

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 GENERALITÀ	2
1.2 SINTESI PROTEICA LOCALE	6
1.3 SINTESI PROTEICA NELLE TERMINAZIONI NERVOSE.....	10
1.3.1 Sinaptosomi del cervello di ratto	10
1.3.2 Sinaptosomi del lobo ottico di calamaro	12
1.4 APPRENDIMENTO	14
1.5 SCOPO DEL LAVORO	15

2. ESPERIMENTI CON I SINAPTOSOMI DI RATTO

2.1 MATERIALI E METODI	17
2.1.1 Preparazione dei sinaptosomi dalla corteccia cerebrale	17
2.1.2 Preparazione dei microsomi dalla corteccia cerebrale	18
2.1.3 Trattamento con RNAsi	19
2.1.4 Estrazione dell'RNA	19
2.1.5 Analisi RT-PCR.....	19
2.1.6 Test di evitamento attivo a due vie.....	21
2.2 RISULTATI.....	24
2.2.1 RNA messaggeri nei sinaptosomi e nei microsomi	24
2.2.2 Modulazione dell'espressione genica nei sinaptosomi del cervello di ratto	28

3 ESPERIMENTI SUL CALAMARO

3.1 MATERIALI E METODI	
Perfusione dell'assone gigante del calamaro.....	35
3.2 RISULTATI.....	39
Origine locale degli RNA assonali	39

4. CONCLUSIONI

43

5. BIBLIOGRAFIA

45

1 INTRODUZIONE

1.1 GENERALITA'

Il sistema nervoso è un sistema altamente complesso, in grado di acquisire innumerevoli informazioni sia dall'ambiente esterno che dall'interno dell' organismo, di selezionarle ed integrarle con i dati delle esperienze precedentemente acquisite. Questo complesso processo di elaborazione è il risultato di una intensa attività bioelettrica e biochimica che esprime una delle caratteristiche peculiari del cervello: la plasticità, cioè la capacità di modifiche funzionali e strutturali in risposta a stimoli nuovi.

Il sistema nervoso comprende due distinte popolazioni cellulari: neuroni e cellule gliali.

Le cellule gliali circondano i neuroni e forniscono loro una rete di sostegno. Inoltre, esse intervengono nello sviluppo del sistema nervoso guidando la migrazione degli assoni. Sono più numerose dei neuroni e costituiscono circa la metà del volume del sistema nervoso.

I neuroni sono cellule polarizzate altamente differenziate per l'elaborazione e il trasferimento delle informazioni. Essi sono costituiti da un corpo cellulare (soma o pericario) da cui si dipartono due tipi di prolungamenti: i dendriti e l'assone. I dendriti hanno una struttura simile a quella del corpo cellulare da cui originano come processi generalmente numerosi e riccamente arborizzati, deputati alla ricezione dei segnali provenienti dalle altre cellule nervose. L'assone è generalmente unico e sottile, si estende dal corpo cellulare anche per grandi distanze, ramificandosi all'estremità distale in un'ampia arborizzazione grazie alla quale il neurone stabilisce rapporti giunzionali con le altre cellule nervose per la trasmissione delle informazioni elaborate nel corpo cellulare.

Il passaggio interneurale di tali informazioni è assicurato dalle sinapsi che si distinguono in elettriche e chimiche per le loro modalità di trasmissione. Nelle prime, lo stimolo viaggia da una cellula nervosa all'altra sotto forma di una corrente elettrica, il cui passaggio è garantito da una continuità intercellulare tra la zona presinaptica che trasmette l'informazione e quella postsinaptica che la riceve. Nelle sinapsi chimiche la trasmissione dello stimolo si realizza invece con il rilascio di un mediatore chimico (neurotrasmettitore) dalla regione presinaptica. Il neurotrasmettitore si lega a recettori specifici localizzati sulla membrana postsinaptica nella quale induce variazioni di conduttanze ioniche e quindi genesi di un nuovo segnale elettrico.

I neuroni hanno la caratteristica di modificare le proprie connessioni in risposta a stimoli nuovi. Infatti, la modulazione dell'attività elettrica consente di rafforzare determinate connessioni sinaptiche o indebolire ed eliminare quelle silenti.

Le modificazioni plastiche del sistema nervoso implicano, quindi, un rimodellamento delle strutture sinaptiche, che richiede attivazione genica e quindi modificazioni del corredo proteico sia presinaptico che postsinaptico (Montarolo et al., 1986; Otani et al., 1989). Ciò giustifica il notevole interesse per l'origine e le proprietà delle molecole sinaptiche nello studio degli eventi plastici del sistema nervoso.

Data la peculiare morfologia del neurone, l'esigenza di un apporto trofico dal corpo cellulare alla periferia neuronale, considerata priva di capacità biosintetica, ha costituito un argomento sufficiente per postulare l'esistenza di un meccanismo specializzato di trasporto detto flusso assoplasmatico.

Le prime prove dell'esistenza del flusso assoplasmatico risalgono agli anni quaranta grazie al lavoro di Weiss e collaboratori. Questo gruppo,

utilizzando tecniche di compressione di nervi periferici, dimostrò l'esistenza di un flusso in direzione distale di organelli e componenti assoplasmatici (Weiss et al., 1940; 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 (anterogrado) 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 grazie al flusso assoplasmatico retrogrado che procede in direzione opposta alla velocità di 100-200 mm/giorno.

Tuttavia, l'ipotesi secondo cui tutte le proteine dell'assone e delle terminazioni nervose vengono prodotte nel soma e trasferite alla periferia neuronale mediante 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, dal momento che la vita media delle proteine è di gran lunga inferiore ai tempi di trasporto assonali (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 dal soma alle terminazioni nervose che le hanno richieste. Altri punti poco chiari riguardano l'incompatibilità tra la cinetica delle modificazioni plastiche delle terminazioni nervose e i tempi più lunghi richiesti per il trasporto delle proteine che si muovono con il flusso assoplasmatico lento. Infine va ricordato che nei crostacei, ma anche in

mutanti di topo, il segmento distale di un assone separato dal corpo cellulare non va incontro a degenerazione, ma può sopravvivere per lunghi periodi (Lunn et al., 1989; Bittner, 1991; Glass et al., 1993; Benbassat and Spira 1994).

1.2 SINTESI PROTEICA LOCALE

Sulla base delle considerazioni su esposte, e del concetto che le regioni sinaptiche sono le sedi primarie dei processi plastici a lungo termine del sistema nervoso centrale, si è ipotizzata l'esistenza di un modello alternativo che prevede una sintesi locale delle proteine. E' ben noto, infatti, che le modificazioni plastiche richiedono il coinvolgimento di processi di espressione genica che non possono essere considerati di esclusiva competenza dei corpi neuronali. Difatti, numerose evidenze sperimentali indicano l'esistenza di siti extrasomatici di sintesi nei dendriti, negli assoni e nelle terminazioni nervose che conferirebbero alla periferia neuronale una significativa capacità di risposta locale alle sollecitazioni ambientali (Steward and Schuman, 2001; Alvarez, Giuditta, Koenig, 2000; Giuditta et al., 2002).

Tra l'altro, già negli anni settanta, le strutture sinaptiche, isolate come vescicole racchiuse da membrana, i sinaptosomi (Whittaker, 1993), avevano mostrato la capacità di sintetizzare proteine. Questa attività, attribuita inizialmente alle terminazioni nervose (Koenig e Giuditta, 1999), è stata di recente ritenuta di origine postsinaptica (Steward e Schuman, 2001; Aakalu et al., 2001; Smith et al., 2001). Tale conclusione è stata anche fortemente avvalorata dalla dimostrazione dell'esistenza di polisomi attivi nelle spine dendritiche (Steward e Schuman, 2003).

Mentre è ormai generalmente accettato che l'attività traduzionale dei sinaptosomi di mammifero sia dovuta alle regioni dendritiche, numerosi altri studi hanno dimostrato l'esistenza di un sistema locale di sintesi proteica negli assoni e nelle terminazioni nervose di vertebrati ed invertebrati. Nei primi studi su assoni di grandi dimensioni, come l'assone di Mauthner e l'assone gigante del calamaro, si è dimostrato che essi sono in grado di incorporare

amminoacidi radioattivi nelle proteine in reazioni sensibili agli inibitori della sintesi proteica citoplasmatica (Giuditta et al., 1968; Alemà and Giuditta, 1976; Koenig, 1984).

Una delle principali ragioni per cui gli assoni erano stati ritenuti incapaci di sintetizzare proteine era basata sulla apparente mancanza di ribosomi in preparati assonali osservati al microscopio elettronico (Peters et al., 1970). Alcune osservazioni, tuttavia, contrastano con l'idea che il compartimento assonale sia del tutto privo di ribosomi. Difatti l'identificazione di RNA ribosomale nell'assone di Mauthner e nell'assone gigante del calamaro ha fornito una convincente indicazione dell'esistenza di ribosomi assonali (Koenig, 1979; Giuditta et al., 1980). Questi dati sono stati successivamente confermati dall'isolamento di polisomi attivi dall'assoplasma di assoni giganti del calamaro (Giuditta et al., 1991), e dalla dimostrazione che l'assone gigante contiene polisomi evidenziabili morfologicamente con metodi di microscopia elettronica (ESI) che eliminano l'ambiguità della microscopia elettronica convenzionale. Ribosomi sono stati dimostrati anche negli assoni di vertebrati, in strutture periferiche distribuite lungo tutto l'assone (placche periassoplasmatiche) (Koenig et al., 2000; Koenig e Martin, 1996). Il piccolo spessore di tali placche e la loro distribuzione intermittente spiegano in gran parte il perchè della loro mancata identificazione con la microscopia elettronica convenzionale.

D'altra parte, di particolare importanza è stata la dimostrazione dell'esistenza di una famiglia eterogenea di mRNA nell'assone gigante del calamaro (Giuditta et al., 1986), nei cui pattern di traduzione compaiono proteine del neurofilamento (Giuditta et al., 1991), β -actina e β -tubulina (Kaplan et al., 1992), chinesina (Gioio et al., 1994) e l'enolasi (Chun et al., 1995). La presenza di tali RNA messaggeri suggerisce che elementi del citoscheletro e del sistema di trasporto assonale siano sintetizzati localmente.

RNA messaggeri sono stati identificati anche negli assoni di mammifero. In neuroni di cervello di ratto in coltura è stato osservato l'mRNA per tau, una proteina neuronale associata ai microtubuli (Litman et al., 1993). Nel tratto ipotalamo-ipofisario del ratto è stata dimostrata la presenza di mRNA che codificano per ossitocina (Jirikowski et al., 1990), vasopressina (Mohr et al., 1991), e neurofilamento leggero (Mohr and Richter, 1992). Infine, nei terminali nervosi dei neuroni olfattivi dei roditori è presente l'mRNA per l'olfactory marker protein (OMP) (Wensley et al., 1995).

Inoltre, analisi morfologiche eseguite con la tecnica ESI hanno confermato la presenza di polisomi sia nella zona prossimale che distale dell'assone gigante. Questo tipo di analisi, già precedentemente menzionata, ha permesso di osservare che i polisomi assonali sono in genere localizzati nello strato più corticale dell'assoplasma (Giuditta et al., 1991).

E' opportuno ricordare che, inizialmente, l'esistenza di un sistema di sintesi proteica locale nell'assone gigante del calamaro non consentiva di stabilirne la localizzazione nell'assoplasma o nelle cellule gliali periassonali, da cui le proteine neosintetizzate potevano essere trasferite all'assone. Quest'ultima ipotesi è stata proposta per la prima volta da Lasek (1974). D'altra parte, esperimenti su assoni isolati hanno fornito evidenti indicazioni che l'RNA assoplasmatico sia sintetizzato nelle cellule della glia periassonale (Cutillo et al., 1983; Rapallino et al., 1988). Infine, è interessante ricordare l'esistenza di un meccanismo simile di trasferimento intracellulare anche al di fuori del sistema nervoso. Si è dimostrato, infatti, che gli oociti di rettili ed insetti ricevono RNA neosintetizzati dalle cellule follicolari (Mahajan-Miklos, S., e Cooley L., 1994; Motta, C.M et al., 1995).

