



Università degli Studi di Roma “ Tor Vergata”

Dipartimento di Neuroscienze Facoltà di Medicina e Chirurgia

**Tesi di Dottorato di Ricerca in Neuroscienze
XIX Ciclo**

**Coordinatore del corso:
Prof. G. Bernardi**

Studio dell'effetto delle radiazioni non ionizzanti sul processo di maturazione e differenziamento dei granuli cerebellari di ratto neonato: studi in vitro e in vivo

Dottorando:
Dott. Mario Ledda

Relatore:
Prof. P. Calissano

Tutor:
Dott.ssa A. Lisi

A.A. 2005/2006

INTRODUZIONE.....	pag.1
1. Campi magnetici e sistemi biologici.....	2
1.1 La vita e l'elettromagnetismo.....	2
1.2 Campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici: caratteristiche generali.....	3
1.3. Elettricità e magnetismo: sorgenti artificiali di origine antropica.....	7
1.4. L'interazione per risonanza.....	9
1.5. Gli effetti dei campi ELF sulla cellula.....	11
2. I Recettori del Glutammato.....	13
2.1 I Recettori Ionotropici.....	13
2.1.1 Classificazione e struttura.....	14
2.1.2 I recettori non NMDA: AMPA e KAINATO.....	17
2.1.2 I recettori NMDA.....	18
2.2 I Recettori Metabotropici.....	20
2.2.1 Classificazione e struttura.....	20
2.3 Espressione genica dei Recettori Ionotropici.....	21
2.3.1 Regolazione trascrizionale.....	22
2.3.2 Regolazione traduzionale.....	24
2.4 Recettori Ionotropici e differenziamento.....	25
3. I Granuli cerebellari: Un ottimo modello di studio.....	26
3.1 Il Cervelletto.....	26
3.2 I granuli cerebellari.....	28

RISULTATI.....	30
1. Studio in vitro: effetto dell'esposizione a campi elettromagnetici ELF (<i>Extremely Low Frequency</i>) su colture primarie di granuli cerebellari prelevati da ratti neonati.....	31
1.1 Test di eccitotossicità da glutammato.....	33
1.2 Analisi dei canali del glutammato, mediante la tecnica del Patch clamp.....	34
1.3 Analisi dell'espressione dei recettori dell'acido glutammico.....	37
1.4 Analisi della distribuzione ed espressione dei neurofilamenti (NF200).....	39
2. Studio in vivo: effetto dell'esposizione a campi elettromagnetici ELF (<i>Extremely Low Frequency</i>) su ratti neonati.....	41
2.1 Test di eccitotossicità da glutammato.....	43
2.2 Analisi dei canali del glutammato, mediante la tecnica del Patch clamp.....	44
2.3 Analisi dell'espressione dell'mRNA delle subunità NR2B e NR2C del recettore del glutammato NMDA.....	45
DISCUSSIONE.....	49
CONCLUSIONI.....	55
MATERIALI E METODI.....	56
BIBLIOGRAFIA.....	78

INTRODUZIONE

1.Campi magnetici e sistemi biologici

1.1 La vita e l'elettromagnetismo

Gli organismi viventi sono sistemi elettrochimici complessi che si sono evoluti in un mondo che li ha sottoposti a molteplici stimoli chimici e fisici. L'intero universo conosciuto è sottoposto alle stesse leggi chimico-fisiche che regolano il comportamento delle macromolecole organiche e biologiche. Una delle caratteristiche fondamentali degli organismi viventi è quella di interagire con l'ambiente che li circonda e di adattarsi ai diversi segnali che da esso riceve e alle loro variazioni.

