente conservate anche nei mammiferi, è ragionevole ipotizzare che il sistema di sintesi proteica sinaptosomale svolga un ruolo chiave *anche* nei fenomeni plastici del cervello di mammifero legati all'apprendimento.

Scheda 1

- ❖ **l'apprendimento non associativo** implica l'assenza di un'associazione tra stimoli diversi. In pratica l'animale non apprende un nuovo comportamento, ma impara a modulare la probabilità o l'intensità di una risposta comportamentale innata;
 - si definisce **abitudine** la riduzione di intensità di una risposta riflessa che si produce in seguito alla ripetizione dello stimolo che la ha evocata.
 - la **sensibilizzazione**, al contrario implica un aumento di intensità o di frequenza di una risposta riflessa in seguito ad uno stimolo sensibilizzante, in genere nocicettivo.
- ❖ **l'apprendimento associativo** implica un'associazione tra due stimoli e tra uno stimolo ed una risposta. La risposta comportamentale che ne risulta rappresenta in genere un nuovo e spesso migliore adattamento all'ambiente;
 - il **condizionamento classico** si ha quando uno stimolo inizialmente neutro (stimolo condizionato SC) è seguito da uno stimolo (stimolo innato SNC) in grado di indurre una certa risposta innata (RNC). La ripetuta presentazione di SC ed SNC porta alla formazione di una risposta acquisita (RC) identica alla RNC ma indotta da SC. Questo tipo di apprendimento non richiede l'espressione di un comportamento da parte dell'animale.
 - il **condizionamento operante** può essere visto come un condizionamento classico nel quale la formazione della RC richiede che l'animale esprima un comportamento, in genere diverso da quello istintivo.

2. ESPERIMENTI SUL CALAMARO

2.1 Scopo del lavoro sperimentale

La dimostrazione della presenza di un sistema locale di trascrizione degli RNA assoplasmatici da parte delle cellule gliali periassonali dell'assone gigante del calamaro, ci ha indotto a verificare l'esistenza di un analogo sistema nelle terminazioni nervose.

Come precedentemente sottolineato, i grandi sinaptosomi della frazione sinaptosomale dei lobi ottici del calamaro derivano esclusivamente dalle terminazioni nervose dei fotocettori retinici e sono i soli a contenere un attivo sistema di sintesi proteica.

La particolare situazione anatomica di queste strutture (Fig. 1) si presta bene ad un esame sperimentale dell'ipotesi di un origine locale dell'RNA presinaptico. Sono stati così eseguiti esperimenti in cui fettine di lobo ottico sono state incubate con un precursore radioattivo dell'RNA e si è poi valutata la presenza di RNA radioattivo nella corrispondente frazione sinaptosomale. Un risultato positivo dimostrerebbe la sintesi locale di RNA presinaptico, dal momento che la trascrizione non potrebbe essere attribuita ai corpi cellulari dei fotocettori retinici assenti nel lobo ottico.

2.2. Materiali e metodi

2.2.1. Animali

Gli esperimenti sono stati condotti su esemplari adulti di calamaro *Loligo pealii* mantenuti in vasche con acqua di mare corrente (circa 17°C) nel Marine Biological Laboratory (Woods Hole, MA, USA). Tuttavia alcuni esperimenti di conferma dati sono stati condotti su esemplari adulti di *Loligo vulgaris* del golfo di Napoli, gentilmente forniti dalla Stazione Zoologica di Napoli.

2.2.1. Preparazione di fettine di lobo ottico

I lobi ottici sono stati rapidamente prelevati dalle teste decapitate di calamaro, e posti in acqua di mare filtrata (FSW) tenuta alla temperatura del ghiaccio. Dopo essere stati ripuliti dei nervi ottici e da tessuti estranei, i lobi sono stati delicatamente fatti rotolare su carta assorbente per eliminare l'eccesso di FSW, ed incollati, con collante Attack, al supporto di teflon di un vibratomo. Il supporto era alloggiato in una vaschetta di plexiglass, contenente FSW ghiacciata. Le fettine, dello spessore di 300 µm, sono state raccolte con una piccola spatola e trasferite in una capsula di Petri contenente acqua di mare artificiale (ASW: 460 mM NaCl, 10mM KCl, 55mM MgCl₂, 0.6 mM KHCO₃, 10mM Tris-Cl pH 7.5) alla temperatura del ghiaccio.

Le fettine sono state poi incubate a 20 °C (fino a 6 fettine per piastra) in un volume di 2-6 ml di ASW contenente [5,6-³H]uridina (fino a 50 µCi/ml; 50 Ci/mmol; PerkinElmer). Durante l'incubazione le fettine sono state sottoposte ad una leggera agitazione su una piastra agitante. Per arrestare la reazione i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio e il mezzo di incubazione, aspirato delicatamente con una pasteur, è stato sostituito da ASW fresca.

2.2.2. Preparazione di sinaptosomi da fettine di lobo ottico incubate

Le fettine lavate con ASW sono state omogenate in 1.8 ml di tampone di omogenizzazione (HM: saccarosio 0.7 M, Tris-Cl 20 mM pH 7.4).

I sinaptosomi sono stati preparati utilizzando una procedura semplificata e su scala ridotta del protocollo standard (Crispino et al., 1993 e 1997), che ha richiesto la centrifugazione degli omogenati in una centrifuga Eppendorf (14000 rpm, 30 min, 4°C). Si sono ottenute le seguenti frazioni:

- un sedimento contenente nuclei, mitocondri liberi e frammenti cellulari;
- una pellicola galleggiante contenente sinaptosomi purificati;
- un sopranatante opaco intermedio contenente microsomi e citosol.

La pellicola galleggiante è stata staccata dalle pareti del tubo da centrifuga con una spatola e trasferita per decantazione in un piccolo contenitore. Il sopranatante opaco microsomale è stato aspirato con una pasteur, e la pellicola è stata ripulita da piccoli frammenti di tessuto lavandola con diverse aliquote di HM.

La frazione sinaptosomale lavata e il sedimento sono stati risospesi per omogenizzazione in opportuni volumi di HM.

2.2.3. Misura dell'incorporazione di [³H]-uridina

Il contenuto proteico delle frazioni subcellulari è stato determinato con il metodo BIORAD, usando come proteina di riferimento l'albumina di siero bovino (BSA).

Per la misura della radioattività incorporata, opportune aliquote delle frazioni subcellulari (fino a 200 µl, con un massimo di 50 µg di proteine) sono state aggiunte ad 1 ml di acido tricloroacetico (TCA) 10%, contenente 1 mg/ml di uridina, e 2-3 gocce di BSA. Dopo circa 20 min in ghiaccio, le macromolecole precipitate sono state raccolte su filtri GF/C Whatman e lavate con un eccesso di TCA 8% contenente uridina 1mg/ml. I filtri sono stati quindi asciugati per esposizione ad una lampada infrarossa e contati in uno spettrofotometro a scintillazione liquida con un'efficienza del 90%.

L'aggiunta di actinomicina D (un inibitore della trascrizione extra-mitochondriale, 25 µg/ml) al mezzo di incubazione delle fettine, e il trattamento del prodotto radioattivo con NaOH (1N) ed RNAsi (20 µg/ml), ha reso possibile l'identificazione del prodotto radioattivo precipitato come RNA.

2.2.4. Trattamento ipo-osmotico delle fettine

Per determinare l'effetto del trattamento ipo-osmotico delle fettine incubate, circa una metà delle fettine incubate per 2h con [³H]uridina sono state omogenate in HM (campioni di controllo), mentre l'altra metà è stata omogenata in Tris-Cl 10 mM pH 7.4 (campioni ipo-osmotico). Dopo 15 min in ghiaccio, la concentrazione di saccarosio del campione ipo-osmotico è stata riportata a 0.7 M per aggiunta di un uguale volume di saccarosio 1.4 M mentre il volume del campione di controllo è stato raddoppiato dall'aggiunta di un uguale volume di HM. Entrambe gli omogenati sono stati centrifugati nelle condizioni sopra indicate.

2.2.5. Saggio di incorporazione di [³⁵S]metionina

Si è già mostrato che la frazione sinaptosomale è in grado di incorporare *in vitro* amminoacidi radioattivi in proteine neosintetizzate. Questa caratteristica è dovuta alla presenza di un sistema completo di traduzione inglobato al loro interno. La sintesi proteica sinaptosomale viene quindi misurata aggiungendo [³⁵S]metionina (da 10 a 25 µCi/ml) al mezzo di incubazione costituito da ASW. La reazione inizia per aggiunta dei sinaptosomi (50 µg/ml) e procede per 90 min a 20 °C. La misura della radioattività incorporata viene effettuata seguendo il protocollo standard di seguito descritto.

2.2.6. Misura dell'incorporazione di [³⁵S]metionina

L'incorporazione di [³⁵S]metionina nelle proteine sinaptosomali neosintetizzate è stata determinata aggiungendo alla miscela di incubazione (da 20 a 100 µl) un uguale volume di acido tricloroacetico TCA 20% contenente 2 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 (14000rp, 15 min., 4°C), e il sopratanante eliminato. Il sedimento, sciolto in 0,5 ml di NaOH 1N, 1 mg/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 e lavati con un eccesso di TCA 8%, met 1mg/ml. I filtri sono stati quindi asciugati per esposizione ad una lampada infrarossa e contati in uno spettrofotometro a scintillazione liquida con un'efficienza del 90%.

2.2.7. Metodi immunochimici ed autoradiografici

I sinaptosomi marcati sospesi in 0.5 ml di HM, sono stati aggiunti a 4.5 ml di fissativo (paraformaldeide al 4%, 0.5 M NaCl, 10 mM tampone sodio fosfato pH 7.4). Dopo una notte a temperatura ambiente, fissativo fresco (10 ml) è stato aggiunto ai sinaptosomi che posti su un vetrino Superfrost asciugato per almeno 1h, sono stati spediti ad Amsterdam, Dipartimento di Neurobiologia Cellulare e Molecolare, dove sono stati sottoposti ad analisi immunochimiche ed autoradiografiche.

2.3 Risultati sperimentali

2.3.1. Sintesi locale di RNA presinaptico

Per provare che i sinaptosomi non erano stati danneggiati durante la preparazione e l'incubazione delle fettine, i sinaptosomi preparati da fettine incubate due ore sono stati paragonati a quelli ottenuti dal lobo controlaterale appena dissezionato. I sinaptosomi di entrambe le preparazioni sono risultati morfologicamente identici, e la velocità di sintesi proteica essenzialmente la stessa ($98.9 \pm 19.6\%$; $n=5$). L'attività di sintesi è un indice diretto dell'integrità dei sinaptosomi, cioè di organelli circondati da una membrana plasmatica, la cui distruzione comporta la perdita della sintesi proteica.

Quando le fettine di lobo ottico sono state incubate per 2h con [^3H]uridina, il prodotto radioattivo presente nell'omogenato è stato identificato come RNA grazie alle sue seguenti caratteristiche:

- a) quasi completa idrolisi ($>90\%$) in seguito a trattamento del prodotto radioattivo con NaOH 1N oppure RNasi 20 $\mu\text{g/ml}$;
- b) l'incorporazione di [^3H]uridina nell'RNA è fortemente inibita ($86.8 \pm 3.2\%$; $n=6$) dall'aggiunta al mezzo di incubazione delle fettine di actinomicina D (25 $\mu\text{g/ml}$), un inibitore specifico della trascrizione extramitocondriale.

Risultati simili sono stati ottenuti nei riguardi dell'RNA radioattivo associato alla frazione sinaptosomale, confermandone la natura prevalentemente citoplasmatica.

Un'analisi cinetica della reazione indica che dopo un'iniziale periodo di latenza di circa 15 minuti, la velocità di sintesi dell'RNA nelle fettine incubate rimane lineare per circa un'ora, per poi declinare (Fig.2 A).