Nel loro complesso questi dati costituiscono una prova inconfutabile dell'esistenza di un sistema locale di sintesi proteica nell'assone gigante di

calamaro. Tale conclusione ha suggerito la possibilità che un sistema simile potesse essere presente anche nelle terminazioni nervose.

1.3 SINTESI PROTEICA NELLE TERMINAZIONI NERVOSE

1.3.1 Sinaptosomi del cervello di ratto

La localizzazione di un sistema biosintetico nelle terminazioni nervose è stata studiata da numerosi gruppi di ricerca sin dagli anni '70 utilizzando frazioni purificate di sinaptosomi di cervello di ratto. I sinaptosomi, identificati per la prima volta nel 1971 da Whittaker e Greengard, sono strutture subcellulari che si formano durante l'omogenizzazione del cervello, in seguito al distacco della terminazione nervosa dall'assone e all' istantanea chiusura della membrana plasmatica. Si formano così vescicole delimitate da membrana che conservano la morfologia e la composizione biochimica propria delle terminazioni presinaptiche. Per tale ragione, essi rappresentano un sistema "*in vitro*" molto utile per esaminare l'eventuale presenza di un sistema di sintesi proteica nelle terminazioni presinaptiche.

Le prime prove dell'esistenza di una sintesi proteica sinaptosomale si ebbero in seguito alla dimostrazione che fettine di cervello di ratto, incubate in presenza di leucina radioattiva, presentavano una incorporazione lineare dell'aminoacido nella frazione sinaptosomale. In esperimenti successivi, la frazione sinaptosomica veniva incubata direttamente con aminoacidi radioattivi, dimostrando la sua capacità di sintesi proteica (Morgan e Austin, 1968). Ulteriori esperimenti confermarono la capacità della frazione sinaptosomale di incorporare aminoacidi radioattivi, e dimostrarono che tale incorporazione non richiedeva l'aggiunta di ATP o di altri supplementi energetici (Autilio et al., 1968). Ciò suggeriva la presenza di una fonte endogena di energia molto probabilmente mitocondriale.

Il susseguirsi di ulteriori indagini rese controversa l'interpretazione dei dati. Si riteneva improbabile che il sistema citoribosomale fosse presente nelle terminazioni nervose, e si concluse che si trattava di contaminazione da parte

di strutture subcellulari di tipo diverso, anch'esse delimitate da membrane e contenenti ribosomi ed enzimi solubili.

La discordanza dei dati relativi al sistema di sintesi proteica sinaptosomale, dipendente in parte dalle diverse modalità di preparazione dei sinaptosomi oltre che dalla integrità e purezza della frazione sinaptosomale, è ancora attuale. Infatti, ancora oggi il metodo di preparazione della frazione sinaptosomale non consente di ottenere una frazione completamente pura, per cui risulta difficile attribuirne la sintesi proteica alle terminazioni nervose piuttosto che a strutture contaminanti. Un passo avanti in tal senso è stato effettuato con recenti esperimenti di identificazione nei sinaptosomi di cervello di ratto di mRNA che codificano per proteine presinaptiche, postsinaptiche o gliali. Infatti, la loro presenza in tali strutture implicherebbe il loro coinvolgimento nei processi di traduzione locale che ivi hanno sede. I primi risultati ottenuti mediante analisi di RT-PCR hanno dimostrato che la frazione sinaptosomale risulta particolarmente ricca di mRNA che codificano per proteine presinaptiche (Crispino et al., 2001) avvalorando così l'ipotesi di una localizzazione presinaptica del sistema di traduzione.

Inoltre, recenti esperimenti effettuati nel nostro laboratorio (dati non pubblicati) hanno evidenziato che la sintesi proteica sinaptosomale è fortemente dipendente dalla concentrazione di cationi monovalenti (Na^+ e K^+) e da diversi modulatori del calcio. In tali condizioni, il processo di sintesi presenta un andamento bifasico che persiste anche in condizioni di completa inibizione della sintesi proteica mitocondriale. Questo dato suggerisce che la sintesi proteica sinaptosomale riflette l'attività di più di un sistema di sintesi proteica citoplasmatico, uno derivante dalle terminazioni nervose e l'altro dai frammenti dendritici. Questa conclusione contrasta con le recenti ipotesi a sostegno della esclusiva localizzazione del sistema biosintetico nelle strutture postsinaptiche (Steward and Schuman, 2003), ma evidenzia un probabile

contributo alla sintesi proteica sinaptosomale da parte di componenti presinaptici, postsinaptici e gliali.

1.3.2 Sinaptosomi del lobo ottico di calamaro

La presenza di un sistema di sintesi proteica locale è stata studiata anche nelle terminazioni nervose del cervello di calamaro (Crispino et al., 1993a) che offre notevoli vantaggi rispetto alle preparazioni da cervello di ratto. Infatti, nel calamaro (come in altri invertebrati) le connessioni sinaptiche sono solo di tipo asso-assoniche. Di conseguenza, le strutture presenti nella frazione sinaptosomica sono da ricondurre in buona parte alle terminazioni assionali. Inoltre, la contaminazione gliale è molto meno significativa, considerato il minor numero di cellule gliali presenti nel cervello degli invertebrati. Ciò garantisce che la componente principale della frazione sinaptosomale derivi dalle terminazioni assionali. Inoltre, la preparazione dei sinaptosomi del lobo ottico di calamaro richiede tempi più brevi e forze centrifughe di gran lunga inferiori a quelli necessari per i sinaptosomi da cervello di ratto (Hernandez, 1976). Infine, i sinaptosomi non sedimentano ma formano uno strato galleggiante, il che garantisce una maggiore preservazione della loro integrità strutturale. Queste considerazioni giustificano l'alto tasso di sintesi proteica riscontrato nei sinaptosomi del lobo ottico di calamaro.

Studi condotti su tali sinaptosomi hanno dimostrato che essi sono dotati di un sistema di sintesi proteica capace di incorporare aminoacidi radioattivi in maniera lineare per almeno 90 minuti (Crispino, 1993a). Il confronto tra i profili elettroforetici delle proteine neosintetizzate dai sinaptosomi e dai corpi neuronali ha mostrato significative differenze, in particolare per le proteine del neurofilamento, identificate grazie ad analisi di immunoassorbimento con

anticorpo specifico. Ciò consente di escludere la possibilità che le proteine sinaptosomali derivino da frammenti di cellule gliali o di corpi cellulari (Crispino et al., 1993b). Inoltre, l'autoradiografia al microscopio elettronico ha dimostrato che in una frazione sinaptosomale incubata con leucina marcata, le proteine radioattive sono localizzate prevalentemente nelle terminazioni nervose presinaptiche. D'altra parte con il metodo ESI (Electron Spectropic Imaging) che permette la visualizzazione selettiva degli atomi di fosforo di cui i ribosomi risultano particolarmente ricchi, è stato possibile evidenziare la presenza di polisomi nelle terminazioni presinaptiche dei fotorecettori retinici del calamaro (Crispino et al., 1997). Inoltre si è dimostrata la presenza nella frazione sinaptosomale di una eterogenea popolazione di mRNA (Gioio et al., 2004), e la sintesi di più di 80 diverse specie proteiche, tra cui proteine del citoscheletro, enzimi e proteine mitocondriali codificate dal DNA nucleare (Gioio et al., 2001; Jimenez et al., 2002) e la calexcitina, una proteina coinvolta nei processi di apprendimento (Eyman et al., 2003). Queste ultime osservazioni risultano particolarmente rilevanti in quanto rafforzano il concetto di autonomia del territorio assonale e presinaptico. Nel complesso, questi dati rappresentano la prima dimostrazione che le terminazioni presinaptiche sono capaci di sintesi proteica, almeno in un sistema modello come quello del calamaro. L'esistenza di un meccanismo di sintesi locale a livello presinaptico è stata confermata anche in un altro sistema. Infatti, si è dimostrato che le terminazioni nervose dei neuroni di *Aplysia* in coltura sono capaci di sintetizzare proteine e che tale sistema locale è essenziale per la formazione della memoria a lungo termine (Martin et al., 1997). Risulta quindi evidente che la capacità di sintetizzare proteine a livello della terminazione presinaptica riveste un ruolo essenziale nei processi di mantenimento e di plasticità delle sinapsi.

L'ottenimento di risultati così incoraggianti ha suggerito l'idea di studiare ulteriormente l'attività di sintesi proteica della frazione sinaptosomale preparata dal cervello di ratto per verificare se essa possa essere attribuita, almeno in parte, alle terminazioni nervose e possa essere modulata dall'esperienza.

1.4 APPRENDIMENTO

L'apprendimento è il processo con cui il sistema nervoso memorizza nuove informazioni. Esso comprende una forma *associativa* ed una forma *non associativa*.

Mentre l'apprendimento non associativo riguarda l'effetto della stimolazione di un unico canale sensoriale, l'apprendimento associativo implica, invece, lo stabilirsi di una relazione tra più stimoli e/o risposte. Questo tipo di apprendimento è generalmente suddiviso in *condizionamento classico* o *Pavloviano* e *condizionamento strumentale* o *operante*. Nel condizionamento classico uno stimolo neutro, stimolo condizionato (SC), come la luce o un suono, inefficace da solo a provocare una risposta comportamentale, diventa efficace solo se associato ad un secondo stimolo detto stimolo incondizionato (SI). Difatti, ripetute presentazioni in cui SC è accoppiato ad SI fanno sì che anche lo stimolo condizionato evochi una risposta comportamentale. Mediante il condizionamento classico, l'animale impara a prevedere le relazioni temporali di causa-effetto che hanno luogo nell'ambiente. Il condizionamento operante si verifica, invece, quando il soggetto deve fornire delle risposte per ottenere una ricompensa o evitare una punizione; un esempio di questo tipo è dato dall'evitamento attivo a due vie.

1.5 SCOPO DEL LAVORO

Gli esperimenti finora descritti hanno evidenziato, in diversi modelli sperimentali, una compartimentazione dell'attività biosintetica delle proteine nella cellula neuronale, con un sistema localizzato nel pericario, uno nella regione postsinaptica e uno nel territorio assonale.

Nella convinzione che un sistema di sintesi locale nelle terminazioni nervose abbia notevoli implicazioni nei processi di plasticità cerebrale, abbiamo esteso i nostri studi alle sinapsi del mammifero, dove il problema della contaminazione della frazione sinaptosomale ha reso finora più difficile l'identificazione di un sistema di traduzione a localizzazione presinaptica.

Per superare tale difficoltà, il nostro lavoro sperimentale è stato finalizzato all'identificazione, mediante la tecnica di RT-PCR, di specifici mRNA sinaptosomali che codificano per proteine selettiva localizzazione presinaptica (GAT-1) o gliale (GFAP). L'identificazione di questi mRNA sinaptosomali dimostrerebbe il loro coinvolgimento nei processi locali di traduzione e, quindi, la presenza di un sistema presinaptico di sintesi proteica.

Una premessa necessaria per tale conclusione richiede la dimostrazione che questi mRNA siano effettivamente localizzati nei sinaptosomi e non derivino da contaminanti microsomiali.

Il confronto tra le frazioni sinaptosomale e microsomiali preparate in un mezzo disaggregante i polisomi (privo di ioni Mg^{++} e K^+) o in grado di mantenerne la struttura (contenente tali ioni), ci è sembrato necessario per stabilire la natura sinaptica di questi mRNA.

Inoltre, per definire il ruolo svolto dalla periferia neuronale nei fenomeni di plasticità sinaptica, si è valutato l'effetto dell'esperienza sulla espressione genica nei sinaptosomi. A tal fine si è analizzato il contenuto di specifici mRNA presinaptici e gliali nella frazione sinaptosomale di tre diverse regioni cerebrali (corteccia, ippocampo, cervelletto) di ratti di controllo e di ratti

sottoposti ad un test di apprendimento associativo (evitamento attivo a due vie).