I campi naturali ed artificiali elettrici e magnetici, anche se sono invisibili all'occhio umano, rappresentano uno dei tipi di segnali maggiormente presenti nel nostro ambiente naturale. Da questo si evince che le interazioni magnetiche sono state utilizzate nel corso dell'evoluzione da una grande varietà di organismi viventi, l'uomo compreso, per regolare funzioni cellulari critiche, come i ritmi circadiani e il sistema di navigazione degli uccelli, fino ad arrivare alle funzioni di membrana dei neuroni. Non ci sorprende quindi sapere che le nostre macromolecole biologiche sono state sottoposte nel corso dell'evoluzione a forti condizionamenti magnetici: le proteine, le molecole fondamentali della vita, devono infatti la loro conformazione, il loro *folding*, e quindi la loro funzione, a specifiche e precise forze magnetiche interne. Un esempio classico di interazione degli esseri viventi con la componente elettromagnetica ambientale è rappresentato dal sistema visivo: l'occhio infatti non è altro che un complesso dispositivo biologico deputato alla percezione dell'intervallo visivo dello spettro elettromagnetico.

Nell'ultimo secolo però l'emissione elettromagnetica ambientale è notevolmente aumentata e diversificata a seguito dei radicali avanzamenti tecnologici cui è andato incontro l'uomo contemporaneo (Frey, 1993).

Ci troviamo di fronte quindi a frequenze, modulazioni e intensità nuove di campo magnetico le quali continuano ad essere "percepite" dagli organismi viventi, a partire dalle cellule, provocando delle risposte e quindi degli effetti biologici nuovi

da studiare. Questa recente tematica scientifica, offre una prospettiva completamente nuova da cui analizzare i sistemi biologici e permette di integrare le interpretazioni basate sulla fisica, biochimica e la biologia molecolare. La differenza fondamentale quindi tra l'approccio molecolare e quello magnetico alla fisiologia è che per quest'ultimo non è stata ancora formulata una teoria unitaria per spiegarne gli effetti e le interazioni (Liboff, 2004).

Per quanto esistano già approcci che utilizzano i campi elettrici e magnetici in clinica con buoni risultati, ad esempio la magnetoterapia in traumatologia e ortopedia (Marchetti, 1988; Betti, 1997) e le stimolazioni magnetiche transcraniali per il trattamento della depressione (Fujita & Koga, 2005), resta il problema della mancanza di conoscenze precise che guidino la scelta di un certo irraggiamento piuttosto che un altro per interagire con uno specifico meccanismo biologico.

Gli effetti indotti dalla stimolazione magnetica vengono oggi valutati per le densità delle correnti prodotte. Mentre possono essere più chiari gli effetti causati da stimolazioni massicce, o comunque di media intensità (quale può essere quella di un *pace-maker* cardiaco), diventano difficilmente spiegabili i meccanismi che permettono ad una singola cellula di reagire a segnali di intensità tali, da non poter essere accoppiati in linea teorica a nessun evento fisiologico. Inoltre sarebbe importante valutare questi effetti anche in termini meramente fisici, oltre che a trovare spiegazioni che li leghino ad alterazioni dei "normali" meccanismi biochimici (Liboff, 2004).

1.2 Campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici: caratteristiche generali

I termini campo elettrico, campo magnetico, campo elettromagnetico, onda elettromagnetica non sono sinonimi, ma rappresentano fenomeni diversi, che hanno diverse modalità di interazione con i sistemi biologici (Lozito, 2002).

Il *campo elettrico* è la grandezza fisica che caratterizza una regione di spazio le cui proprietà dipendono dalla distribuzione delle cariche elettriche. In particolare, le caratteristiche di un campo elettrico possono essere sintetizzate come segue:

- si manifesta con una forza che agisce su qualunque carica elettrica introdotta nello spazio sede di campo elettrico;
- è descritto mediante un vettore E (detto vettore campo elettrico, o semplicemente campo elettrico) che in ogni punto della regione di spazio indica la direzione, l'intensità ed il verso della forza che agisce su una carica puntiforme unitaria posta in quel punto;
- la sua intensità si misura in volt al metro (V/m);
- a causa della forza che esercita sulle cariche, il campo elettrico è in grado di generare correnti elettriche nei materiali cosiddetti conduttori.