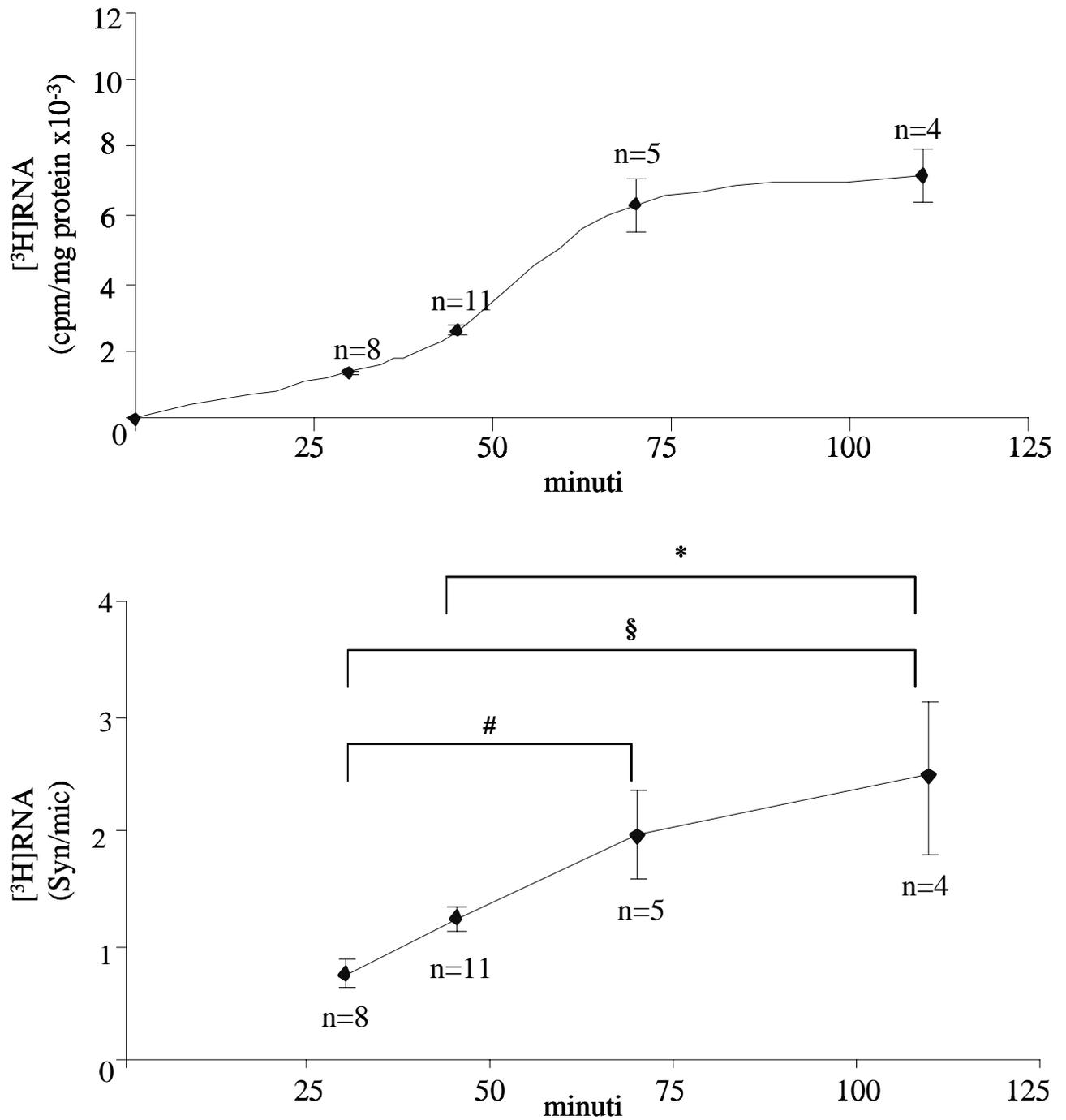


FIGURA 2: A. Cinetica di incorporazione di $[^3\text{H}]$ uridina nell'RNA di nuova sintesi ottenuto da fettine di lobo ottico incubate. **B.** Rapporto tra l' $[^3\text{H}]$ RNA contenuto nella frazioni sinaptosomale (syn) e microsomale/citosolica (mic) ottenute da fettine di lobo ottico incubate con $[^3\text{H}]$ uridina.

§: $P < 0.001$; #: $P < 0.01$; * $P < 0.05$ (ANOVA; Tuckey's post-test)

Come previsto, la maggior parte dell' $[^3\text{H}]$ RNA è localizzato nella frazione nucleare/mitocondriale a tutti i tempi di incubazione, ma la sua quantità relativa diminuisce progressivamente con il trasferimento dell'RNA neosintetizzato nel citoplasma. In particolare,

il rapporto tra [³H]RNA sinaptosomale e quello microsomale/citosolico aumenta progressivamente da un valore inferiore all'unità a 30 minuti a valori notevolmente più alti a tempi successivi (Fig. 2 B). Le differenze sono statisticamente significative (ANOVA: F=9.172, p<0.0004; Tukey's post-tests). Questi ultimi risultati dimostrano che l'RNA sinaptosomale neosintetizzato non può essere attribuito a contaminazione da parte della frazione microsomale/citosolica.

2.3.2. Localizzazione sinaptosomale dell'RNA neosintetizzato

La localizzazione intrasinaptosomale dell' [³H]RNA neosintetizzato è stata indicata da esperimenti nei quali le fettine incubate con [³H]uridina sono state esposte a trattamento iposmotico. Tale trattamento induce un selettivo rigonfiamento e l'eventuale rottura delle strutture racchiuse da una membrana plasmatica, come sono i sinaptosomi. Pertanto, ci si aspettava che, se [³H]RNA fosse localizzato nelle terminazioni nervose, il trattamento iposmotico avrebbe dovuto provocare il suo drastico spostamento dalla frazione sinaptosomale alle altre frazioni dell'omogenato.

Come mostrato in Figura 3 A, [³H]RNA sparisce quasi completamente dalla frazione sinaptosomale (ne rimane solo il 12.5% del campione di controllo), mentre aumenta notevolmente nelle altre due frazioni. Un decremento analogo si osserva nel contenuto proteico (ne rimane solo il 17,6%), mentre aumenta quello delle altre due frazioni (Figura 3 B). Similmente, la capacità di sintetizzare proteine diminuisce drasticamente nella frazione sinaptosomale (rimane solo il 2%), e nelle altre due frazioni (Fig. 3 C). Questi cambiamenti sono tutti dovuti al rilascio dei componenti intrasinaptosomali nel mezzo di omogenizzazione, con conseguente sostanziale spostamento dell' [³H]RNA e delle proteine alle altre frazioni subcellulari, ed inattivazione irreversibile dalla sintesi proteica sinaptosomale.

Un ulteriore decisiva dimostrazione della localizzazione intrasinaptosomale dell' [³H]RNA neosintetizzato è stata ottenuta con analisi autoradiografiche. Come mostrato in Figura 4 A, in una frazione sinaptosomale preparata da fettine di lobo ottico incubate con [³H]uridina, [³H]RNA è presente solo nei grandi sinaptosomi la cui origine presinaptica è dimostrata dalla selettiva colorazione con un anticorpo anti-sintaxina, proteina presinaptica (Figura 4 C).

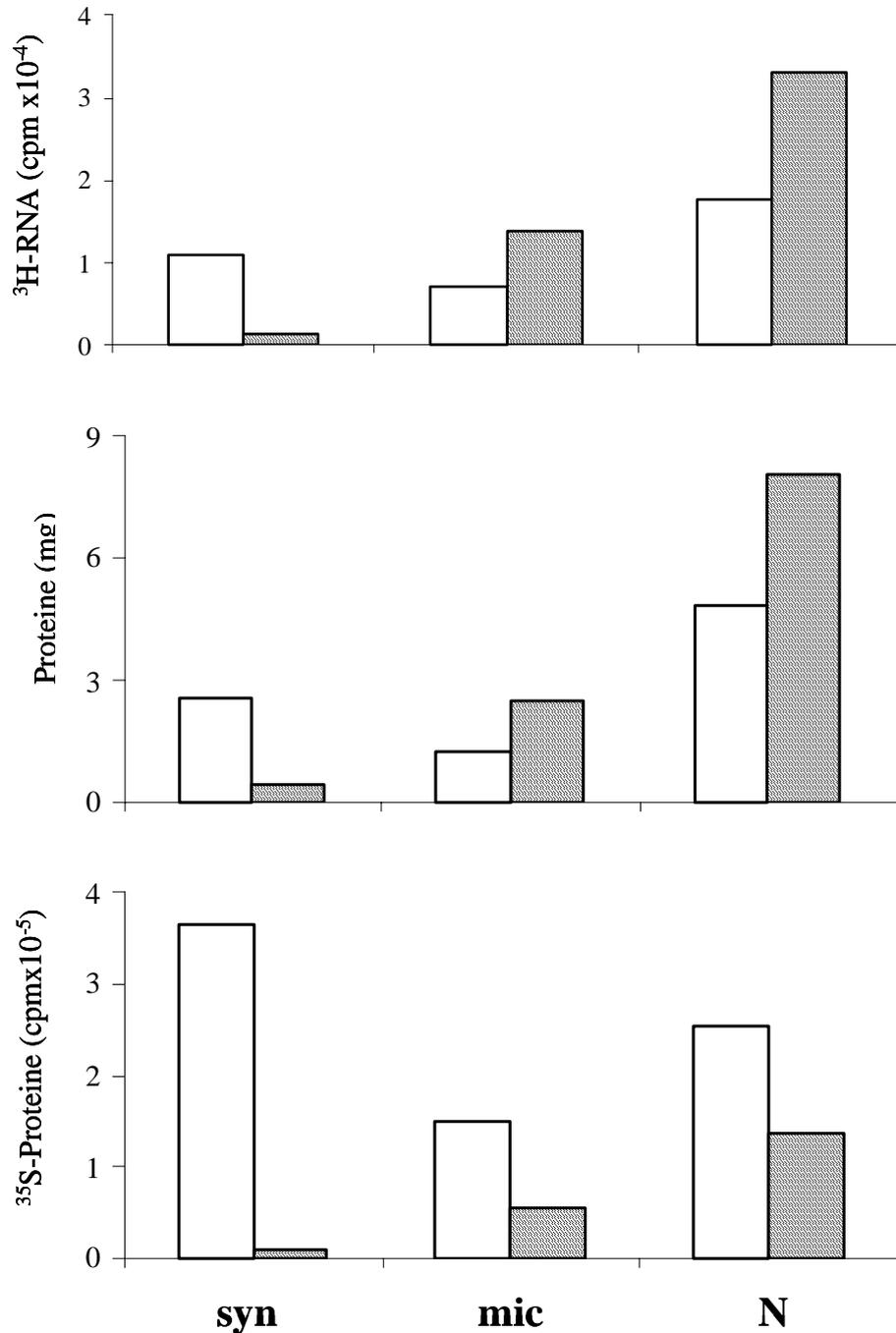


FIGURA. 3. Effetto del trattamento ipo-osmotico di fettine di lobo ottico incubate con [^3H]uridina. **A**, [^3H]RNA; **B**, proteine e **C**, sintesi proteica. **Syn** frazione sinaptosomale; **mic** frazione microsomale/citosolica; **N** frazione nucleare/mitocondriale. Barre bianche, controllo; barre tratteggiate, campione ipo-osmotico. Le fettine di tessuto sono state incubate per 2 h con 40 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]uridina. L'omogenato di controllo e l'omogenato trattato ipo-osmoticamente, contengono rispettivamente 9.6 and 7.6 mg di proteine, e a una concentrazione di [^3H]RNA di 3200 e 3500 cpm/mg protein. La loro velocità di sintesi proteica sinaptosomale è di 44,000 and 8,800 cpm/h/mg di proteina.

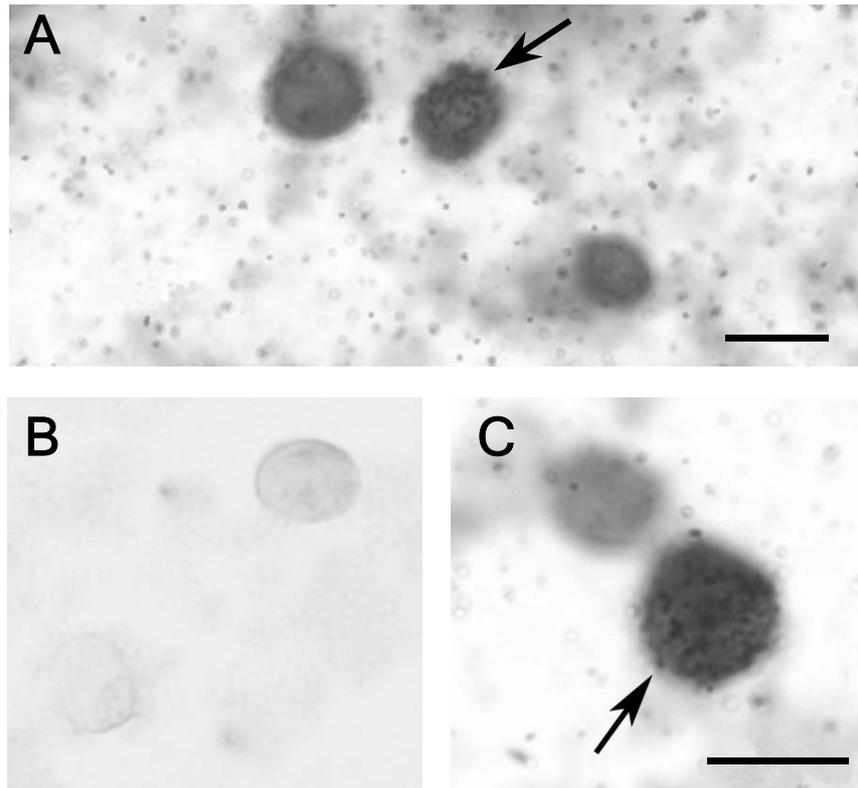


FIGURA 4; Colocalizzazione nei grandi sinaptosomi del calamaro dell'RNA di nuova sintesi con l'anticorpo contro la proteina presinaptica syntaxina. I grandi sinaptosomi sono derivati dalle terminazioni nervose dei fotorecettori retinici. **A**, autoradiografia della frazione sinaptosomale preparata da fettine di lobo ottico incubate per 2 h con [3H]uridina; nei grandi sinaptosomi si osserva un'alta concentrazione di grani d'argento (freccia); essi sono anche selettivamente colorati da un anticorpo monoclonale di topo contro la syntaxina di calamaro, proteina presente esclusivamente nei terminali presinaptici. **B**, I grandi sinaptosomi ,non sono colorati dal siero non-immune di topo; **C**, un grande sinaptosoma intensamente colorato dall'anticorpo antisyntaxina e fortemente marcato con [3H]RNA (freccia), al suo lato superiore sinistro è presente un'altro sinaptosoma contenente pochi o nessun grano d'argento. barre, 10 μ m.