Infine, in esperimenti effettuati presso i laboratori del Marine Biological Laboratory di Woods Hole, MA, USA, si è analizzato il problema dell'origine locale degli mRNA che determinano il corredo proteico e la funzionalità del compartimento assonale. Naturalmente, nel caso di RNA trascritti su DNA nucleare, come quelli presinaptici e assonali, una sintesi locale potrebbe avere luogo solo nelle cellule gliali. Verifiche sperimentali in tal senso sono state effettuate utilizzando come sistema modello l'assone gigante del calamaro.

2 ESPERIMENTI CON I SINAPTOSOMI DI RATTO

2.1 MATERIALI E METODI

2.1.1 Preparazione dei sinaptosomi dalla corteccia cerebrale

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti maschi adulti del ceppo Wistar (forniti dalla ditta Charles Rivers) di età compresa fra 60 - 80 giorni e del peso di 250 - 300 gr. Gli animali sono stati sistemati in gruppi di due per gabbia, con piena disponibilità di cibo ed acqua, in ambiente caratterizzato da condizioni di temperatura costante (23°C) e cicli luce - buio di 12h (luce dalle ore 6.00 alle ore 18.00).

La preparazione di sinaptosomi è stata effettuata secondo una modificazione del metodo di Rao e Steward (1991).

Gli animali, anestetizzati con CO₂, sono stati sacrificati per decapitazione, e dal cervello sono state rapidamente separate corteccia e ippocampo.

Il tessuto (1 gr circa) è stato omogenato in un omogenizzatore Dounce in 10 volumi di un tampone contenente saccarosio 0,32 M e Tris-Cl 10 mM pH 7.4 (soluzione A). L'omogenato è stato centrifugato a 4000 rpm per un minuto a 4°C in una centrifuga Beckman JA21 (rotore JA 17). Si è così ottenuto un sedimento costituito da nuclei e frammenti cellulari (P1) e un sopranatante (S1). La frazione P1 è stata risospesa in 9 volumi di soluzione A e ricentrifugata nelle medesime condizioni. I due soprinatanti sono stati riuniti e centrifugati a 13000 rpm per 4 minuti a 4°C per ottenere un sedimento costituito da mitocondri, sinaptosomi e mielina (P2), e un nuovo soprinatante (S2). Dopo aver prelevato il soprinatante, il sedimento è stato lavato con egual volume di sol. A, e ricentrifugato nelle stesse condizioni. I due soprinatanti sono stati riuniti per essere successivamente utilizzati per ottenere la frazione microsomale. La frazione P2 risospesa in un opportuno

volume di soluzione A, e diluita fino ad una concentrazione proteica di 4 mg/ml, è stata stratificata (1ml di sospensione) su un gradiente discontinuo di Ficoll in soluzione A (2 ml di 5% Ficoll; 2 ml di 13% Ficoll) preparato circa un'ora prima e tenuto a 4°C. Il gradiente è stato centrifugato in una ultracentrifuga Beckman (24.400 rpm per 45 min a 4°C) utilizzando il rotore SW55.

La frazione contenente i sinaptosomi, prelevata all'interfaccia tra gli strati di Ficoll 5% e 13%, è stata diluita 10 volte con sol. A e centrifugata a 13000 rpm per 20 min a 4°C in una centrifuga Beckman JA21 (rotore JA 17). Il sedimento ottenuto è stato infine risospeso in un opportuno volume di soluzione A, costituendo la frazione sinaptosomale.

Il contenuto proteico è stato valutato con il metodo BIO-RAD usando come proteina di riferimento l'albumina di siero bovino.

2.1.2 Preparazione dei microsomi dalla corteccia cerebrale

Il sopranatante S2, ottenuto come sopra descritto, è stato centrifugato a 25.000 rpm per 60 min. a 4°C nel rotore SW41 di una ultracentrifuga Beckman. Il sedimento ottenuto (P3), risospeso in un opportuno volume di soluzione A, costituisce la frazione microsomale *micA*.

Per la preparazione della frazione *micB*, la corteccia e l'ippocampo isolati dal cervello, sono stati omogenati in 10 volumi di tampone polisomale (saccarosio 0,32 M, Tris-Cl pH 7.4 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, KCl 100 mM, tRNA 25 µg/ml). L'omogenato è stato trattato così come descritto nella sezione 2.1.1. Il sedimento ottenuto (P3) è stato risospeso in un adeguato volume di tampone polisomale.

2.1.3 Trattamento con RNAsi

La frazione sinaptosomale e quelle microsomiali preparate nei due differenti mezzi di omogenizzazione (*micA* e *micB*), sono state incubate in presenza di RNAsi 0.5µg/ml a 37°C per 15 minuti. Come controllo, ciascuna frazione è stata incubata nelle stesse condizioni in assenza di enzima.

Alla fine dell'incubazione si è neutralizzata l'azione dell'RNAsi mediante aggiunta alla frazione sinaptosomale e a quella *micA* di RNAsina 120 U/ml e tRNA 25µg/ml. La frazione *micB* è stata trattata solo con RNAsina, poichè il tampone polisomale contiene già tRNA.

2.1.4 Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto da ognuna delle tre frazioni (sinaptosomi, *micA* e *micB*) in condizioni di controllo, dopo trattamento con RNAsi, e dopo incubazione in assenza dell'enzima.

L'estrazione è stata effettuata utilizzando il TRI-REAGENT (Sigma), secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. L'RNA estratto è stato precipitato utilizzando un volume di isopropanolo, lavato con etanolo 75% e infine risospeso in acqua sterile. La resa e l'integrità dell'RNA purificato sono state valutate, rispettivamente, mediante determinazioni di A_{260} ed elettroforesi su gel di agarosio all'1.5%.

2.1.5 Analisi RT-PCR

L'RNA estratto da ciascuna delle frazioni analizzate (2µg) è stato trascritto in cDNA in una miscela di reazione contenente il tampone per la trascrittasi inversa AMV (Tris-Cl 50 mM pH 8.3; MgCl₂ 10 mM; KCl 50 mM; DTT 10 mM; 0,5µM spermidina), primer esanucleotidi random (0.25

µg/ml), 1.25 mM dNTPs, 13 U trascrittasi inversa AMV (Promega) e 20 U RNAsina. Per la sintesi del cDNA si è incubata la miscela di reazione a 37°C per 60 minuti; una breve esposizione (5 min) a 95°C ha consentito la separazione del cDNA neosintetizzato dallo stampo di RNA.

Un'aliquota della miscela di cDNA (1/20) è stata amplificata in 25 µl di mix di reazione contenente tampone per Taq DNA polimerasi (KCl 50 mM; MgCl₂ 1.5 mM; Tris-Cl 10 mM pH 8.3) (Perkin Elmer), 0.2mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 µM di ogni coppia di primer, 0.5 U Ampli Taq Gold DNA polimerasi (Perkin Elmer). Sono stati utilizzati primer specifici per mRNA codificanti per il trasportatore per il GABA di tipo 1 (GAT-1; upper: GCCTGGGTGCTTGTGTATTT; lower: AATCGCCGTGAACTCTTCAT), per la proteina gliale acida fibrillare (GFAP; upper: GCTGGAGGTGGAGAGGGACA; lower: TGGCGGCGATAGTCRTTAGC; R=A o G), e per l' ipoxantina-fosforibosil-transferasi (HPRT; upper: CCTGCTGGATTACATTAAAGCACTG; lower: CCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGG).

Dopo l'attivazione dell'enzima Ampli Taq Gold (95°C per 11 minuti), ciascun ciclo di PCR (94°C per 40"; 56°C per 30"; 72°C per 1') è stato ripetuto 30 volte. Al termine della reazione si è effettuata una incubazione a 72°C per 5 minuti, per permettere l'estensione finale.

I prodotti amplificati sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% preparato in TBE 0.5% e contenente 0.5µg/ml di etidio bromuro e, successivamente, visualizzati e fotografati agli UV. I negativi così ottenuti sono stati sviluppati ed utilizzati per una analisi quantitativa effettuata per via densitometrica (Ultrascan XL LKB).

2.1.6 Test di evitamento attivo a due vie

Ogni esperimento è stato condotto su una coppia di animali costituita da un ratto addestrato, sottoposto al test di evitamento attivo, e da un ratto di controllo, lasciato nella sua gabbia. Al termine dell'addestramento entrambi gli animali sono stati sacrificati e da ciascuno si sono preparate le frazioni sinaptosomali da tre diverse regioni cerebrali (corteccia, ippocampo e cervelletto) seguendo la procedura già descritta nei precedenti paragrafi.

Il test di apprendimento è stato eseguito utilizzando una gabbia di condizionamento (shuttle-box, fig 1), divisa in due compartimenti da un setto centrale che presenta, all'altezza del pavimento, un'apertura per consentire all'animale di spostarsi da una parte all'altra. Un pavimento basculante a griglia metallica consente la somministrazione di una debole corrente elettrica (stimolo incondizionato nocicettivo).

Sono state effettuate 3 sedute di apprendimento di 30' intervallate da periodi di riposo della stessa durata. Ogni seduta di addestramento comprende sessanta cicli di 30 s, divisi in 6 s di luce (stimolo condizionato) e 24 s di buio. Negli ultimi 3 s di luce viene somministrata una debole corrente elettrica alle zampe (in genere 0.8 mA) che il ratto può interrompere spostandosi nell'altro compartimento della gabbia.

Le possibili risposte comportamentali possono essere:

- *Congelamento*: l'animale rimane nel proprio scomparto per tutta la durata del ciclo (risposta innata);
- *Fuga*: l'animale si sposta nell'altro scomparto solo dopo avere ricevuto lo stimolo nocicettivo;
- *Evitamento*: l'animale impara ad associare lo stimolo nocicettivo a quello condizionato ed evita la corrente elettrica passando nell'altro compartimento prima della sua somministrazione, cioè durante i primi 3 s di luce. Solo in

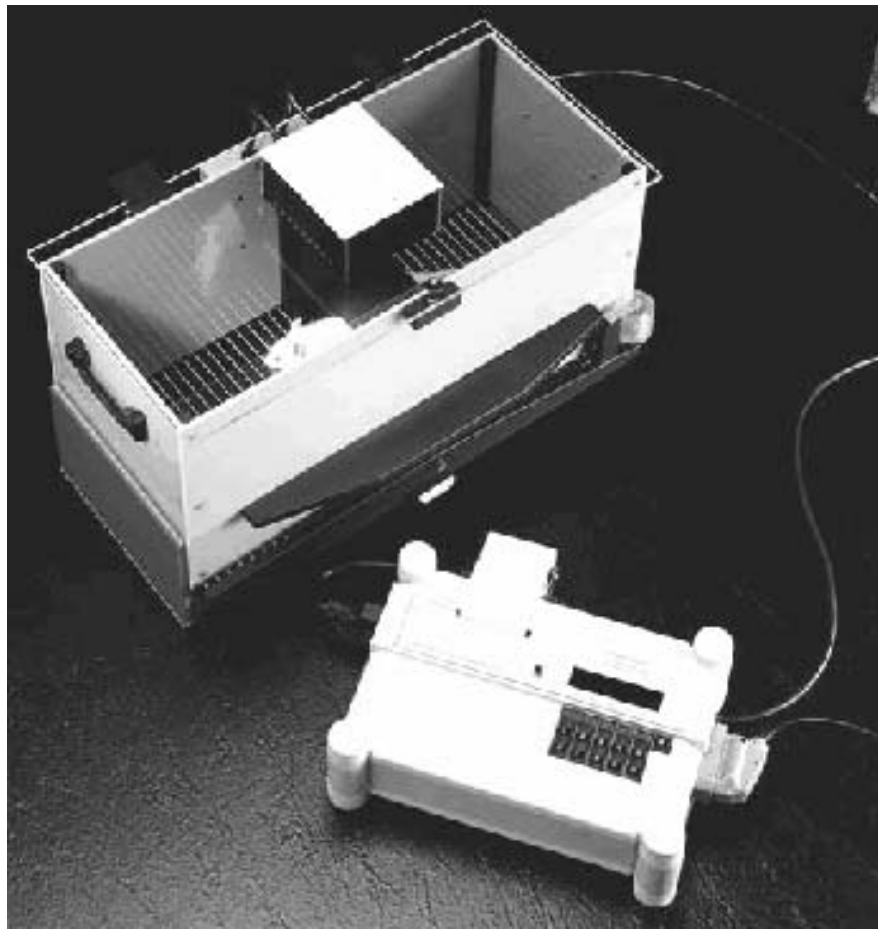


Fig 1: Shuttle box utilizzata per il test di evitamento attivo a due vie.

questo caso il ratto attua una risposta che lascia presupporre un apprendimento di tipo associativo.