Questi risultati dimostrano in maniera inequivocabile l'esistenza di una sintesi locale dell'RNA delle grandi terminazioni nervose dei fotorecettori retinici del calamaro. Va sottolineato che questi dati non escludono un apporto ulteriore di RNA presinaptico da parte dei corpi cellulari dei neuroni. Tuttavia, la presenza di un'attivo sistema di sintesi di proteine nelle regioni periferiche del neurone, in particolare nelle terminazioni nervose del calamaro, suggerisce che assoni e terminazioni nervose sono dotate di un sistema locale di espressione genica che si basa sul rifornimento di trascritti gliali ai domini neuronali periferici.

Questo ruolo di sostegno metabolico della periferia neuronale da parte delle cellule gliali potrebbe non essere limitato all'RNA, ma riguardare anche altre macromolecole, metaboliti e particelle citoplasmatiche, e potrebbe essere considerato uno dei più diffusi e rilevanti ruoli delle cellule gliali.

Un'ipotesi del genere, sostenuta da una cospicua quantità di dati biochimici e morfologici, fu avanzata più di 30 anni fa, ma non per la periferia neuronale, bensì per i corpi cellulari dei neuroni. Si riteneva infatti che in condizioni di aumentata attività neuronale le cellule gliali rifornissero il soma del neurone con RNA di vario tipo e con altri componenti citoplasmatici (Hyden 1964; e Pevzner 1971). Questo filone sperimentale fu tuttavia screditato e quindi bloccato da pesanti critiche sull'attendibilità dei micrometodi di separazione dei campioni nervosi da quelli gliali (Kuffler e Nichols, 1976).

A tali critiche si è presumibilmente aggiunta la considerazione che i corpi neuronali non hanno bisogno di trascritti provenienti dalle cellule gliali, dal momento che essi stessi sono in grado di sintetizzarli. Queste considerazioni non possono certamente riguardare le regioni periferiche del neurone che risultano completamente sfornite di un sistema di trascrizione extramitocondriale.

3. ESPERIMENTI SUL RATTO

3.1. Scopo del lavoro sperimentale

Gli esperimenti sulle fettine di lobo ottico hanno fornito la prima dimostrazione di una sintesi locale di RNA presinaptico, suggerendo una sua origine nelle cellule gliali in analogia a quanto dimostrato nell'assone gigante perfuso.

La grande rilevanza potenziale di un sistema locale di espressione genica che riguarda assoni e terminazioni nervose non può essere trascurata. Essa invita ad una sostanziale modifica delle direzioni di ricerca sui meccanismi di mantenimento e plasticità delle regioni neuronali periferiche.

Questa impostazione concettuale ci ha suggerito di valutare l'eventuale effetto di eventi plastici legati alle capacità cognitive e di memoria sulla sintesi proteica sinaptosomale del ratto. A tale scopo sono state esaminate le principali caratteristiche della sintesi proteica sinaptosomale di diverse macroregioni cerebrali in ratti tenuti in condizioni di base o esposti a vari tipi di apprendimento.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Animali

Per gli esperimenti relativi a questa sezione sperimentale 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). Ogni esperimento è stato condotto su ratti adulti, di cui uno (scelto a caso) è stato sottoposto ad un test di apprendimento associativo (ratto addestrato, A), mentre l'altro è stato lasciato nella sua gabbia (ratto di controllo, C). Al termine del test entrambi i ratti sono stati sacrificati seguendo le procedure descritte nei paragrafi successivi (3.2.3-5).

3.2.2 Esperimento di apprendimento associativo

Il test di apprendimento associativo è stato del tipo evitamento attivo a due vie, ed è stato effettuato ponendo l'animale in uno dei due compartimenti di una gabbia di condizionamento (shuttle-box, Fig. 5).

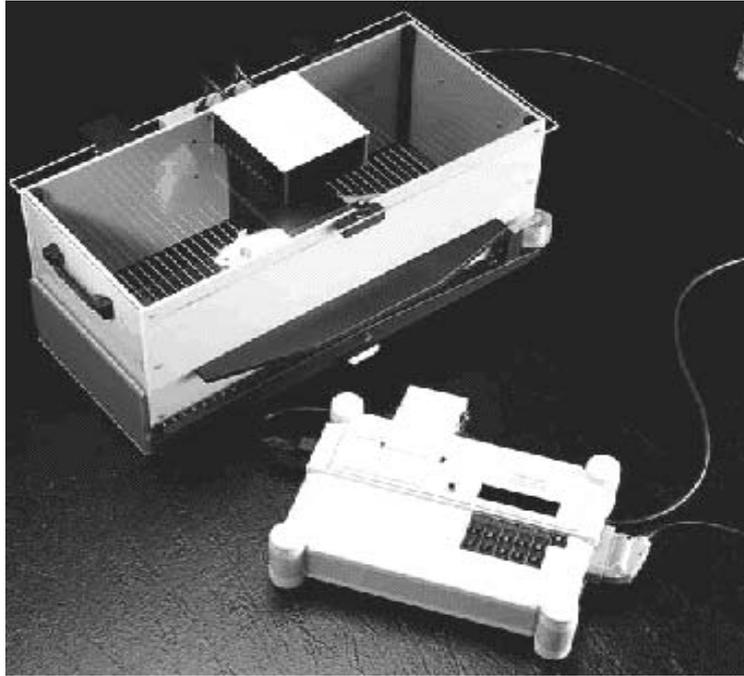


FIGURA 5: gabbia di condizionamento utilizzata per la prova di evitamento attivo a due vie (Shuttle-box)

Ogni ciclo di addestramento ha avuto la durata di 30 secondi ed è stato ripetuto senza interruzione nel corso di un periodo di addestramento di 30 minuti, per un totale di 60 cicli. Ogni ciclo inizia con l'accensione di una luce per 6 secondi. Negli ultimi 3 secondi di luce si somministra una debole corrente elettrica alle zampe (in genere 0.8 mA) che il ratto può interrompere se si sposta nell'altro compartimento. Le possibili risposte comportamentali possono essere:

- di **evitamento**, quando lo spostamento si verifica nei primi 3 secondi di luce, cio' che impedisce la somministrazione dello shock elettrico;
- di **fuga**, quando lo spostamento si verifica negli ultimi 3 secondi di luce, dopo aver ricevuto lo shock elettrico;
- di **congelamento**, quando non si verifica alcuno spostamento, pur avendo ricevuto lo shock elettrico.

I periodi di addestramento sono stati ripetuti altre due volte dopo intervalli di riposo della stessa durata (30 minuti).

3.2.3. Test di apprendimento non-associativo: abitudine spaziale

La sessione di addestramento per il test di abitudine spaziale consiste nel lasciare l'animale 15 minuti in un corridoio risultante dall'inserimento di una scatola quadrata con

pareti trasparenti in un'altra scatola quadrata di maggiori dimensioni con pareti scure (LAT-

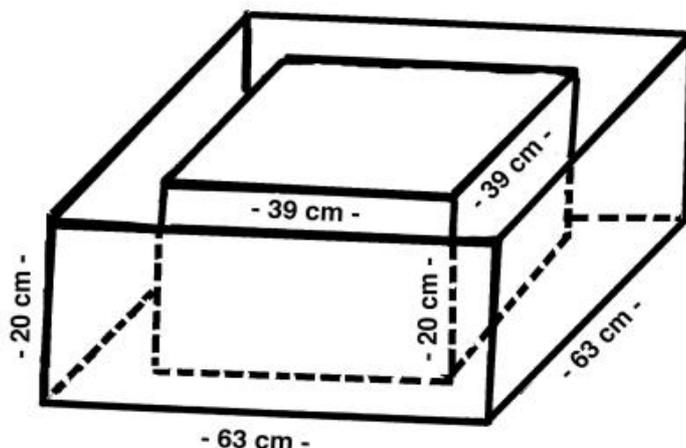


FIGURA 6: Schema gabbia di condizionamento utilizzata per la prova di abitudine spaziale (gabbia di LAT)

maze, schema in Fig. 6).

L'esposizione a questo nuovo ambiente evoca la risposta comportamentale innata di esplorazione del nuovo ambiente. Pertanto, l'istaurarsi dell'abitudine al nuovo ambiente, porta ad una diminuzione dell'attività esplorativa, e quindi la diminuzione dei movimenti orizzontali (giri d'angolo) e verticali (alzate sulle zampe posteriori).

3.2.4. Preparazione dei sinaptosomi

Gli animali, anestetizzati con CO₂, sono stati sacrificati per decapitazione, e dal cervello sono state rapidamente prelevate corteccia (cx), ippocampo (ipp), e cervelletto (cv) per gli esperimenti di apprendimento associativo, e corteccia ed ippocampo per quelli di apprendimento non-associativo.

I campioni di tessuto sono stati rapidamente posti in un mezzo tenuto in ghiaccio (tampone A: saccarosio 0.32 M, Tris-Cl pH 7.4 10 mM), omogenati in un omogenizzatore Dounce con 9 volumi di tampone A, e centrifugati in un rotore JA17 di una centrifuga Beckman JA21 (4200 rpm, 1 min.). Il sedimento è stato risospeso nello stesso volume di tampone A, e centrifugato nelle stesse condizioni per ottenere un sedimento pulito contenente nuclei, frammenti cellulari e sinaptosomi grandi (P1). I due soprannatanti sono stati miscelati insieme e centrifugati nello stesso rotore a una velocità più alta (13,200 rpm, 4 min, 4^o) per ottenere un nuovo sedimento che, lavato allo stesso modo, contiene mitocondri liberi, sinaptosomi, e mielina (P2).

La frazione P2 è stata quindi 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 diluita fino ad una concentrazione proteica di 4 mg/ml, ed è stata stratificata (1 ml di sospensione) 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). La frazione sinaptosomale raccolta all'interfase 13%-5% è stata diluita con 10 volumi di tampone A, e centrifugata in rotore JA17 (13200 rpm per 20 min, 4°C) per eliminare il Ficoll. Il sedimento è stato infine risospeso in un opportuno volume di tampone A, e la sua concentrazione proteica è stata determinata con metodo BIO-RAD.

3.2.5. Incorporazione di [³⁵S]metionina nelle proteine sinaptosomali

Per la misura della sintesi proteica è stata utilizzata la frazione sinaptosomale purificata da ciascuna regione cerebrale dei ratti di controllo e da quelli addestrati. Un'opportuna aliquota di ciascuna frazione è stata incubata 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 cloramfenicolo, quest'ultimo per eliminare il contributo mitocondriale al processo di sintesi proteica.

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 trasferita 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 (14000rp, 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 e lavati con un eccesso di TCA 8%, met 1mg/ml. I filtri sono stati quindi asciugati per esposizione ad una lampada infrarossa e contati in uno spettrofotometro a scintillazione liquida con un'efficienza del 90%.

3.2.6. 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 di circa il 100% 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 15giorni). 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 UltraScan 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 (vedi Fig. 12, pag.). Dati preliminari hanno permesso di stabilire che l'intensità di questa banda dipende linearmente dal tempo di esposizione e dalla radioattività proteica.

3.3 Risultati: effetto dell' apprendimento associativo

3.3.1 Dati comportamentali

Per l'esperimento di apprendimento associativo (evitamento attivo a due vie), sono stati sottoposti ad addestramento 26 animali che in base alle risposte comportamentali più frequenti sono stati suddivisi nei seguenti gruppi (Fig. 7):

- 1) **gruppo evitamenti**: che comprende gli animali che hanno effettuato un maggior numero di evitamenti (n=7 ; Fig. 7 A);
- 2) **gruppo fughe**: che comprende gli animali che hanno effettuato un maggior numero di fughe (n=11 ; Fig. 7 B);
- 3) **gruppo congelamenti**: che comprende gli animali che hanno effettuato un maggior numero di congelamenti (n=8 ; Fig. 7 C).

Va sottolineato che mentre il congelamento e la fuga rappresentano risposte comportamentali innate, l'evitamento è l'unica risposta acquisita che quindi implica un rimodellamento della rete neuronale.

3.3.2 Confronto ratti di controllo-addestrati: analisi biochimiche

Di ciascuna frazione sinaptosomale sono stati misurati i seguenti parametri biochimici: contenuto proteico espresso in mg, capacità totale di sintesi proteica espressa come radioattività proteica (cpm), attività specifica espressa dal rapporto tra radioattività proteica e contenuto di proteine incubate (cpm/ μ g).

Nei grafici in Figura 8 sono rappresentati i valori medi (\pm errore standard) delle tre variabili biochimiche nei ratti di controllo e negli addestrati *sia nel loro insieme che divisi per classi comportamentali*. E' evidente che le differenze tra addestrati e controlli sono minime, sia per le proteine (Fig. 8 A), sia per la capacità totale di sintesi proteica (Fig. 8 B), sia per l'attività specifica (Fig. 8 C). L'analisi statistica (t-test di Student) non ha infatti evidenziato differenze significative nei ratti addestrati rispetto ai controlli in ciascuna delle tre regioni cerebrali esaminate, anche quando il confronto è effettuato nei riguardi delle singole classi comportamentali (ANOVA; Tuckey post-test).

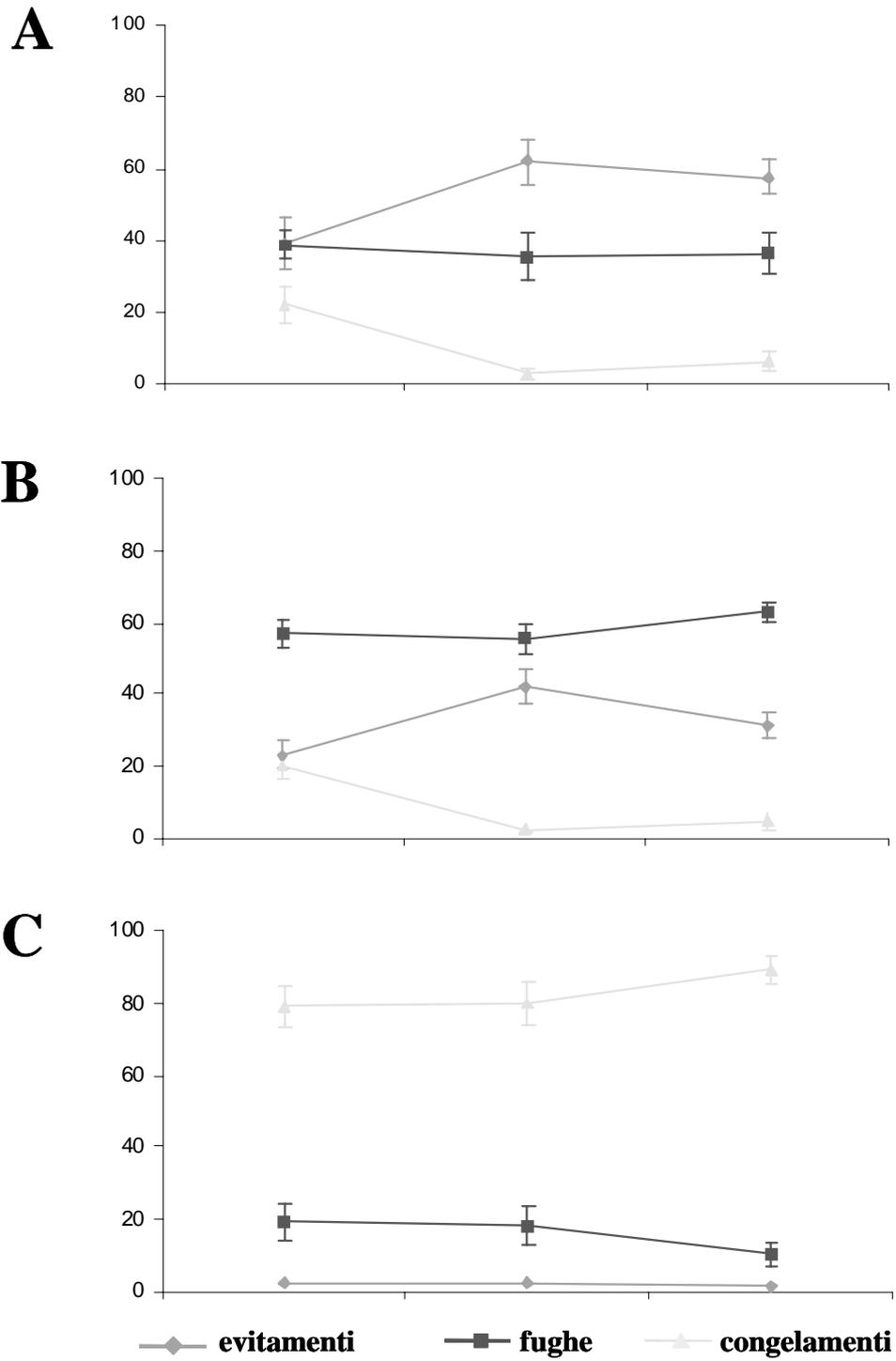


FIGURA 7; Risposte comportamentali: **A**, gruppo evitamenti (n=8); **B**, gruppo fughe (n=9); **C**, gruppo congelamenti (n=12)

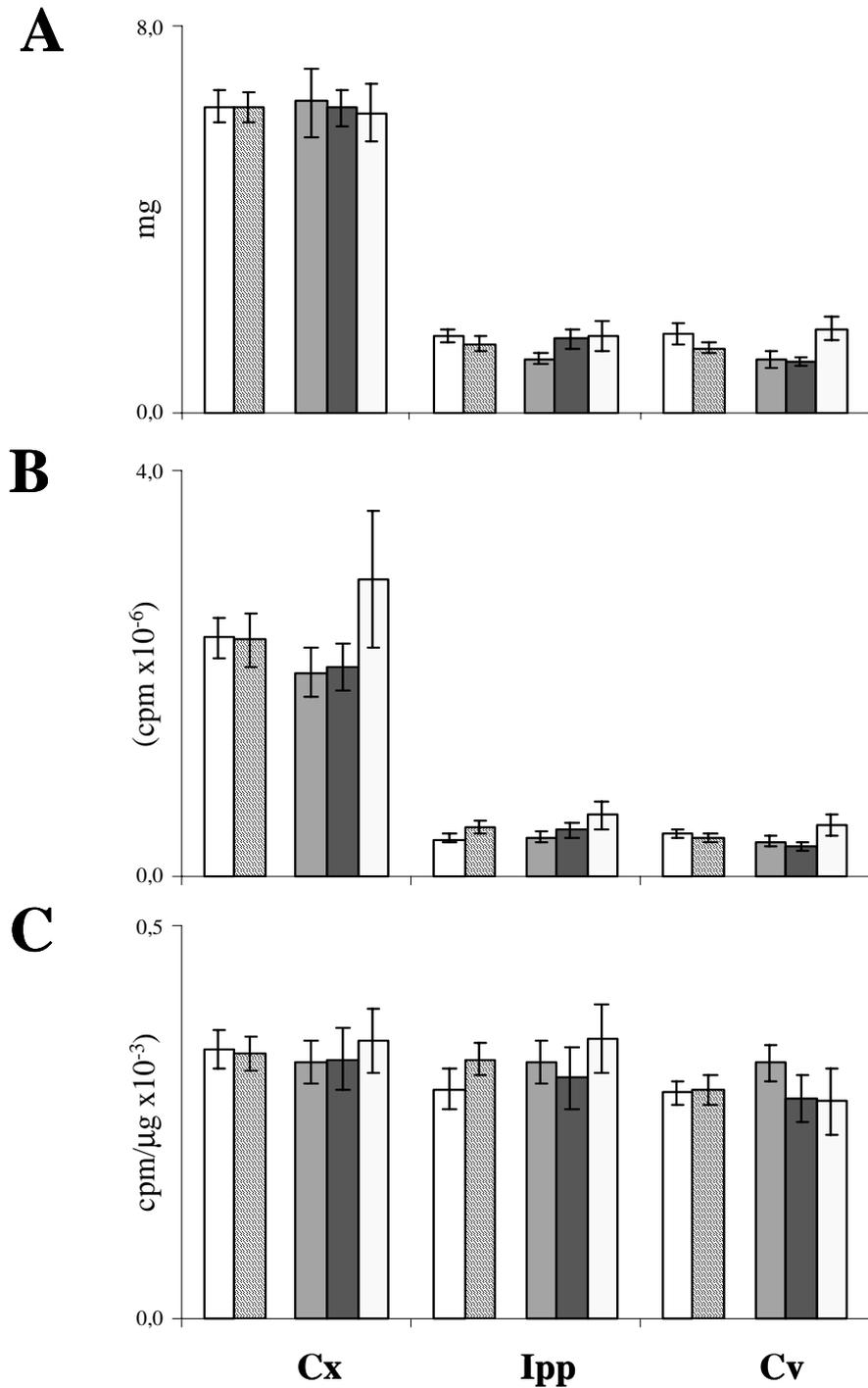


FIGURA 8; Analisi biochimiche, valori medi di **A**, proteine; **B**, incorporazione totale; **C**, attività specifica. **Cx**, neocorteccia; **Ipp**, ippocampo; **Cv**, cervelletto. □ Controlli (n=15); ▨ Addestrati (n=27); ▩ Evitamenti (n=8); ▤ Fughe (n=10); ▥ congelamenti (n=9)

L'analisi correlativa (metodo non parametrico di Spearman) tra le variabili biochimiche nei ratti addestrati e le corrispondenti risposte comportamentali registrate nei singoli periodi di addestramento (Fig. 9-11) ha evidenziato che il contenuto delle proteine

sinaptosomali del cervelletto correla con i numero di congelamenti effettuati dall'animale in tutti i periodi di addestramento, e correla negativamente con il numero di fughe ed evitamenti (Fig. 11).

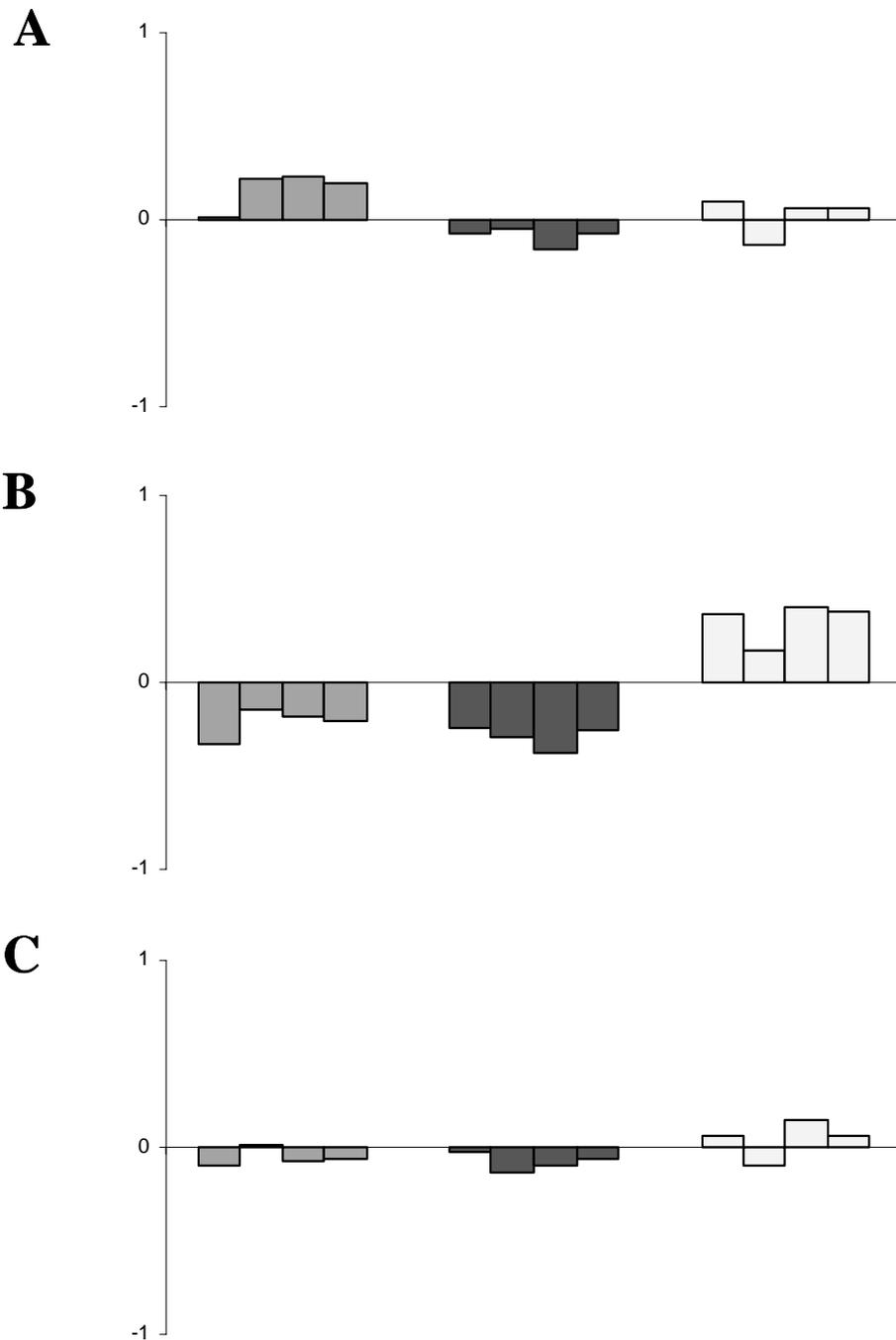


FIGURA 9: coefficienti di correlazione tra le risposte comportamentali (nel 1°,2°,3° e totale dei periodi di addestramento) e i parametri biochimici della corteccia; **A**, contenuto proteico; **B**, capacità totale di sintesi proteica (cpm); **C**, attività specifica (cpm/μg). ■ Evitamenti; ■ Fughe; □ Congelamenti. Metodo non parametrico di Spearman (*P<0.05)