2.2 RISULTATI

2.2.1 RNA messaggeri nei sinaptosomi e nei microsomi

Sono stati sottoposti ad analisi RT-PCR gli mRNA sinaptosomali codificanti per la proteina presinaptica GAT-1, per la proteina gliale GFAP e per l'ipoxantina fosforibosil transferasi HPRT. Gli stessi mRNA sono stati analizzati, per controllo, anche nella frazione microsomale ottenuta nelle due differenti condizioni di omogenizzazione (*micA* e *micB*).

Un'analisi complessiva dei dati mostra significative differenze negli mRNA delle frazioni sinaptosomale e microsomale (fig 2, 3). In particolare l'mRNA per la proteina presinaptica GAT-1 risulta sempre più abbondante nella frazione sinaptosomale e ciò costituisce forte indizio del suo coinvolgimento nella sintesi locale di questa proteina. Allo stesso modo il contenuto dell'mRNA per la proteina gliale GFAP è sempre maggiore nei sinaptosomi rispetto ai *micA*, sebbene le differenze siano meno significative rispetto a quelle osservate per il GAT-1, e notevolmente più alto rispetto alla frazione *micB*. Infine, il contenuto sinaptosomale dell'mRNA per HPRT è risultato sempre più basso rispetto alla frazione *micA* e soprattutto rispetto alla frazione *micB*, che ne risulta particolarmente arricchita.

L'incubazione delle frazioni sinaptosomale e microsomali in presenza di RNAsi produce notevoli variazioni nel contenuto degli mRNA analizzati rispetto ai propri controlli solo incubati a 37°C, ma in assenza dell'enzima (fig 2, 3). Mentre però nella frazione sinaptosomale si evidenzia, per ciascuno dei messaggeri analizzati, una parziale insensibilità al trattamento enzimatico, effetti più marcati si registrano nella frazione microsomale e soprattutto in quella preparata nel tampone polisomale (*micB*), che contiene trascritti non protetti da membrana. In particolare, per ciò che concerne l'mRNA per GAT-1, mentre nei sinaptosomi si registra una diminuzione del 37% in seguito al trattamento con RNAsi, effetti più significativi si evidenziano nella frazione

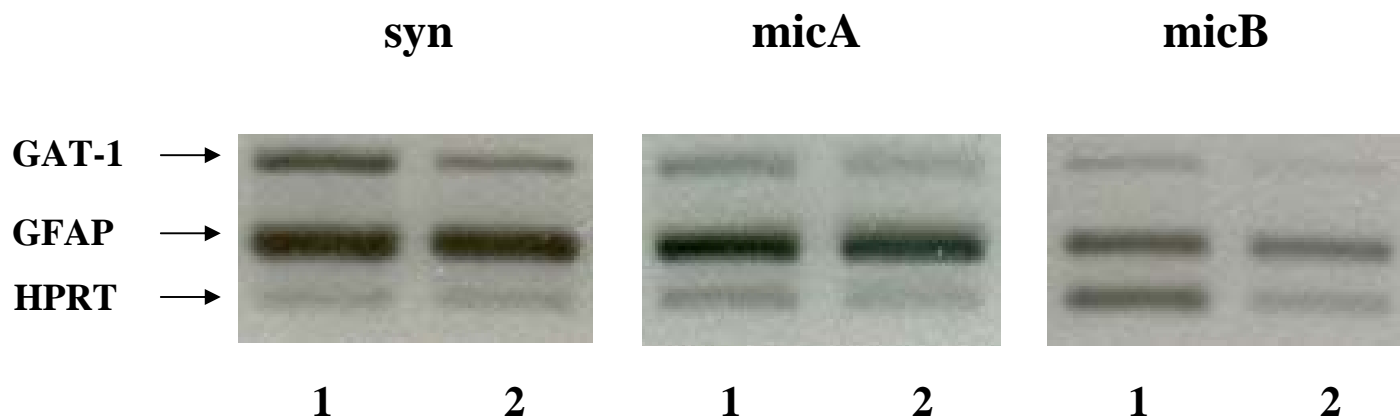


Fig 2: Profili elettroforetici dei prodotti di RT-PCR ottenuti utilizzando primer specifici per gli mRNA GAT-1, GFAP, HPRT nei sinaptosomi (syn) e nei microsomi (micA e micB) nei controlli incubati a 37°C per 15 min **1**, e dopo trattamento con RNAsi **2**.

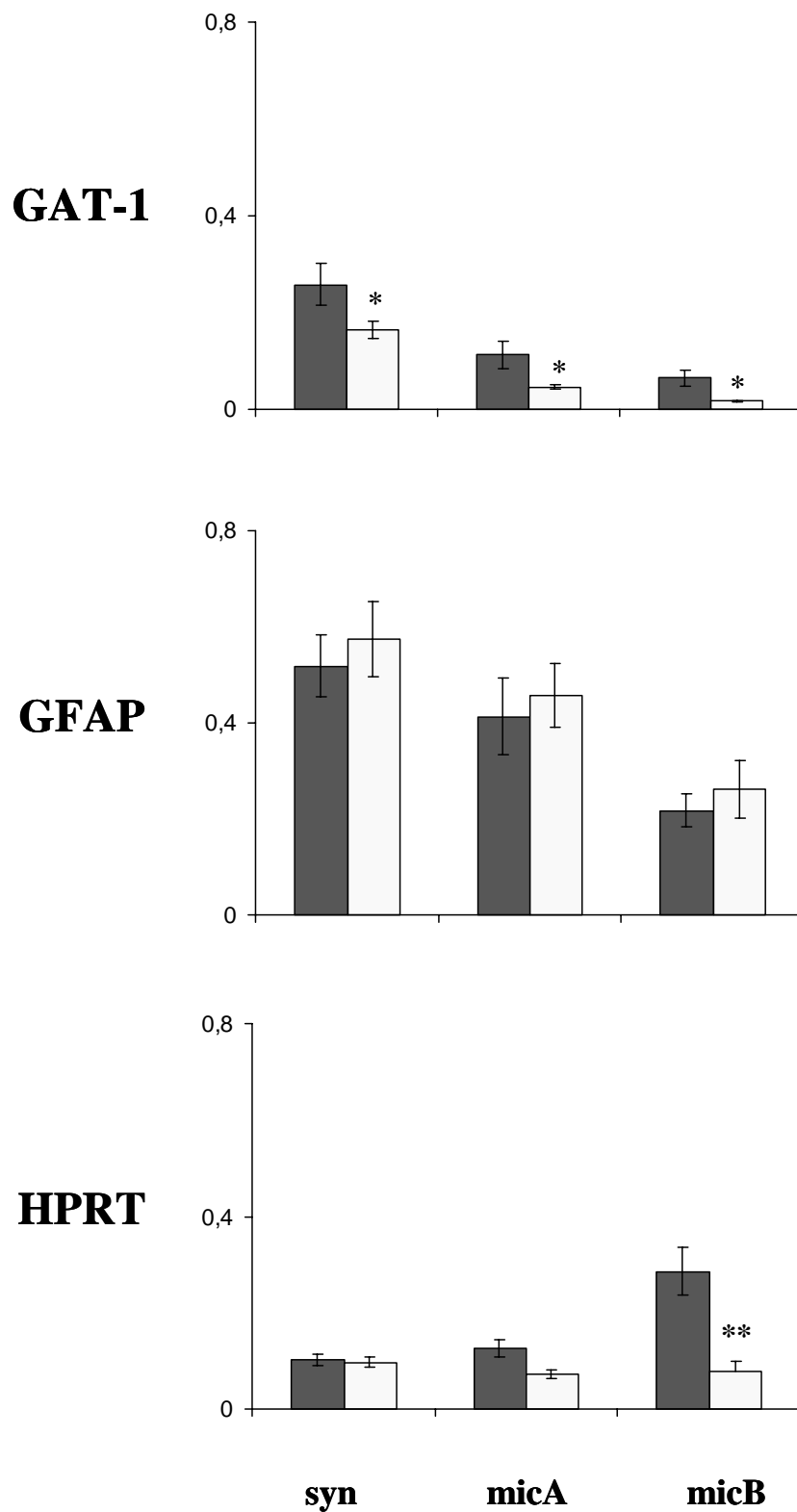


Fig 3: Intensità delle bande GAT-1, GFAP, HPRT nei sinaptosomi (syn) e nei microsomi (micA, micB) nei controlli incubati a 37°C per 15 min e dopo trattamento con RNAsi . Valori medi \pm errore standard.

micA (60%), e in quella *micB* (75%). Invece, per quanto riguarda l'mRNA per la proteina gliale GFAP, non si osservano variazioni nel suo contenuto in seguito al trattamento con l'enzima, né nella frazione sinaptosomale né in quella microsomale. Al contrario, per il messaggero che codifica per HPRT, una diminuzione significativa della quantità di trascritto in seguito al trattamento con RNAsi si evidenzia solo nella frazione *micB* (75%). Infine, sia nei sinaptosomi che nei microsomi (*micA* e *micB*), l'incubazione a 37° C per 15 min in assenza di RNAsi non sortisce alcun effetto; difatti, non si osservano variazioni nella distribuzione degli mRNA rispetto ai rispettivi controlli non sottoposti ad incubazione (dati non mostrati).

I risultati ottenuti hanno evidenziato la localizzazione di alcuni mRNA sinaptosomali, in particolare dell'mRNA che codifica per la proteina presinaptica GAT-1: difatti, dalle analisi effettuate il contenuto di tale trascritto risulta sempre maggiore nella frazione sinaptosomale che in quella microsomale. Ciò esclude che la presenza di questo mRNA nei sinaptosomi possa essere attribuita a contaminazione microsomale. Inoltre, dal momento che gli mRNA dei microsomi preparati in sol. A (*micA*) sono meno sensibili all'azione dell'RNAsi rispetto a quelli presenti nei microsomi ottenuti in tampone polisomale (*mic B*), sembra ragionevole concludere che nelle condizioni di omogeneizzazione che preservano l'integrità delle vescicole sinaptosomali (sol.A), la contaminazione da parte dei polisomi microsomiali è da ritenersi trascurabile. Infatti, gli unici mRNA presenti nei *micA* sono protetti da membrana e quindi di natura sinaptosomale.

2.2.2 Modulazione dell'espressione genica nei sinaptosomi del cervello di ratto

Stabilita la natura di questi mRNA, gli esperimenti successivi hanno avuto lo scopo di esaminare il loro eventuale coinvolgimento nei fenomeni di plasticità cerebrale indotti dall'apprendimento di un compito complesso quale l'evitamento attivo a due vie. A tal fine si sono analizzati gli mRNA sinaptosomali di corteccia, ippocampo e cervelletto di ratti di controllo e di ratti sottoposti al test di apprendimento. I profili elettroforetici dei prodotti di RT-PCR ottenuti dai sinaptosomi di ciascuna macroregione cerebrale sono stati sottoposti ad analisi densitometrica. Nella fig 4, sono rappresentati i valori medi (\pm errore standard) delle intensità di GAT-1, GFAP e HPRT nei ratti di controllo, negli addestrati, ed in ciascuna classe comportamentale (evitamenti, fughe, congelamenti).