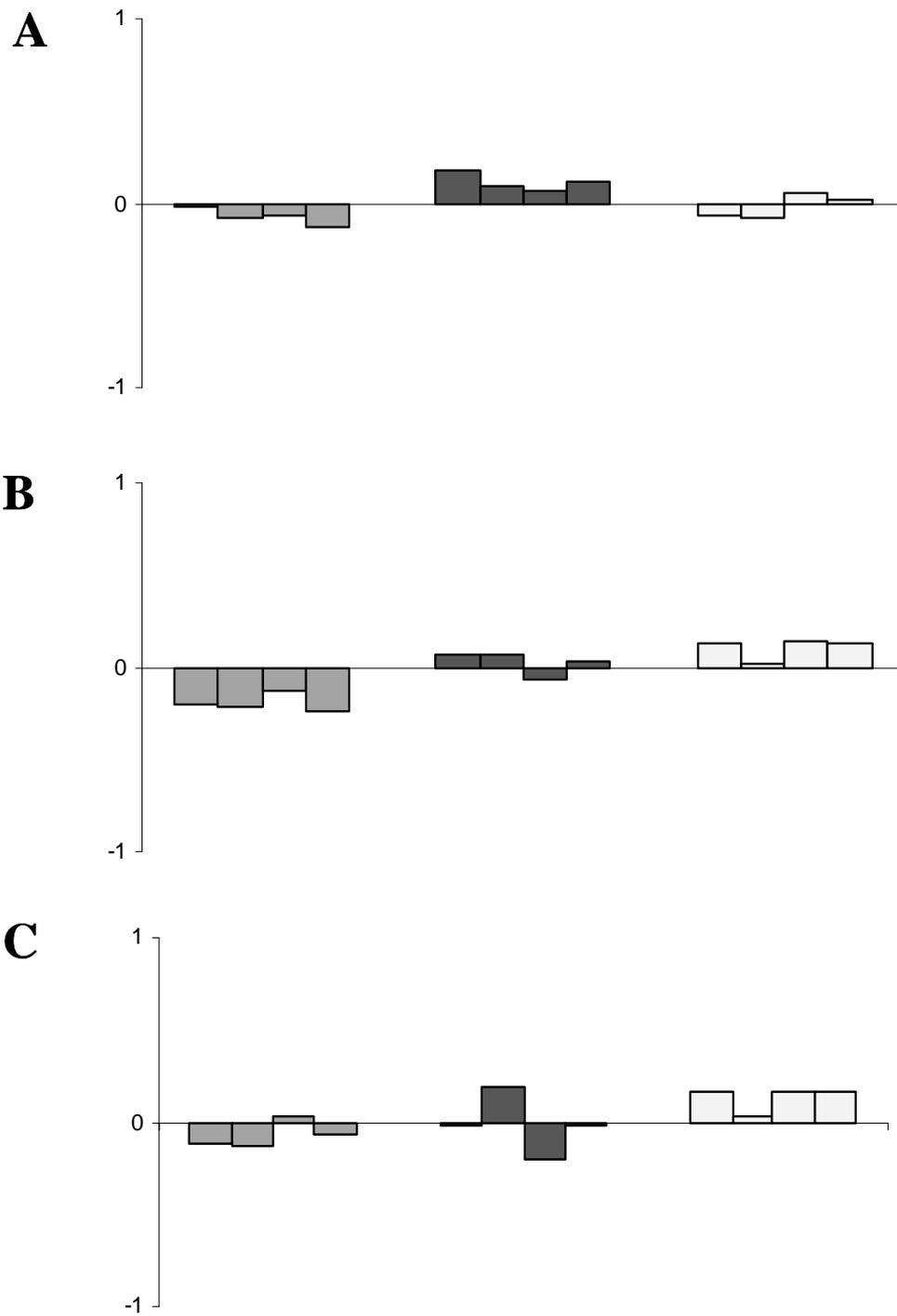


FIGURA 10: coefficienti di correlazione tra le risposte comportamentali (nel 1°,2°,3° e totale dei periodi di addestramento) e i parametri biochimici dell'ippocampo; **A**, contenuto proteico; **B**, capacità totale di sintesi proteica (cpm); **C**, attività specifica (cpm/μg). ■ Evitamenti; ■ Fughe; □ Congelamenti. Metodo non parametrico di Spearman.

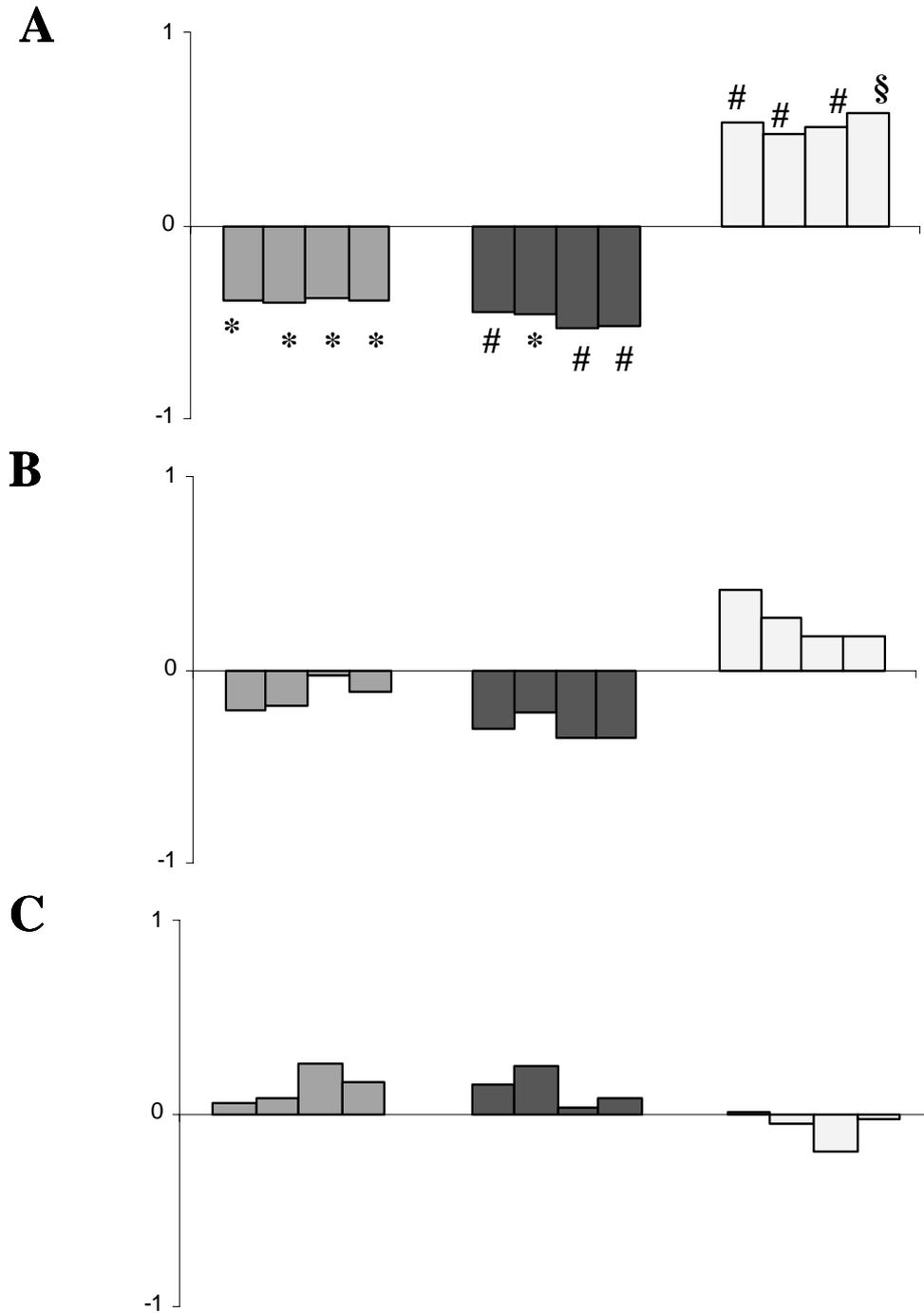


FIGURA 11: coefficienti di correlazione tra le risposte comportamentali (nel 1°,2°,3° e totale dei periodi di addestramento) e i parametri biochimici del cervelletto; **A**, contenuto proteico; **B**, capacità totale di sintesi proteica (cpm); **C**, attività specifica (cpm/ μ g). ■ Evitamenti; ■ Fughe; □ Congelamenti. Metodo non parametrico di Spearman (§: $P < 0.001$; #: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$).

Va comunque sottolineato che i parametri biochimici esaminati danno una stima dell'attività globale di sintesi proteica. Pertanto, essi nulla ci dicono circa eventuali variazioni di singole proteine.

3.3.3 Confronto ratti di controllo-addestrati: analisi densitometrica

Il confronto tra i profili elettroforetici delle proteine sinaptosomali neosintetizzate, ha permesso di identificare due proteine la cui sintesi è notevolmente aumentata dall'addestramento. Come si può osservare in Fig. 12 le due bande proteiche di 66,5 e 87,6 kDa sono più intense nei ratti addestrati che nei controlli.

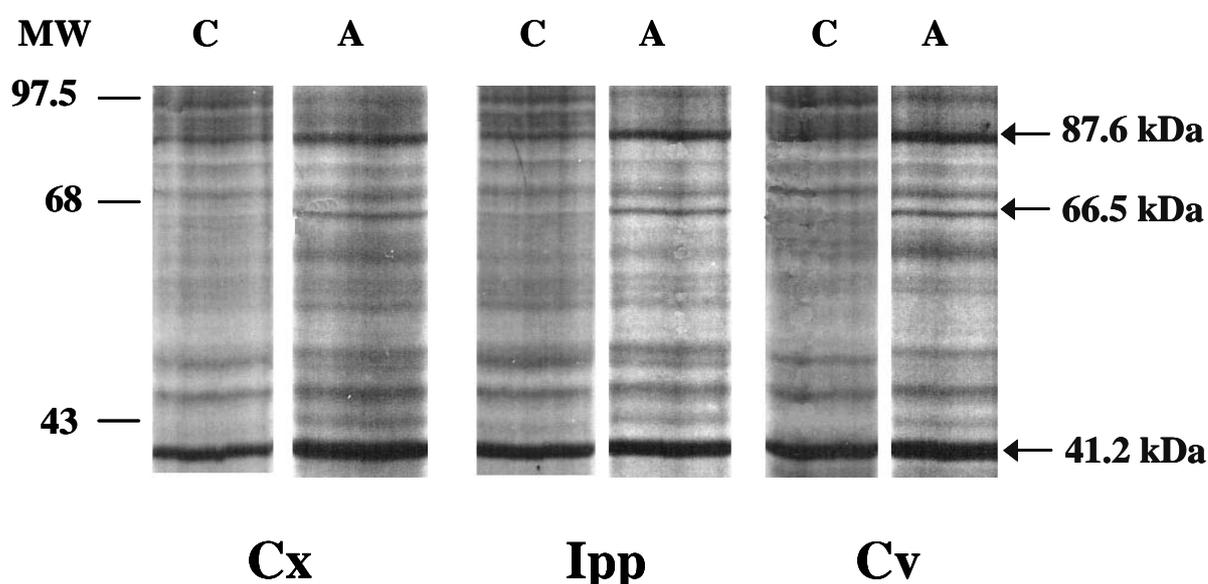


FIGURA 12; Profili elettroforetici delle proteine sinaptosomali neosintetizzate nei ratti di controllo **C** e addestrati **A**, della neocorteccia **Cx**; dell'ippocampo **Ipp**; e del cervelletto **Cv**. A destra (in blu) sono indicate le bande proteiche sottoposte all'analisi densitometrica, a sinistra i pesi molecolari ricavati dalla mobilità relativa delle proteine a peso molecolare noto (MW)

Nei grafici della Fig. 13 A e 14 A sono rappresentati i valori medi (\pm errore standard) delle intensità relative di entrambe le bande nei ratti di controllo e negli addestrati, l'analisi statistica ha confermato che l'intensità relativa delle due bande risulta significativamente maggiore negli addestrati rispetto ai controlli in ciascuna delle tre regioni cerebrali (t-test di Student). Ciò dimostra che il sistema sinaptosomale di sintesi proteica è modulato dall'esperienza.