Per ciò che concerne l'mRNA per GAT-1, il confronto tra ratti di controllo ed addestrati non mostra differenze significative in nessuna delle regioni analizzate (one way ANOVA, Tukey post-test). Nell'ambito dei vari sottogruppi comportamentali, le uniche differenze statisticamente significative si riscontrano nel cervelletto, dove l'intensità di GAT-1 è sempre significativamente maggiore negli animali con prevalenza di fughe rispetto a quelli con prevalenza di congelamenti. Inoltre, il contenuto dell'mRNA per GAT-1 risulta sempre più basso nella corteccia e nell'ippocampo degli animali con prevalenza di evitamenti sia rispetto ai controlli, sia rispetto agli animali con prevalenza di fughe e di congelamenti. Tali differenze non risultano statisticamente significative. Per quanto concerne il messaggero per GFAP, un aumento della sua intensità negli animali addestrati rispetto ai controlli si osserva solo nei sinaptosomi dell'ippocampo. Inoltre, non si evidenziano differenze nel confronto tra i vari sottogruppi comportamentali in ciascuna regione cerebrale analizzata. Infine, in tutte le regioni analizzate il

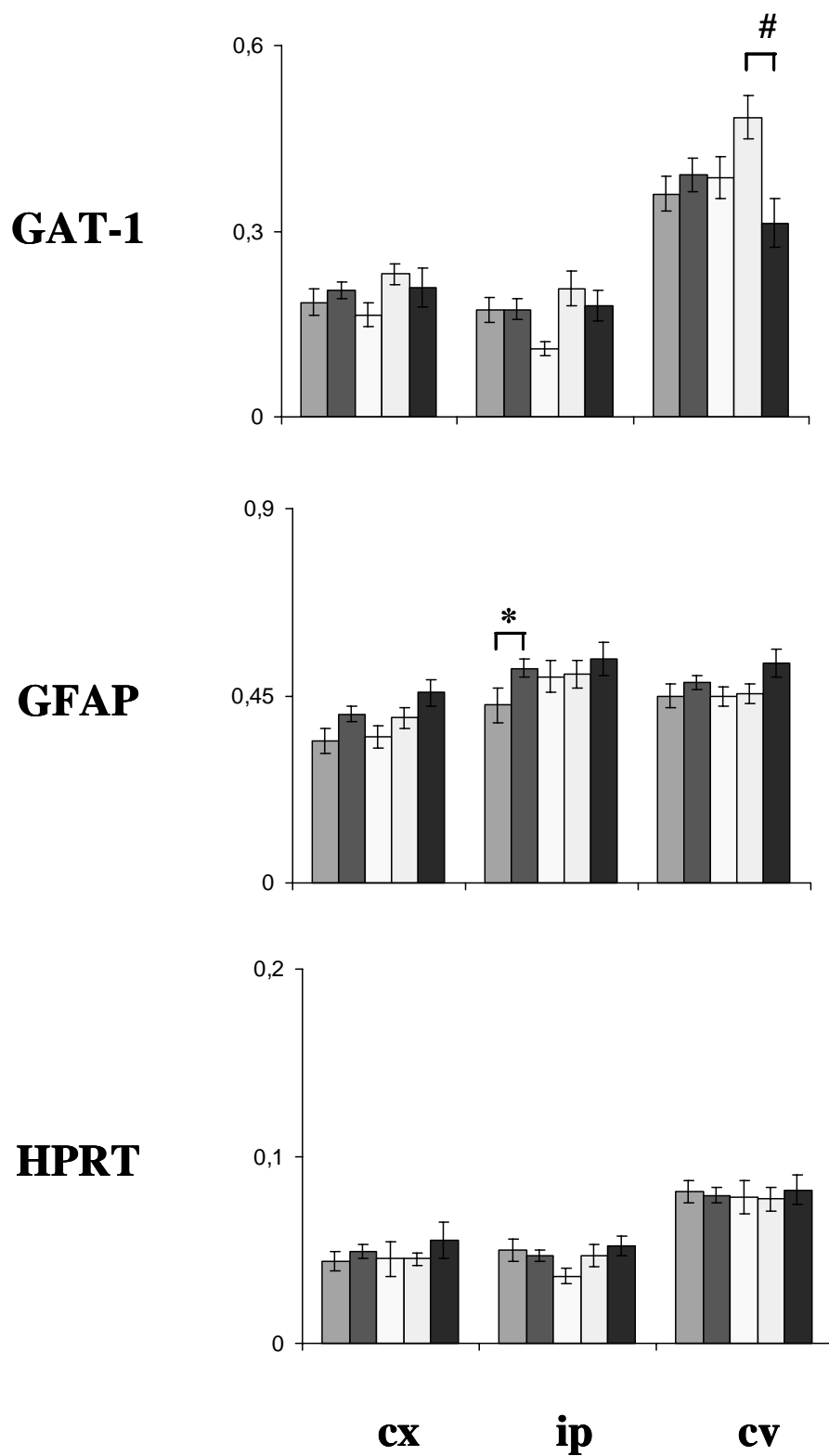


Fig 4: Densitometria delle bande GAT-1, GFAP, HPRT nei sinaptosomi di corteccia (cx), ippocampo (ip), cervelletto (cv) di ratti di controllo ■, addestrati ■, con prevalenza di esitamenti ■, fughe ■, congelamenti ■. Valori medi \pm errore standard.
 * $p < 0.05$; # $p < 0.01$

contenuto dell'mRNA sinaptosomale per HPRT non presenta variazioni significative negli animali addestrati rispetto ai controlli né nell'ambito dei vari gruppi comportamentali.

Questi dati suggeriscono, nel loro insieme, che i livelli di mRNA sinaptosomale di ciascuna regione cerebrale sono regolati dall'esperienza in maniera selettiva.

Alla luce di questi risultati, per meglio definire gli effetti dell'addestramento sul sistema di espressione genica sinaptosomale, si è proceduto all'analisi correlativa tra l'intensità degli mRNA analizzati e il numero delle diverse risposte comportamentali osservate (evitamento, fuga o congelamento) nelle varie macroregioni analizzate, applicando il metodo non parametrico di Spearman. I risultati ottenuti (fig 5), evidenziano nel cervelletto, per ciò che concerne l'mRNA per GAT-1, una correlazione positiva con gli evitamenti e con le fughe e negativa con i congelamenti. Questo dato è particolarmente significativo in quanto evidenzia che è l'apprendimento del compito ad indurre una variazione significativa nel contenuto dell'mRNA per la proteina presinaptica GAT-1.

Si tratta della prima evidente osservazione che coinvolge il sistema presinaptico di traduzione nella plasticità cerebrale.

D'altra parte, l'analisi correlativa dell'mRNA per la proteina gliale GFAP (fig 6), ha evidenziato l'esistenza di coefficienti di correlazione negativi con evitamenti e fughe e positivi con i congelamenti in tutte le regioni cerebrali, ma la significatività si raggiunge solo nei riguardi degli evitamenti e congelamenti nella corteccia e dei congelamenti nel cervelletto. Dal momento che GFAP è una proteina specifica della glia, queste ultime osservazioni suggeriscono un possibile coinvolgimento delle cellule gliali nei processi di rimodellamento della rete nervosa legati all'apprendimento.

Infine, l'analisi correlativa dell'mRNA per l'HPRT indica coefficienti di correlazione generalmente negativi con gli evitamenti e con le fughe e positivi con i congelamenti in tutte le regioni cerebrali, sebbene la significatività si raggiunge solo nell'ippocampo con i congelamenti (fig 7).

Nel loro insieme i dati ottenuti dimostrano che negli animali addestrati ad un compito complesso, il contenuto degli mRNA sinaptosomali è modulato dall'esperienza e suggeriscono il coinvolgimento della sintesi proteica sinaptica nei fenomeni di plasticità cerebrale.

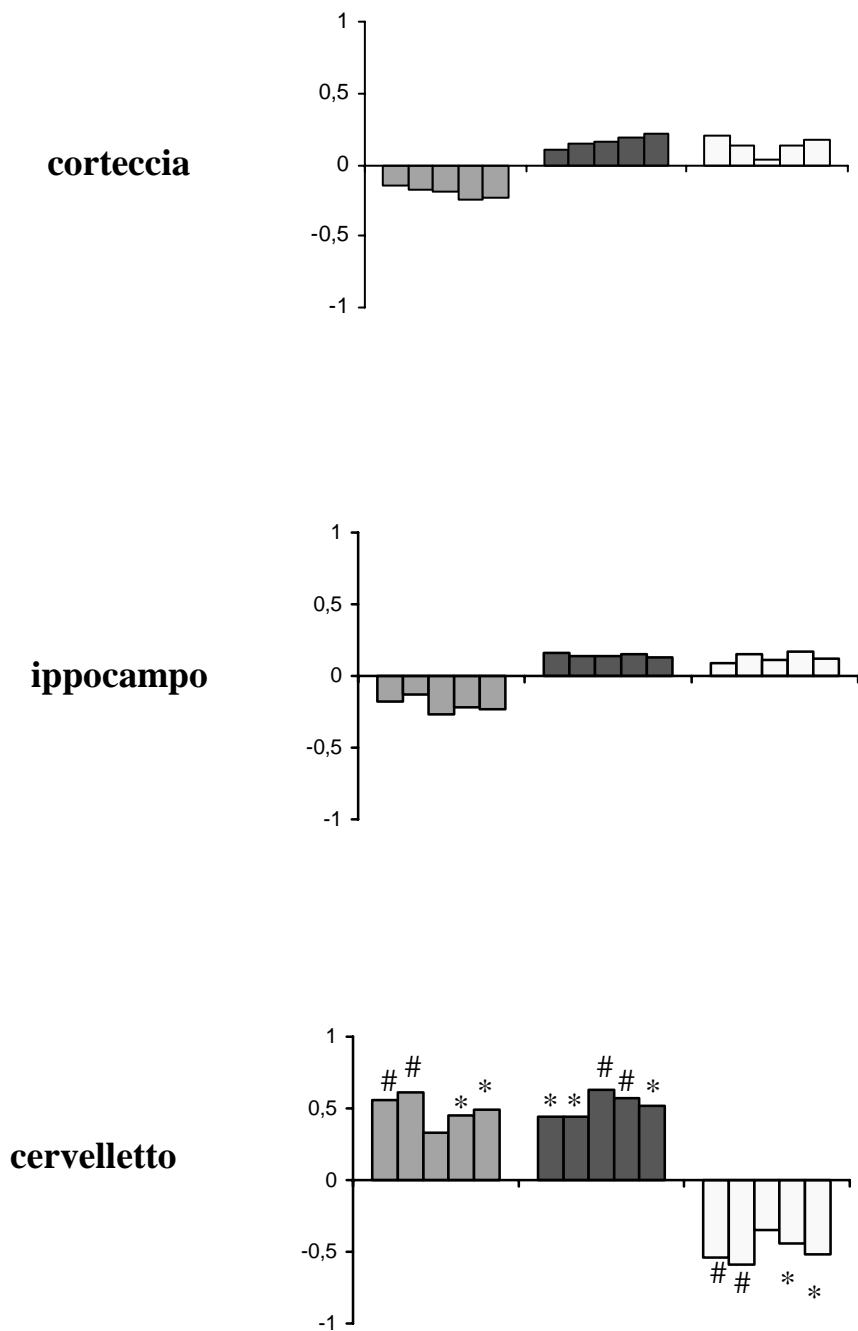


Fig 5: Coefficienti di correlazione calcolati con il metodo non parametrico di Spearman tra l'intensità della banda GAT-1 nei sinaptosomi di corteccia, ippocampo, e cervelletto e le diverse risposte comportamentali nelle sedute 1, 2, 3, 2+3, 1+2+3. * p<0.05; # p<0.01

■ evitamenti ■ fughe ■ congelamenti

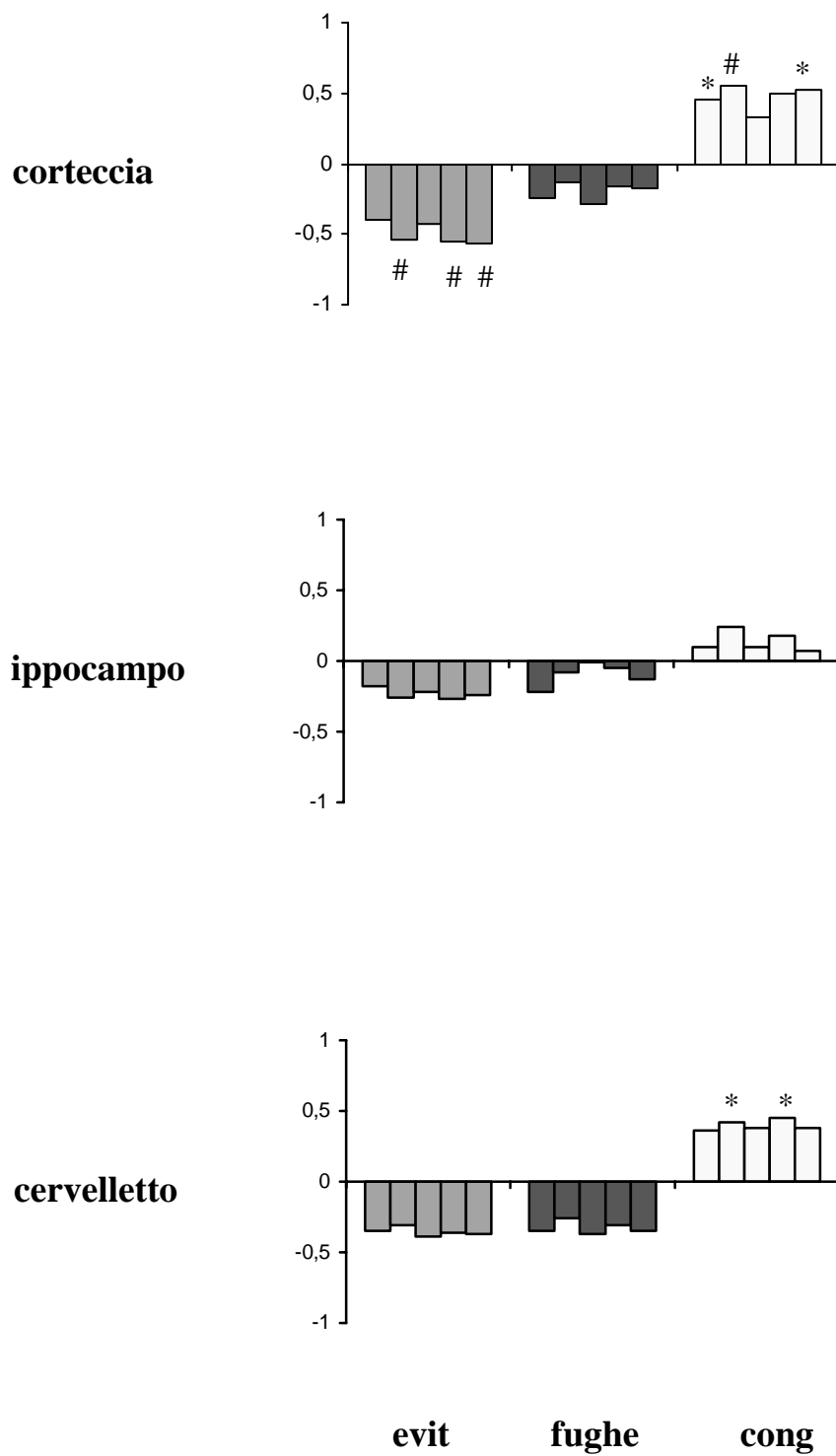


Fig 6: Coefficienti di correlazione calcolati con il metodo non parametrico di Spearman tra l'intensità della banda GFAP nei sinaptosomi di corteccia, ippocampo, e cervelletto e le diverse risposte comportamentali nelle sedute 1, 2, 3, 2+3, 1+2+3. * p<0.05; # p<0.01

■ evitamenti
 ■ fughe
 ■ congelamenti

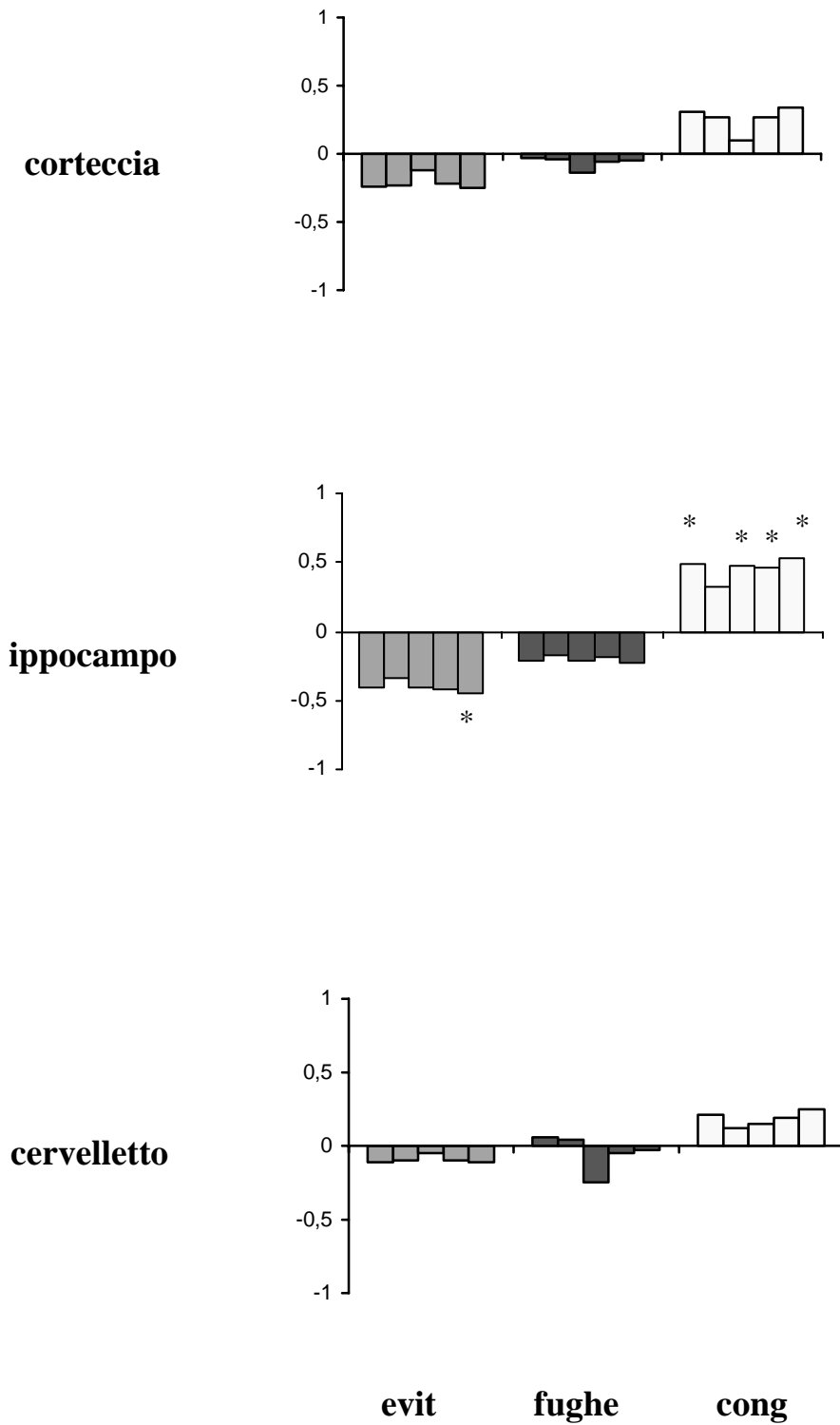


Fig 7: Coefficienti di correlazione calcolati con il metodo non parametrico di Spearman tra l'intensità della banda HPRT nei sinaptosomi di corteccia, ippocampo, e cervelletto e le diverse risposte comportamentali nelle sedute 1, 2, 3, 2+3, 1+2+3. * $p < 0.05$; # $p < 0.01$

■ evitamenti ■ fughe ■ congelamenti

3 ESPERIMENTI SUL CALAMARO

3.1 MATERIALI E METODI

Perfusione dell'assone gigante del calamaro

Gli esperimenti sono stati condotti su calamari adulti (*Loligo pealii*) mantenuti in vasche con acqua di mare corrente, catturati nella Baia di Woods Hole (Massachusetts, USA). Dopo aver decapitato l'animale, è stato prelevato il mantello e trasferito in una capsula Petri contenente acqua di mare filtrata (FSW). Si è effettuata la dissezione del ganglio stellato ancora legato al nervo utilizzando un microscopio binoculare, secondo il metodo di routine (Giuditta et al., 1991). Isolato l'assone gigante, il suo assoplasma è stato gentilmente estruso mediante un piccolo rullo di plastica. Il preparato è stato poi posizionato in una camera della lunghezza di circa 4 cm, con ciascuna estremità del nervo che protrude all'esterno di circa un centimetro (fig 8). Un taglio effettuato all'estremità prossimale dell'assone ha consentito l'introduzione, mediante l'impiego di un micromanipolatore, di una cannula di vetro del diametro di circa 200 μ m mediante la quale l'assone viene perfuso con una soluzione specifica ad una velocità di 10 μ l/min, grazie ad una pompa peristaltica. Dopo aver sigillato la camera di incubazione, si aggiungono poche centinaia di microlitri di acqua di mare artificiale (ASW: 460mM NaCl, 10mM KCl, 11mM CaCl₂, 55mM MgCl₂, 0.6 mM KHCO₃, 10mM Tris-Cl pH 7.8) fino a coprire il nervo stellato. Questa procedura permette di ottenere assoni che mantengono la loro integrità per almeno due ore.

Una volta avviata la perfusione e accertata la integrità della camera di incubazione, viene aggiunta al mezzo di incubazione [5,6-³H]uridina alla concentrazione di 100 μ Ci/ml. . Nei nostri esperimenti sono state usate varie soluzioni di perfusione diverse per la loro composizione : (1) 300mM

saccarosio, 200mM glicina, 150mM potassio glutammato, 5mM magnesio acetato, 8mM potassio fosfato pH 7.4;(2) 400 mM glicina, 300mM potassio glutammato, 15 mM potassio fosfato pH 7.4,; (3) 300 mM saccarosio, 200mM glicina, 150 mM potassio glutammato, 10mM magnesio acetato; 1mM glucosio, 50mM K-Hepes pH 7.5; (4) 250mM saccarosio, 10mM magnesio acetato, 325 mM K-Hepes pH 7.5. Queste soluzioni di perfusione sono state utilizzate perché aventi una composizione simile a quella dell'assoplasma. Ciò ci ha permesso di valutare il trasferimento di RNA di nuova sintesi nel perfusato in condizioni di base. La soluzione di perfusione così costituita: (5) 400mM saccarosio, 400mM glicina, 10mM potassio glutammato, 10mM magnesio acetato, 1mM glucosio, 5mM K-Hepes pH 7.5, è stata impiegata per diminuire la concentrazione interna degli ioni potassio al fine di indurre la depolarizzazione selettiva della membrana assonale.

Si è inoltre valutato l'effetto sul processo di trasferimento di [³H]RNA nel perfusato indotto dall'aggiunta al mezzo di incubazione dell'assone di actinomicina D (25µg/ml), di N-acetilaspartilglutammato (NAAG) (10µM), di N-metil-D-aspartato (NMDA) (10µM) e di carbacolo (2.5µM).