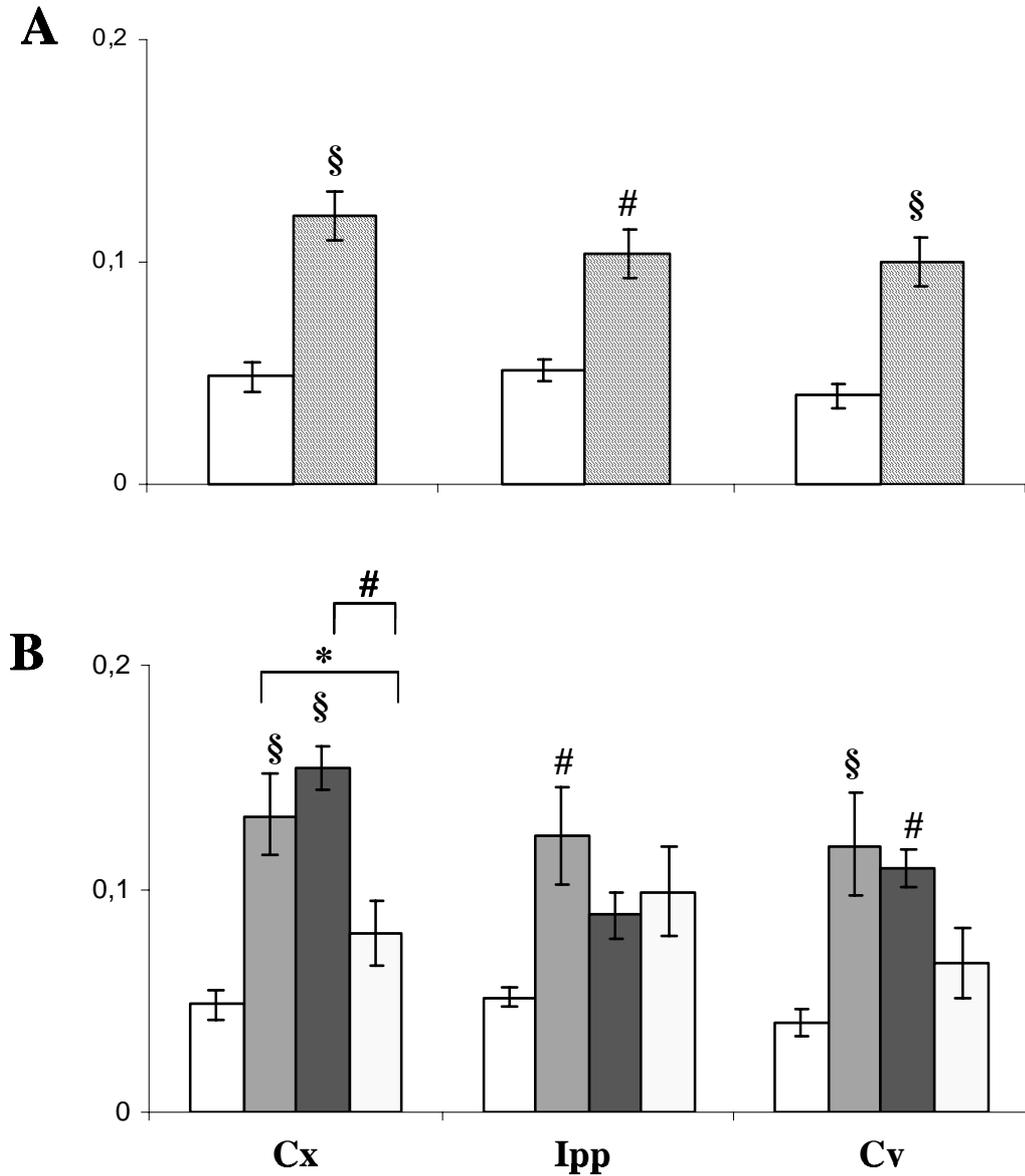


FIGURA 13; Analisi densitometriche della banda di 66.5 kDa. **Cx**, neocorteccia; **Ipp**, ippocampo; **Cv**, cervelletto. **A**, valori medi di □ Controlli (n=9); ▨ Addestrati (n= 18; 20;17) §: P< 0.001; #: P< 0.01 (t-test per dati non appaiati)
B, valori medi di □ Controlli (n=9); ▨ Evitamenti (n= 7; 7; 6); ▩ Fughe (n= 5; 7; 6); □ Congelamenti (n= 6) §: P< 0.001; #: P< 0.01; *: P< 0.05 (ANOVA, Tuckey's post-test)

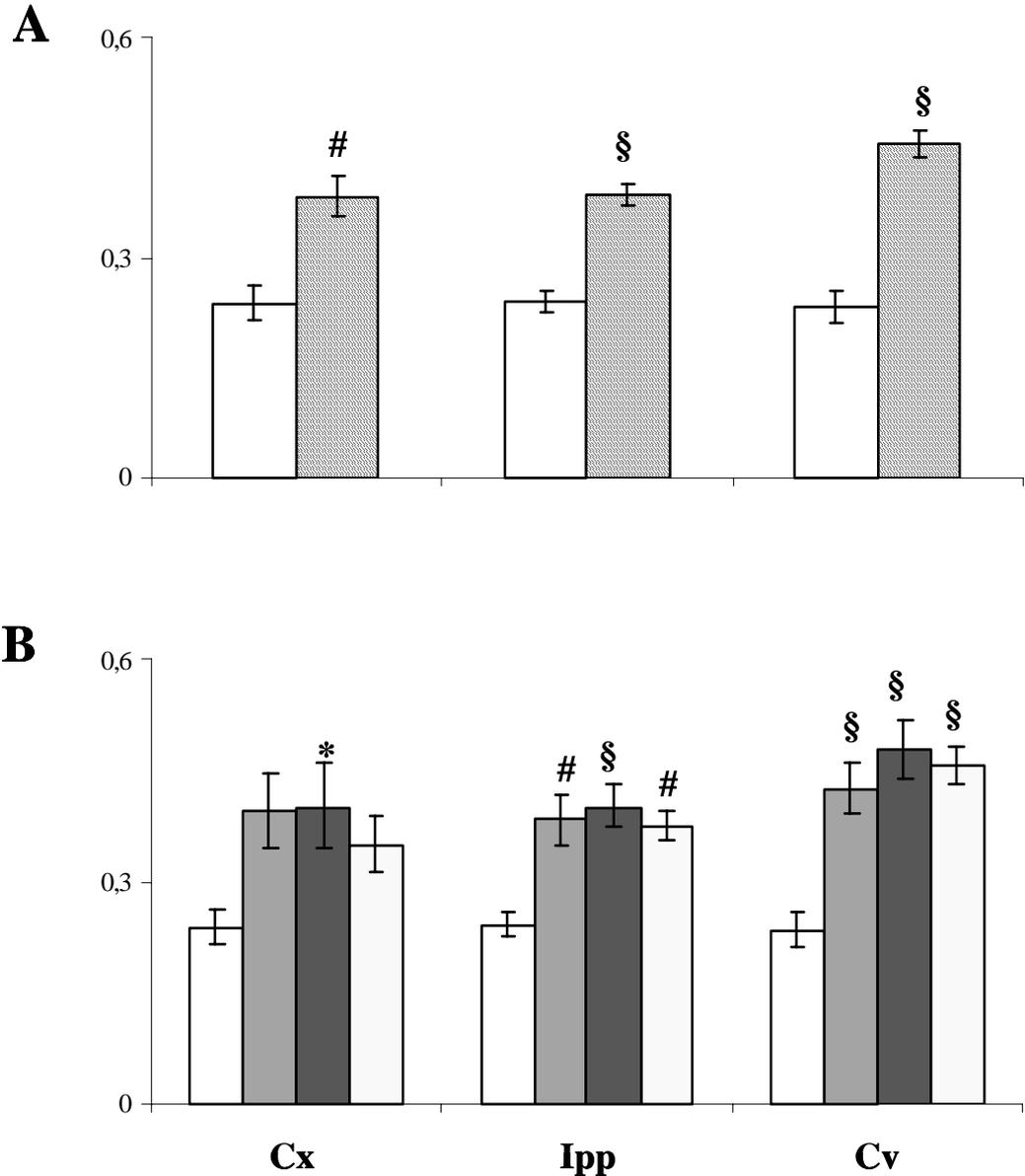


FIGURA 14; Analisi densitometriche della banda di 87,6 kDa. **Cx**, neocorteccia; **Ipp**, ippocampo; **Cv**, cervelletto. **A**, valori medi di □ Controlli (n=9); ▨ Addestrati (n= 21) §: P< 0.001; #: P< 0.01 (t-test per dati non appaiati). **B**, valori medi di □ Controlli (n=9); ▨ Evitamenti (n= 7; 7; 6); ■ Fughe (n= 7); □ Congelamenti (n= 7;7;6) §: P< 0.001; #: P< 0.01; *: P< 0.05 (ANOVA, Tuckey's post-test)

L'analisi statistica all'interno delle singole classi comportamentali (ANOVA; Tuckey post-test), ha mostrato per la banda da 66,5 kDa (Fig. 13 B) differenze statisticamente significative nella corteccia e nel cervelletto, relativamente al gruppo evitamenti e al gruppo fughe. Invece, per la banda da 87,6 kDa (Fig 14 B), il confronto tra le singole classi comportamentali mostra che le differenze più marcate riguardano l'ippocampo ed il

cervelletto, e sono presenti in tutte le classi comportamentali. Questi ultimi risultati dimostrano il diverso coinvolgimento dei sistemi sinaptici di sintesi proteica di corteccia, ippocampo e cervelletto nei processi plastici indotti dall'apprendimento di un compito di evitamento attivo a due vie.

Tale dato è rafforzato anche dai risultati dell'analisi correlativa tra l'intensità relativa delle due bande proteiche nei ratti addestrati e le corrispondenti risposte comportamentali registrate nei singoli periodi di addestramento. Infatti l'intensità relativa della banda da 66,5 kDa della corteccia e del cervelletto correla positivamente con gli evitamenti e le fughe e negativamente con i congelamenti in quasi tutti i periodi di addestramento (Fig.15 A e C).

In considerazione di quanto detto nella sezione relativa all'addestramento (parag. 3.2.1.), la dipendenza dell'intensità della banda dal tipo di risposta comportamentale è particolarmente significativo. Infatti, mentre il congelamento non rappresenta una risposta acquisita, il manifestarsi del comportamento acquisito (evitamento) è preceduto da un comportamento innato (fuga) come indicato dai grafici relativi alle risposte comportamentali.

Diversamente dalla banda proteica da 66,5 kDa la banda da 87,6 kDa dell'ippocampo (Fig. 16 B) correla solo con le fughe registrate nel secondo periodo di addestramento. L'aumentata sintesi di questa banda sembra quindi legata all'esperienza della seduta d'addestramento per se, e quindi a fattori non specifici, come del resto predetto dall'analisi statistica. Infatti, l'intensità relativa di tale banda è significativamente aumentata in tutte le classi comportamentali.

3.4. Effetto dell' apprendimento non-associativo

3.4.1. Dati comportamentali

Per l'esperimento di apprendimento non associativo (abitudine spaziale), sono stati sottoposti ad addestramento in Lat-maze 18 animali. L'avvenuta abitudine, dimostrata dalla diminuzione dell'attività esplorativa, si verifica generalmente entro i primi 6 minuti di addestramento. Essa è espressa da un cambiamento della pendenza della retta che rappresenta i movimenti cumulativi (movimenti orizzontali + alzate verticali) dell'animale in funzione del tempo (Fig. 17).