Campioni di perfusato sono stati raccolti ogni 5-10 min in tubi di vetro rapidamente trasferiti a - 20°C, e poi sottoposti ad analisi per la determinazione della radioattività incorporata. A tal fine, a ciascun campione di perfusato viene aggiunto 1 ml di acido tricloroacetico (TCA) 10% contenente 1mg/ml di uridina. Dopo circa 30min a 4°C, ciascun campione viene filtrato su filtri GF/C Whatman e lavato con TCA 8% contenente uridina 1 mg/ml. I filtri sono stati asciugati esponendoli per circa 30min ad una lampada a raggi infrarossi, e successivamente posti in vial con 5 ml di liquido di scintillazione (INSTA-GEL) per la misura della radioattività

effettuata in uno spettrofotometro a scintillazione liquida con una efficienza del 90%.

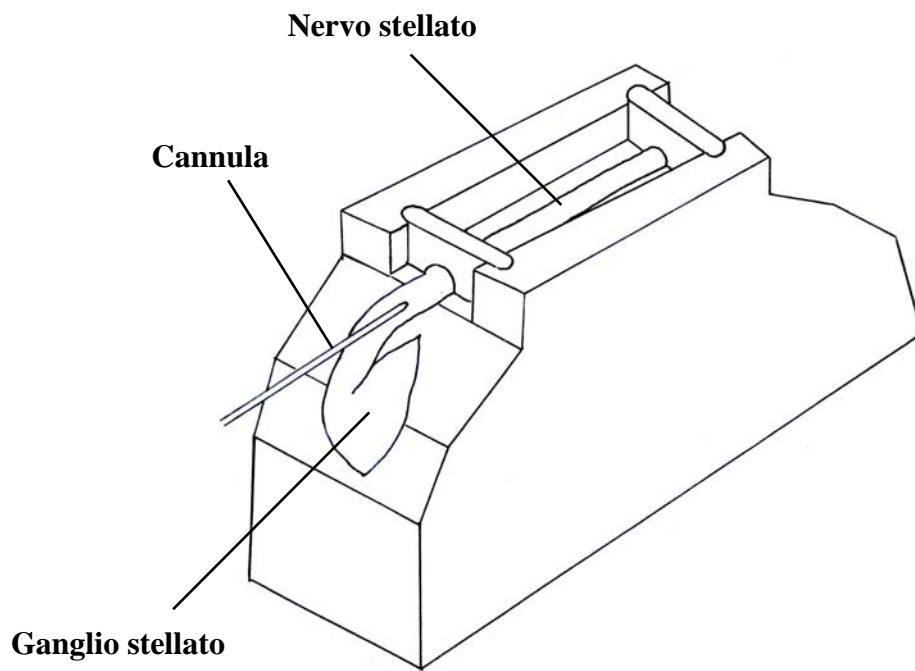


Fig 8: Camera di incubazione utilizzata per gli esperimenti di perfusione dell'assone gigante del calamaro.

3.2 RISULTATI

Origine locale degli RNA assonali

L'aggiunta di [5,6-³H]uridina al mezzo di incubazione promuove la comparsa di RNA radioattivo nel perfusato e il suo accumulo con velocità lineare per alcune ore. La completa idrolisi di questi prodotti radioattivi che si ottiene in seguito del trattamento con NaOH 1N o RNAsi 20µg/ml conferma che si tratta di RNA.

In seguito all'aggiunta di actinomicina D al mezzo di incubazione la reazione viene fortemente inibita (fig 9). Questo dato risulta particolarmente significativo, poiché suggerisce una origine gliale dell' [³H]RNA nel perfusato. Infatti, l'origine gliale degli RNA assonali è implicita nella loro stessa natura di RNA citoplasmatici che richiedono DNA nucleare per la loro trascrizione, processo che può realizzarsi solo nei nuclei delle cellule gliali periaassonali.

L'ipotesi della origine gliale degli RNA assonali implica l'esistenza di un sistema di segnalazione tra assone e cellule gliali che medierebbe il trasferimento assonale dell'RNA di nuova sintesi.

Questa ipotesi è stata confermata in esperimenti in cui si è indotta la depolarizzazione della membrana assonale e gliale per l'aggiunta di KCl al mezzo di incubazione. Come mostrato in fig 9, l'elevata concentrazione di KCl nel mezzo induce un forte incremento di [³H]RNA nel perfusato. Analogo risultato si è ottenuto inducendo la depolarizzazione selettiva della membrana assonale mediante la drastica diminuzione degli ioni K⁺ nella soluzione di perfusione. Tale risultato indica che la depolarizzazione dell'assone regola l'accumulo di RNA di nuova sintesi nel perfusato, probabilmente attraverso il rilascio di neurotrasmettitori che riconoscono recettori specifici localizzati sulle cellule gliali periaassonali. Tale indicazione

risulta supportata da dati già riportati in letteratura, che suggeriscono una eventuale interazione tra assone e glia, indicando l'N-acetilaspartil glutammato (NAAG) come probabile mediatore in tale sistema di segnalazione (Lieberman E.M., et al. 1994; Gafurov B., et al. 2001).

Sulla base di queste indicazioni, abbiamo esaminato gli effetti di agonisti di recettori gliali sul trasferimento di [³H]RNA nel perfusato. Come mostrato in fig 10, quando il NAAG è aggiunto al mezzo di incubazione dell'assone, si registra un forte incremento bifasico nella comparsa di RNA radioattivo nel perfusato. Gli stessi effetti si ottengono in seguito all'aggiunta di glutammato (dati non mostrati), di NMDA, o carbacolo.

Nel loro insieme i dati indicano che RNA gliali di nuova sintesi sono trasferiti all'assone perfuso in un processo modulato da recettori glutammatergici e colinergici gliali. Tali risultati, quindi, dimostrano l'esistenza di una stretta cooperazione tra glia e assone nella sintesi locale degli RNA assonali, e ne prefigurano il coinvolgimento in un sistema locale di espressione genica.

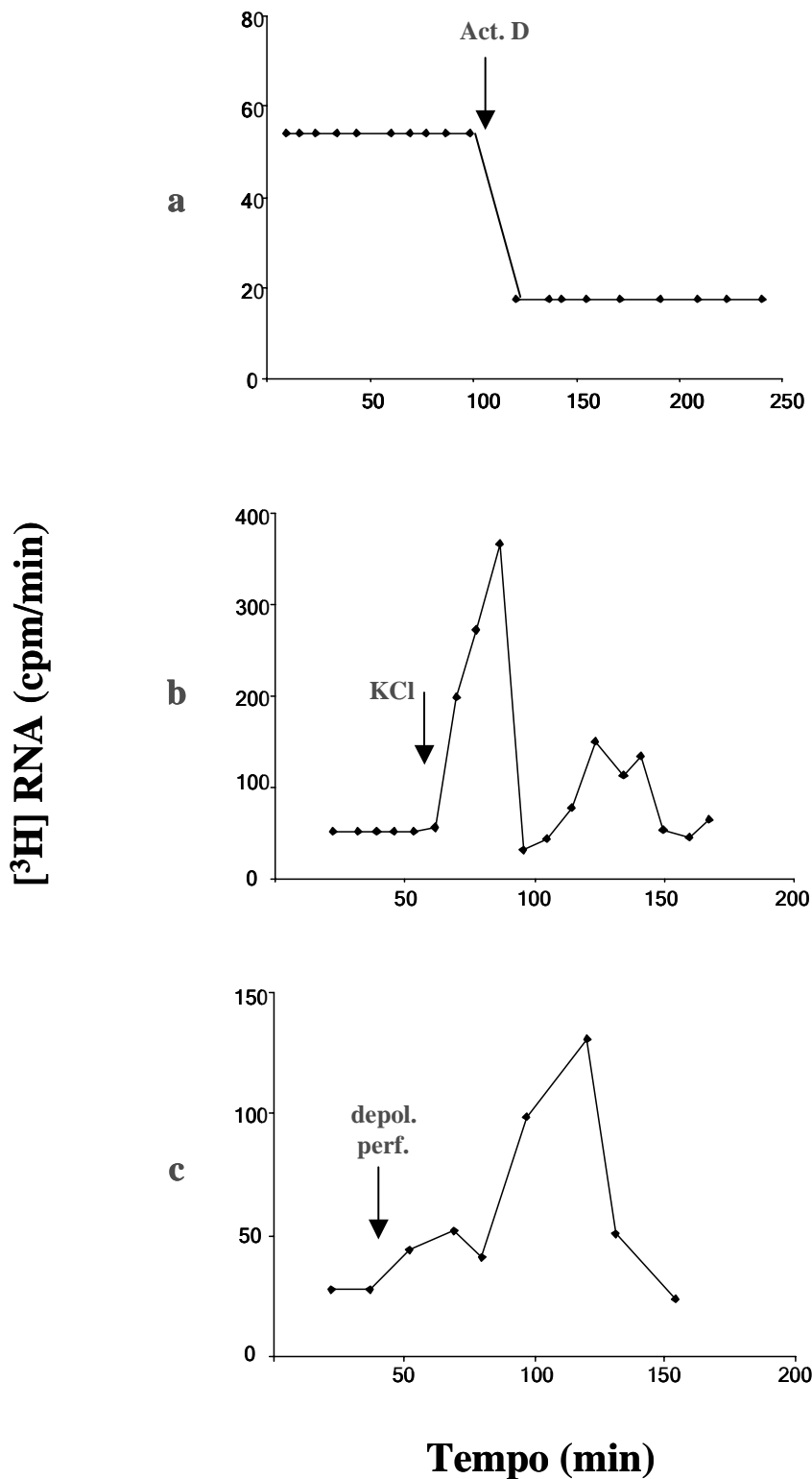


Fig 9: Modulazione del processo di trasferimento di $[^3\text{H}] \text{RNA}$ nel perfusato in seguito all'aggiunta al mezzo di incubazione di actinomicina D $25\mu\text{g/ml}$ (a), di KCl $100\mu\text{M}$ (b) e all'utilizzo di una soluzione di perfusione depolarizzante (5) (c). La linea di base è stata calcolata mediando i valori di $[^3\text{H}] \text{RNA}$ nel perfusato prima di ogni trattamento e prima e dopo l'aggiunta di actinomicina D al mezzo di incubazione dell'assone.

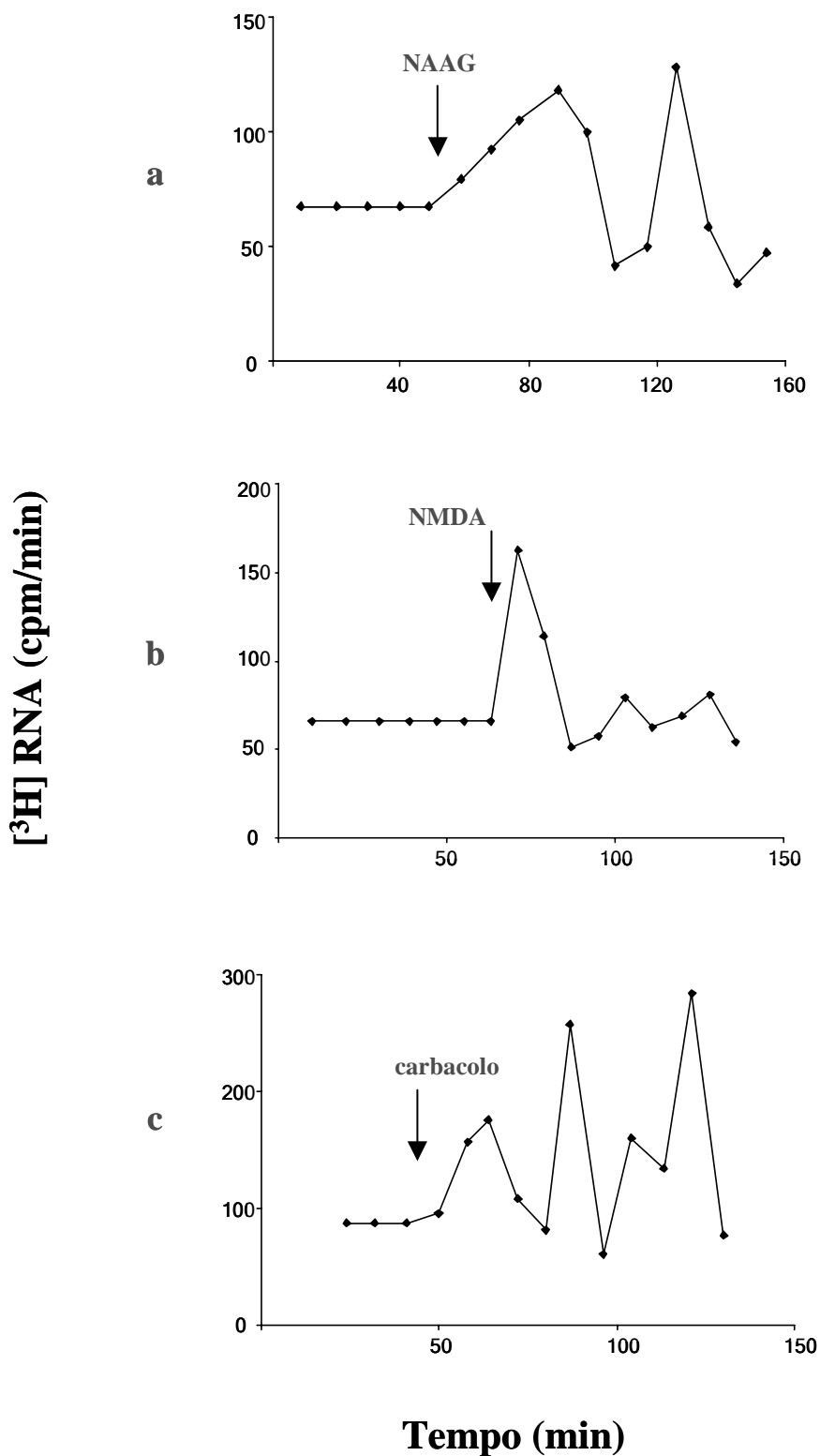


Fig 10: Modulazione del processo di trasferimento di [³H]RNA nel perfusato in seguito all'aggiunta al mezzo di incubazione di NAAG 10 μ M (a), di NMDA 10 μ M (b) e carbacolo 2.5 μ M (c). La linea di base è stata calcolata mediando i valori di [³H]RNA nel perfusato prima dell'aggiunta di ogni composto al mezzo di incubazione dell'assone.

4 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo lavoro sperimentale si inseriscono nell'ampio progetto scientifico finalizzato allo studio del sistema sinaptico di sintesi proteica nel mammifero e del suo ruolo negli eventi plastici del sistema nervoso.

L'esistenza di un sistema extramitocondriale di sintesi proteica nelle frazioni sinaptosomali del cervello di ratto è stata già confermata da numerosi dati sperimentali ottenute negli scorsi anni dal nostro gruppo di ricerca.

Per stabilire la localizzazione subcellulare del sistema sinaptico di traduzione, l'approccio sperimentale seguito in questo lavoro ha riguardato la caratterizzazione degli mRNA sinaptosomali del cervello di ratto. La dimostrazione di un mRNA specifico per proteine a localizzazione presinaptica o gliale può essere considerata forte indizio del suo coinvolgimento in processi di sintesi proteica localizzati in queste strutture.

I risultati ottenuti hanno permesso di escludere la presenza di contaminanti microsomiali nelle frazioni sinaptosomali analizzate e di confermare quindi l'origine sinaptica di questi mRNA. In particolare si è dimostrato che l'mRNA che codifica per la proteina presinaptica GAT-1, è più abbondante nella frazione sinaptosomale rispetto a quella microsomale. Ciò esclude che la sua presenza nei sinaptosomi possa essere attribuita a contaminazione microsomale.

Si è inoltre dimostrato che il contenuto degli mRNA sinaptici è modulato dall'esperienza in maniera selettiva, presumibilmente in relazione al loro coinvolgimento nei processi di sintesi proteica. Infatti, l'apprendimento di un compito complesso di evitamento attivo a due vie induce, in particolare, una variazione significativa nel contenuto dell'mRNA per GAT-1 nel cervelletto.

Si tratta della prima osservazione sulla modulazione del processo di trascrizione di un mRNA presinaptico nella plasticità cerebrale.

Inoltre, i risultati dell'analisi correlativa dell'mRNA per la proteina gliale GFAP suggeriscono il coinvolgimento delle cellule gliali nei processi di rimodellamento della rete nervosa legati all'apprendimento.

Quest'ultimo dato appare particolarmente interessante soprattutto alla luce dei risultati ottenuti utilizzando come sistema modello l'assone gigante del calamaro, che hanno evidenziato l'origine gliale degli RNA presenti nel compartimento assonale.

Infatti, in esperimenti di perfusione dell'assone gigante si è dimostrata l'esistenza di un attivo trasferimento di RNA di nuova sintesi dalla glia periassonale all'assone e la modulazione di tale processo da parte dei recettori glutammatergici e colinergici localizzati sulla membrana gliale. Questi dati risultano particolarmente rilevanti in quanto suggeriscono che il territorio assonale è servito da un sistema locale di espressione genica sostanzialmente indipendente dal corpo cellulare, basato sulla stretta cooperazione tra la glia periassonale, dove gli RNA verrebbero trascritti, e il territorio assonale, sede locale di traduzione.

5 BIBLIOGRAFIA

Aakalu G., Smith W.B., Nguyen N., Jiang C., Schuman E.M. (2001). *Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons*. Neuron 30: 489-502

Alemà S., Giuditta A., (1976). *Site of biosynthesis of brain specific protein in the giants 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.

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.

Benbassat D., Spira M.E., (1994). *The survival of transected axonal segments of cultured Aplysia neurons is prolonged by contact with intact nerve cells*. Eur. J. Neurosci. 6: 1605-1614.

Bittner G.D., (1991). *Long term survival of anucleate axons and its implication for nerve regeneration*. Trend Neurosci., 14: 188-193.

Brady S.T., (1991). *Molecular motors in the nervous system*. Neuron, 7: 521-533.

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.

Crispino M., Castigli E., Perrone Capano C., Martin R., Menichini E., Kaplan B.B., Giuditta A., (1993a). *Protein synthesis in a synaptosomal fraction from squid brain*. Mol. Cell. Neurosci., 4: 366-374.

Crispino M., Perrone Capano C., Kaplan B.B., Giuditta A., (1993b). *Neurofilament proteins are synthesized in nerve endings from squid brain*. J. Neurochem., 61: 1144-1146.

Crispino M., Kaplan B.B., Martin R., Avarez J., Chun J.T., Benech J.C., Giuditta A., (1997). *Active polysomes are present in the large presynaptic endings of the synaptosomal fraction from squid brain*. J. Neurosci., 17: 7694-7702.

Crispino M., Perrone Capano C., Aiello A., Ianetti E., Cupello A., Giuditta A., (2001). *Messenger RNAs in synaptosomal fractions from rat brain*. Mol. Brain Res., 97: 171-176.

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.

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.

Gioio A.E., Chun J.T., Crispino M., Perrone Capano C., Giuditta A., and Kaplan B.B., (1994). *Kinesin mRNA is present in the squid giant axon*. *J. Neurochem.* 63: 13-18.

Gioio A.E., Eyman M., Zhang H., Scotto Lavina Z., Giuditta A., Kaplan B.B. (2001). *Local synthesis of nuclear- encoded mitochondrial proteins in the presynaptic nerve terminal*. *J. Neurosci. Res.* 64: 447-453.

Gioio A.E., Scotto Lavina Z., Jurkovicova D., Eyman M., Giuditta A., Kaplan B.B (2004). *Nerve terminals of squid photoreceptor neurons contain a heterogeneous population of mRNA and traslate a transfected reporter mRNA*. *Eur. J. Neurosci.* 20:865-872.

Giuditta A., Dettbarn W., and Brzin M., (1968). *Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 1284-1287.

Giuditta A., Cupello A., Lazzarini G., (1980). *Ribosomal RNA in the axoplasm of the giant axon*. *J. Neurochem.*, 34: 1757-1760.

Giuditta A., Hunt T., Santella L., (1986). *Messenger Rna is present in squid axoplasm*. *J. Neurochem. Int.* 8: 435- 442.

Giuditta A., Menichini E., Perrone Capano C., Langella M., Martin M., Castigli E., Kaplan B.B., (1991). *Active polysomes in the axoplasm of the squid giant axon*. J. Neurosc. Res., 26: 18-28.

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*. TINS 25: 400-404.

Glass J.D., Brushart T.M., George E.B., Griffin J.W., (1993). *Prolonged survival of transected nerve fibres in C57BL/Ola mice is an intrinsic characteristic of the axon*. J. Neurocytol. 22: 311-321.

Grafstein B., and Forman D.S., (1980). *Intracellular transport in neurons*. Physiol. Rev., 60: 1167-1283.

Hernandez A.G., (1974). *Protein synthesis by synaptosomes from rat brain. Contribution by intraterminal mitochondria*. Biochem. J., 142: 7-17.

Jirikowski G.F., Sanna P.P., Bloom F.E., (1990). *mRNA coding for oxytocin is present in axons of the hypothalamo-neurohypophysial 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., (1979). *Ribosomal RNA in the Mauthner axon: implication for a protein synthesis machinery in the myelinated axons*. Brain Res., 175: 95-107.

Koenig E., (1984). *Local synthesis of axonal proteins*. In: Lajtha, A.(Ed.), Handbook of Neurochemistry, Vol. 7, Plenum, New York, pp 315-340.

Koenig E., Giuditta A., (1999). *Protein synthesizing machinery in the axon compartment*. Neurosci. 89:5-151.

Koenig E., Martin R., (1996). *Cortical plaque-like structures identify ribosome containing domains in the Mauthner axon*. J. Neurosci., 16: 1400-1411.

Koenig E., Martin R., Titmus M., Sotelo-Silveria JR., (2000). *Criptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons*. J. Neurosci., 15:20(22): 8390-8400

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.

Litman L.M., Barg J., Rindzoonski L., Ginzburg I., (1993). *Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture:implication for neuronal polarity*. Neuron 10: 627-638.

Lunn E.R., Perry V.H., Brown M.C., Rosen H., Gordon S., (1989). *Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve fibres*. Eur. J. Neurosci. 1: 27-33.

Mahajan-Miklos S., Cooley L., (1994). *Intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis*. *Devel. Biol.* 165: 336-351.

Martin R., Fritz W., Giuditta A., (1989). *Visualization of polyribosomes in the post synaptic area of the squid giant synapse by electron spectroscopic imaging*. *J. Neurocytol.* 418: 11-18.

Martin K.C., Casadio A., Zhu H., Yapeng E., Rose J.C., Chen M., Bailey C. H., Kandel E.R., (1997). *Synapse-specific long-term facilitation of Aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage*. *Cell.*91:927-938.

Mohr E., Fehr S., Richter D., (1991). *Axonal transport of neuropeptide encoding mRNAs within the hypothalamo-hypophyseal tract of rats*. *EMBO. J.*, 10: 2419-2424.

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.

Morgan I.G., and Austin L., (1968). *Synaptosomal protein synthesis 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., 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.

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.

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

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

Smith W.B., Aakalu G., Schuman E.M. (2001). *Local protein synthesis in neurons.* Curr.Biol. 11: R901-903.

Steward O., Schuman E.M. (2001). *Protein synthesis at synaptic sites on dendrites.* Annu. Rev. Neurosci. 24: 299-325.

Weiss P. and Hiscoe H.B., (1948). *Experiment on the mechanism of nerve growth.* J. Exp. Zool., 107: 315-395.

Wensley C.H., Stone D.M., Baker H., Kauer J.S., Margolis F.L., (1995). *Olfactory marker protein mRNA is found in axons of olfactory receptor 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.

Whittaker V.P., (1993). *Thirty years of synaptosome research*. J. Neurocytol.,22: 735-742.