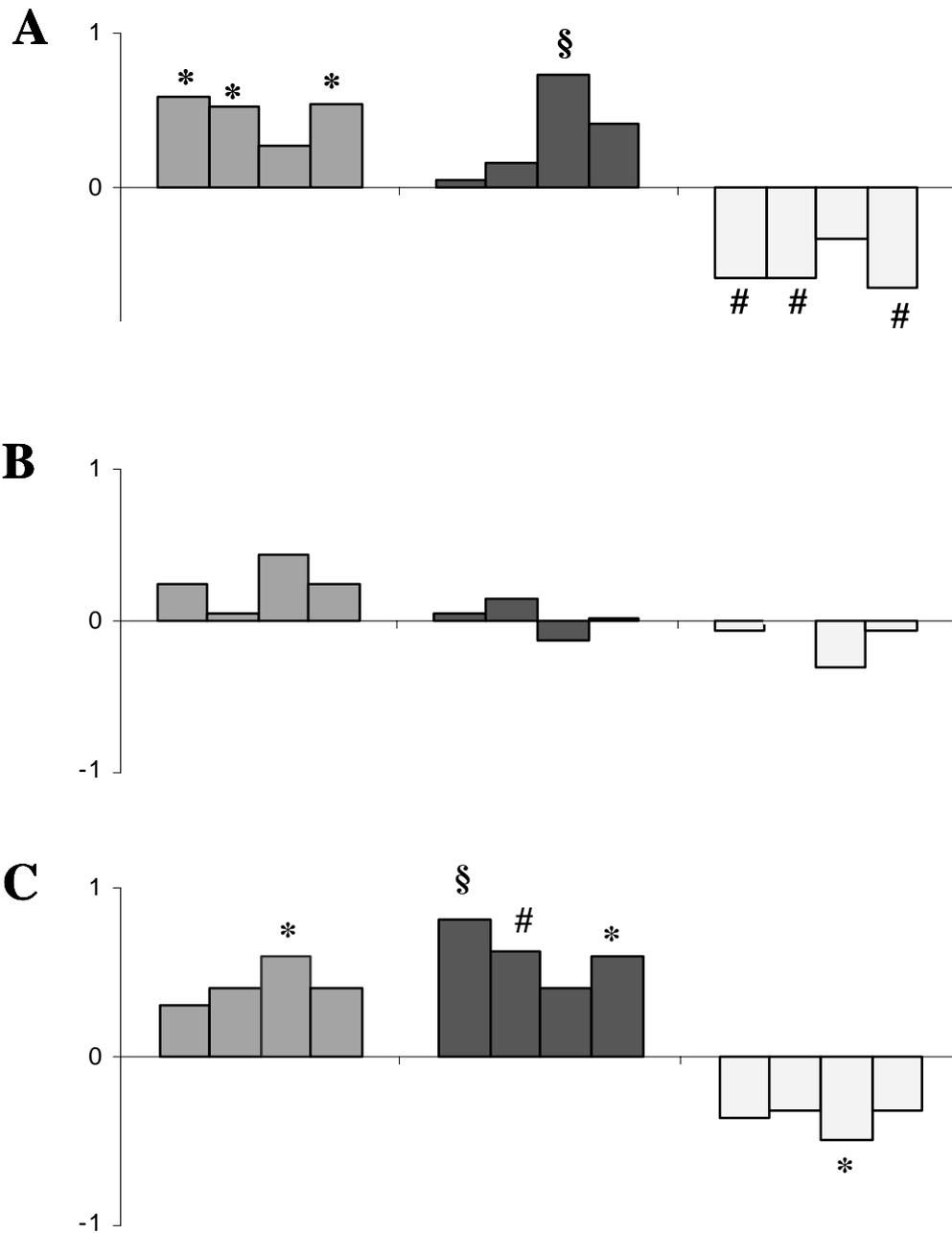


FIGURA 15: coefficienti di correlazione tra le risposte comportamentali nei periodi di addestramento (1°, 2°, 3° e totale) e l'intensità relativa della banda da 66,5 kDa. **A**, neocorteccia; **B**, ippocampo; **C**, cervelletto ■ Evitamenti; ■ Fughe; □ Congelamenti. Metodo non parametrico di Spearman (§: $P < 0.001$; #: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$)

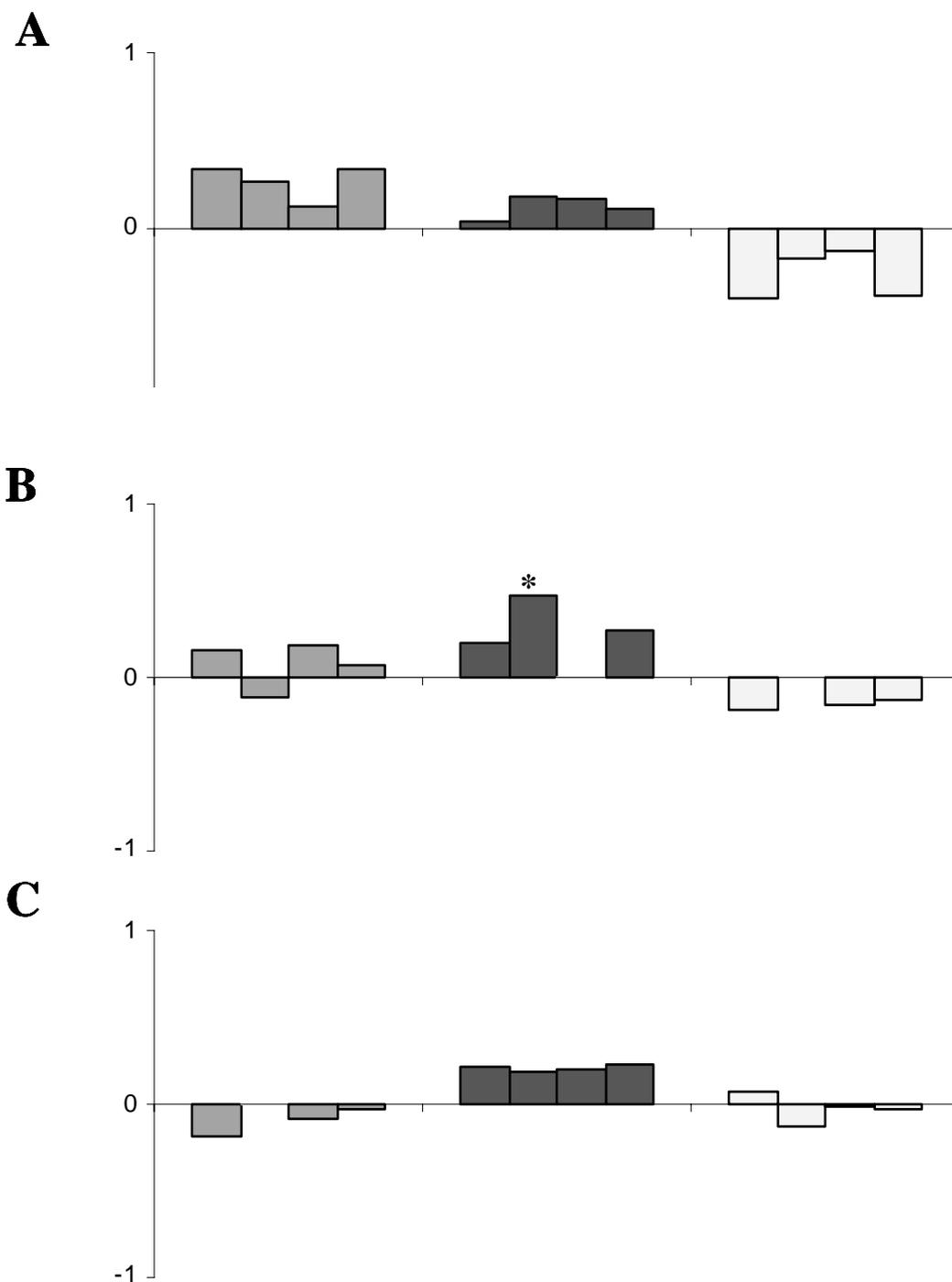


FIGURA 16: coefficienti di correlazione tra le risposte comportamentali nei periodi di addestramento (1°, 2°, 3° e totale) e l'intensità relativa della banda da 87,6 kDa. **A**, neocorteccia; **B**, ippocampo; **C**, cervelletto ■ Evitamenti; ■ Fughe; □ Congelamenti. Metodo non parametrico di Spearman (*: $P < 0.05$)

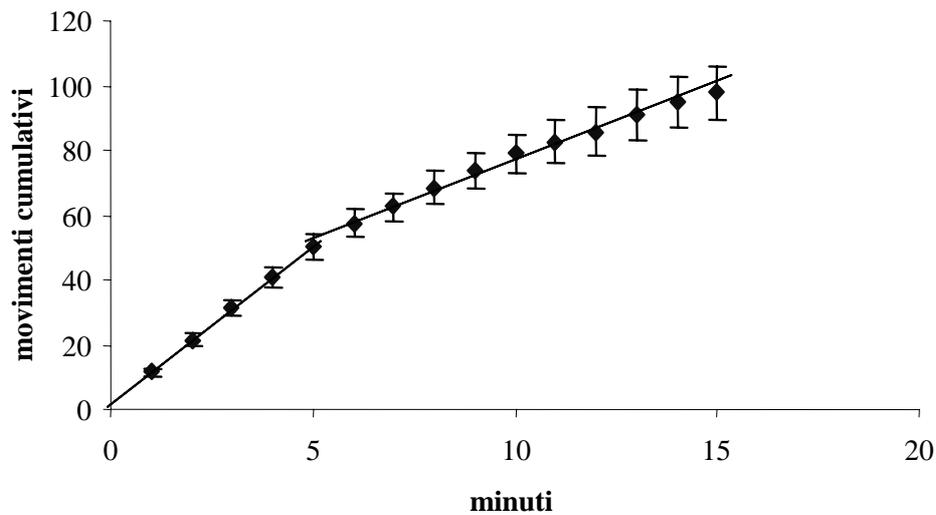


FIGURA 17; Andamento temporale dei movimenti cumulativi al minuto nei ratti esposti a gabbia di LAT.

3.4.2. Confronto controllo-addestrati

Seguendo il protocollo sperimentale utilizzato per l'apprendimento associativo, sono stati effettuate stime dell'attività globale di sintesi proteica, di ciascuna frazione sinaptosomale dei ratti di controllo (n=9) ed esposti alla gabbia di LAT (n=18), le cui analisi sono tuttora in corso.

Tuttavia il confronto dei profili elettroforetici delle proteine sinaptosomali neosintetizzate ha mostrato l'assenza di differenze nell'intensità delle bande proteiche dei ratti esposti alla gabbia di LAT e di controllo (Fig. 18).

Questi risultati hanno permesso di concludere che le variazioni osservate nell'evitamento attivo a due vie sono specifiche e non riproducibili da altri paradigmi di addestramento.

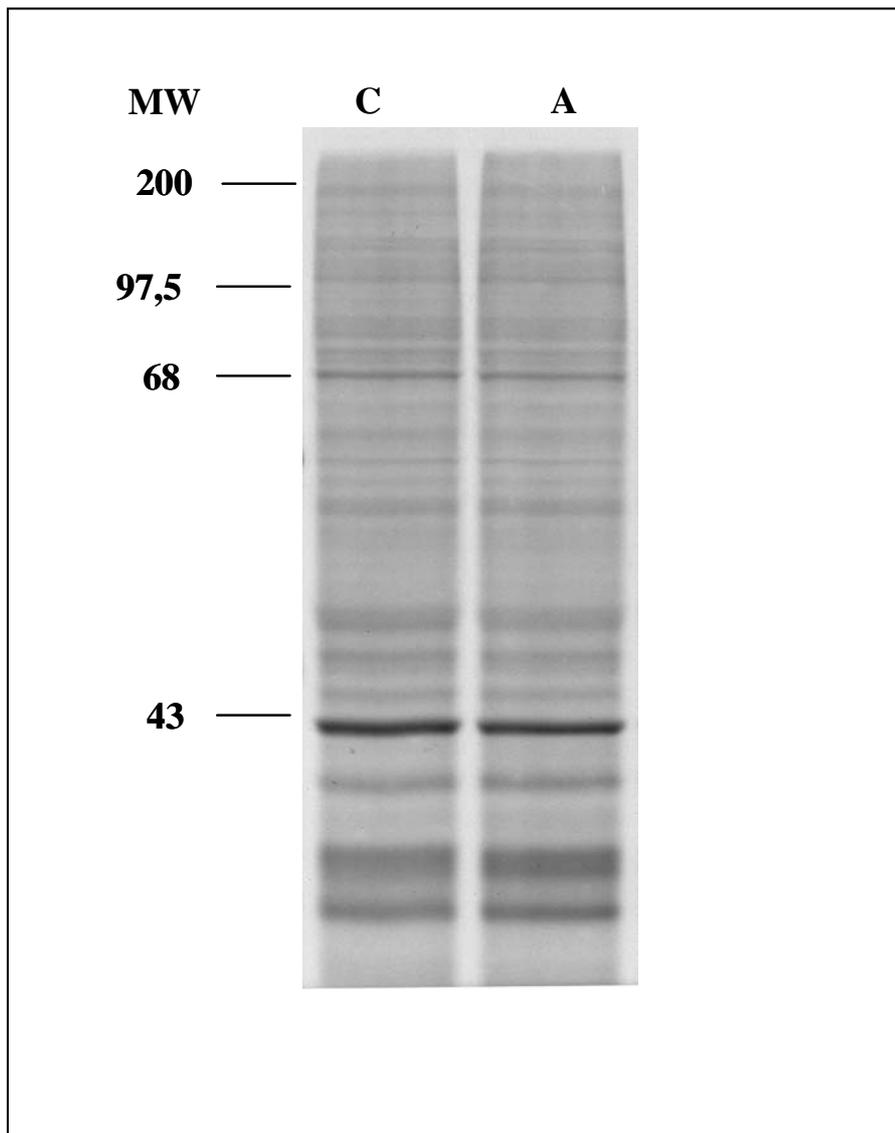


FIGURA 18; Profilo elettroforetico delle proteine sinaptosomali neosintetizzate nei ratti di controllo **C** e addestrati **A**, della neocorteccia comprensiva di ippocampo. A sinistra i pesi molecolari ricavati dalla mobilità relativa delle proteine a peso molecolare noto (MW)

4. CONCLUSIONI

Gli esperimenti sulle fettine di lobo ottico hanno provveduto alla prima dimostrazione della sintesi locale di RNA presinaptico. Infatti, nelle fettine di lobo ottico incubate con [³H]uridina, RNA sinaptosomale neosintetizzato si accumula nei grandi sinaptosomi presinaptici che originano dalle terminazioni nervose dei fotorecettori. Siccome il corpo cellulare è assente dai lobi ottici, i dati provano l'origine locale dell'RNA presinaptico e suggeriscono la sua sintesi da parte delle cellule gliali, in analogia a quanto succede nell'assone gigante perfuso.

Questi dati suggeriscono l'esistenza di un sistema di espressione genica locale, basato su una stretta collaborazione tra il compartimento gliale e i domini periferici dei neuroni.

D'altra parte gli esperimenti sul ratto hanno dimostrato che un apprendimento associativo di tipo complesso, come l'evitamento attivo a due vie, produce un' aumentata sintesi in due proteine sinaptosomali. Tale aumento è specifico e non riproducibile in altri paradigmi di apprendimento, come l'abitudine spaziale (apprendimento non-associativo), permettendo di concludere che i fenomeni plastici modulano l'attività di sintesi proteica sinaptica.

Questi risultati nel loro insieme sottolineano la relativa autonomia delle regioni neuronali periferiche nel mantenimento e nella plasticità di questi domini.

5. BIBLIOGRAFIA

- 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
- Autilio, L.A., Appel, S.H., Pettis, P., Gambetti, P.L. (1968). Biochemical studies of synapses in vitro. Part I: Protein synthesis. *Biochem* **7**: 2615-2622.
- Baas, P.W. and Brown, A. (1997) Slow axonal transport: the polymer transport model. *Trends Cell Biol.* **7**: 380-384
- Beaumont V et al. (2001). Phosphorylation and local presynaptic protein synthesis in calcium- and calcineurin-dependent induction of crayfish long-term facilitation. *Neuron* **23**: 389-401.
- Benech, J.C., Crispino, M., Kaplan, B.B., Giuditta, A. (1999) Protein synthesis in presynaptic endings of the squid brain: modulation by calcium ions. *J. Neurosci. Res* **55**: 776-781
- Bittner G.D. (1991) Long term survival of anucleate axons and its implications for nerve regeneration. *Trends in Neurosci* **14**: 188-193
- Bleher, R., and Martin, R. (2001) Ribosomes in the squid giant axon. *Neuroscience* **107**: 527-534
- Casadio A et al. (1999). A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell* **99**: 213-157.
- Chun, J.T., Gioio, A.E., Crispino, M., Eyman, M., Giuditta, A., Kaplan B.B. (1997) Molecular cloning and characterization of a novel mRNA present in the squid giant axon. *J. Neurosci. Res* **49**: 144-153.
- Chun, J.T., Gioio, A.E., Crispino, M., Eyman, M., Giuditta, A., Kaplan B.B. (1997) Molecular cloning and characterization of a novel mRNA present in the squid giant axon. *J. Neurosci. Res* **49**: 144-153.
- Chun, J.T., Gioio, A.E., Crispino, M., Giuditta, A., Kaplan B.B. (1995) Characterization of squid enolase mRNA: sequence analysis, tissue distribution, and axonal localization. *Neurochem. Res* **20**: 923-930
- Cotman, C.W., Taylor, D.A. (1971) Autoradiographic analysis of protein synthesis in synaptosomal fraction. *Brain Res* **29**: 366-372.
- Crispino M et al. (1993)a Protein synthesis in a synaptosomal fraction from squid brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **4**: 276-284.
- Crispino M et al. (1993)b. Neurofilament proteins are synthesized in nerve endings from squid brain. *J. Neurochem.* **61**: 1134-1136.
- Crispino M et al. (1997). Active polysomes are present in the large presynaptic endings of the synaptosomal fraction from squid brain. *J. Neurosci.* **9**: 7694-7702.
- Crispino M et al. (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
- Edström, A. (1969). Sedimentation analysis of ribonucleic acid extracted from isolated Mauthner nerve fibre components. *J. Neurochem.* **16**, 53-66.
- Eyman, M., Crispino, M., Kaplan, B.B. & Giuditta, A. (2003). Squid photoreceptor terminals synthesize calexcitin, a learning related protein. *Neurosci. Lett.* **347**, 21-24.

- Gafurov, B., Urazaev, A.K., Grossfeld, R.M. & Lieberman, E.M. (2001). N-acetylaspartylglutamate (NAAG) is the probable mediator of axon-to-glia signaling in the crayfish medial giant nerve fiber. *Neurosci.* **106**, 227-235
- Gainer, H., Tasaki, I. & Lasek, R.J. (1977). Evidence for the glia-neuron protein transfer hypothesis from intracellular perfusion studies of squid giant axons. *J. Cell Biol.* **74**, 524-530
- Lasek, R.J., Gainer, H. & Barker, J.L. (1977). Cell-to-cell transfer of glial proteins to the squid giant axon. The glia-neuron protein transfer hypothesis. *J. Cell Biol.* **74**: 501-523.
- Gambetti, P.L., Autilio-Gambetti, L.A., Gonatas, N.K., Shafer, B., (1972). Protein synthesis in synaptosomal fractions, Ultrastructural radioautographic study. *J. Cell Biol* **52**: 526-535.
- Gioio, A.E. et al. (2001). Local synthesis of nuclear-encoded mitochondrial proteins in the presynaptic nerve terminal. *J. Neurosc. Res.* **64**, 447-453.
- Gioio, A.E. et al. (2004). Nerve terminals of squid photoreceptor neurons contain a heterogeneous population of mRNAs and translate a transfected reporter mRNA. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 865-872.
- 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 et al. (1986) Messenger RNA in squid axoplasm. *Neurochem. Intern.* **8**: 336-433.
- Giuditta, A. et al. (1991). Active polysomes in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurosc. Res.* **26**, 18-28.
- Giuditta, A., Cupello, A. & Lazzarini, G. (1980). Ribosomal RNA in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurochem.* **34**, 1757-1766.
- Giuditta, A., Dettbarn, W.D. & Brzin M. (1968). Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**, 1284-1287.
- Giuditta, A., D'Udine, B. & Pepe, M. (1971). Uptake of protein by the giant axon of the squid. *Nature New Biol.* **229**, 29-30.
- Giuditta, A., Eyman, M. & Kaplan, B.B. (2002). 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., Kaplan, B.B., van Minnen, J., Alvarez, J. & Koenig, E. (2002). Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci.* **25**, 400-404.
- Giuditta, A., Metafora, S., Felsani, A., Del Rio, A. (1977) Factors for protein synthesis in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurochem* **11**: 1393-1395
- Grafstein, B. & Forman, D.S. (1980). Intracellular transport in neurons. *Physiol. Rev.* **60**, 1167-1283.
- Henn, F. A., Anderson, D.J., Rustad, D.G., (1976). Glial contamination of synaptosomal fraction. *Brain RES* **101**:341-344.
- Hyden, H. & Egyhazi, E. (1964). Changes in RNA content and base composition in cortical neurons of rats in a learning experiment involving transfer of handedness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **52**, 1030-1035.
- Ingoglia, N.A. et al. (1983). Incorporation of ³H-amino acids into proteins in a partially purified fraction of axoplasm: evidence for transfer RNA mediated, post-translational protein modification in squid giant axon. *J. Neurosci.* **3**, 2463-2473.
- Jimenez, C.J. et al. (2002). Protein synthesis in synaptosomes: a proteomic analysis. *J. Neurochem.* **81**, 735-744.
- 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
- Kandel E.R., (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Scienze* **294**:1030-1038.
- Kandel E.R., (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Scienze* **294**:1030-1038.

- Kandel, E.R. et al. (2003) *Principi di Neuroscienze*
- Kang H, Shuman EM (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* **193**: 1312-1316.
- 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, Martin R (1996) Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner axon. *J. Neurosci.* **8**: 1310-1321.
- Koenig, E. & Giuditta, A. (1999). Protein synthesizing machinery in the axon compartment. *Neurosci.* **89**, 5-15.
- Koenig, E. & Martin, R. (1996). Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J. Neurosci.* **16**, 1400-1411.
- Koenig, E. (1979) Ribosomal RNA in Mauthner axon: implications for a proyein synthesizing machinery in myelinated axons. *Brain Res* **175**: 95-107
- Koenig, E. (1984) Local synthesis of axonal protein. In: Laitha, A. (Ed.), *Handbook of Neurochemistry* vol. 7. Plenum, New York, pp. 315-340.
- Koenig, E. (1991) Evaluation of local synthesis of axonal proteins in the goldfish Mauthner cell axon and axons of dorsal and ventral roots of the rat brain. *Mol. Cell. Neurosci* **2**: 384-394
- Koenig, E., Martin, R., Titmus, M. & Sotelo-Silveira, J.R. (2000). Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J. Neurosci.* **20**, 8390-8400.
- Landry, C., Crine, P., DesGroseillers, L. (1991) Differential expression of neuropeptide gene mRNA within the LUQ cells of *Aplysia californica*. *J. Neurobiol* **23**: 89-101
- Lieberman, E.M., Hargittai, P.T. & Grossfeld, R.M. (1994). Electrophysiological and metabolic interactions between axons and glia in crayfish and squid. *Progr. Neurobiol.* **44**, 333-376.
- Mahajan-Miklos, S. & Cooley, L. Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Devel. Biol.* **165**, 336-351 (1994).
- Martin KC et al. (1997) Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* **91**: 919-929.
- Martin KC et al. (2000) Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**: 587-592.
- Martin, R., Fritz, W., Giuditta, A. (1989) Visualization of polyribosomes in the postsynaptic area of the squid giant synapse by electron spectroscopic imaging. *J. Neurocytol.* **418**: 11-18
- Martin, R., Vaida, B., Bleher, R., Crispino, M. & Giuditta, A. (1998). Protein synthesizing units in presynaptic and postsynaptic domains of squid neurons. *J. Cell Sci.* **111**, 3157-3166.
- 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.
- Mohr, E., Richter, D. (1992) Diversity of messenger RNAs in the axonal compartment of peptidergic neurons in the rat. *Eur. J. Neurosci* **4**: 870-876
- Montarolo P.G., Goelet P. , Castellucci V.F., Kandel E.R., and Schacher S.(1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Scienze* **234**:1249-1254.
- Montarolo P.G., Goelet P. , Castellucci V.F., Kandel E.R., and Schacher S. (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Scienze* **234**:1249-1254.
- Morgan, I.G., Austin, L. (1968). Synaptosomal protein syntesis in a cell-free system. *J.Neurochem* **15**: 41-51.

- Motta, C.M., Castriota Scanderbeg, M., Filosa, S. & Andreuccetti, P. (1995). Role of pyriform cells during the growth of oocytes in the lizard *Podarcis sicula*. *J. Exp. Zool.* **273**, 247-256.
- Otani S. Marshall C.J., Tate W.P., Goddard G.V., and Abraham W.C. (1989). Maintenance of long-term potentiation in rat dentate gyrus requires protein synthesis but not messenger RNA synthesis immediately post-tetanzation. *Neurosci* **28**:519-526.
- Pannese, E., Ledda, M. (1991) Ribosomes in myelinated axons of the rabbit spinal ganglion neurons. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **23**: 33-38
- 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
- Pevzner, L.Z. (1971). Topochemical aspects of nucleic acid and protein metabolism within the neuron-neuroglia unit of the spinal cord anterior horn. *J. Neurochem.* **18**, 895-907.
- Kuffler, S.W. & Nicholls, J.G. (1966). The physiology of neuroglial cells. *Ergeb. Physiol.* **57**: 1-90
- Rao, A., 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
- Schacher S, Wu F (2002). Synapse formation in the absence of cell bodies requires protein synthesis. *Neurosci.* **14**: 1031-1030.
- Sheller, R.A. & Bittner, G.D. (1992). Maintenance and synthesis of proteins for an anucleate axon. *Brain Res.* **580**, 68-80.
- Sieghart, W., Singer, E. (1979). Sedimentation and release properties of glia particles present in P2-fraction isolated from rat cerebral cortex. *Brain Res* **170**: 203-208.
- Sotelo, J.R., Kun, A., Benech, J.C., Giuditta, A., Morillas, J., Benech, C.R. (1999) Ribosomes and polyribosomes are present in the squid giant axon: an immunocytochemical study. *Neuroscience* **90**: 705-715
- Steward, O. & Schuman, E.M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* **40**, 347-359.
- Tobias GS, Koenig E (1975) Axonal protein synthesizing activity during the early outgrowth period following neurotomy. *Exp. Neurol.* **49**: 221-234.
- Tobias, G.S. & Koenig, E. Axonal protein synthesizing activity during the early outgrowth period following axotomy. *Exp. Neurol.* **49**, 221-234 (1975).
- 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. (1994). RNA in the axonal domain: a new dimension in neuronal functioning? *Histochem J.* **26**, 377-391.
- van Minnen, J., Bergman, J.J., van Kesteren, E.R., Smit, A.B., Garaerts, W.P., Lukoviak, 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., 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
- Weiner, O. D., Zorn, A. M., Krieg, P. A., Bittner, G. D. (1996) Medium-weight neurofilament mRNA in goldfish Mauthner axoplasm. *Neurosci. Lett.* **213**: 83-86
- Weiss, P., 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.

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 VP (1993) Thirty years of synaptosomal research. *J. Neurocytol.* **14**: 726-733.