Il *campo magnetico* è la grandezza fisica che caratterizza una regione di spazio le cui proprietà dipendono dalle distribuzioni delle correnti elettriche. In particolare, le caratteristiche di un campo magnetico possono essere sintetizzate come segue:

- si manifesta con una forza che agisce su qualunque altra corrente elettrica o carica elettrica non in quiete introdotta nello spazio sede di campo magnetico;
- può essere descritto mediante un vettore H (detto densità di flusso magnetico, o anche induzione magnetica) definito dalla forza che in ogni punto della regione di spazio si manifesta su una corrente o una carica elettrica elementare non in quiete, posta in quel punto;
- la sua intensità si misura in tesla (T).

Gli effetti dell'interazione di una particella carica con un campo magnetico sono descritti dalla forza di Lorentz. Tale forza è originata dal campo magnetico, e agisce su una particella di carica q che entra con velocità v in un campo magnetico B , ed è rappresentata dal prodotto vettoriale:

$$\mathbf{F} = q\mathbf{v} \times \mathbf{B}$$

Se il vettore v è parallelo al vettore del campo magnetico B , allora il modulo della forza è uguale a zero e sulla particella carica non agisce nessuna forza che perturbi il suo moto. Se invece una carica entra con una velocità perpendicolare al campo,

questa si muoverà di moto circolare uniforme. Infine se il vettore velocità è obliquo rispetto al vettore campo magnetico risulterà un moto a spirale o elicoidale della particella (Serway, 1998).

Carica elettrica e corrente elettrica sono quindi, come precedentemente detto, le sorgenti materiali rispettivamente del campo elettrico e del campo magnetico (Fig.1.1).

Un campo elettrico può essere generato, oltre che da una distribuzione di carica elettrica, anche da un campo magnetico variabile nel tempo. Allo stesso modo, un campo magnetico può essere generato, oltre che da una distribuzione di corrente elettrica, anche da un campo elettrico variabile nel tempo. Quindi, in regime variabile nel tempo, campo elettrico e campo magnetico diventano uno la sorgente (cioè la "causa") dell'altro: in queste condizioni, campo elettrico ed campo magnetico possono essere considerati come due aspetti di un'unica grandezza fisica, il *campo elettromagnetico*, in grado di propagarsi a distanza indefinita dalla sorgente. Il fenomeno è indicato anche con il termine *radiazione elettromagnetica* (Lozito, 2002).

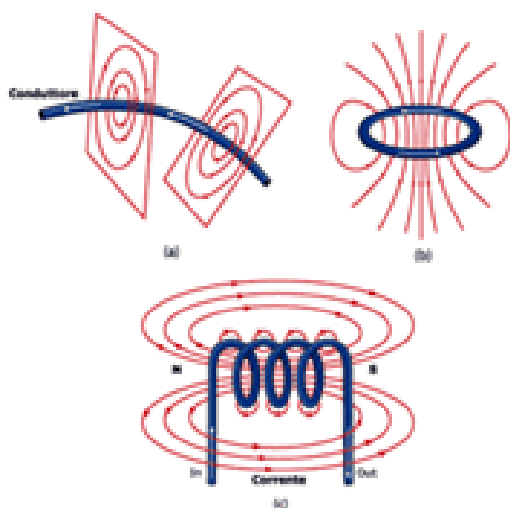


Fig.1.1. Rappresentazione delle linee di forza (rosso) di un campo magnetico generato da diversi avvolgimenti di filo percorso da corrente: filo singolo (a), spira (b), solenoide (c).

In particolari condizioni spaziali, di geometria delle sorgenti e di lunghezze d'onda, l'ampiezza del campo elettromagnetico varia in modo oscillatorio sinusoidale sia nel tempo che nello spazio. In queste condizioni, la radiazione elettromagnetica è rappresentata da un'onda elettromagnetica.

La struttura spaziale del campo in funzione della distanza mostra che in prossimità della sorgente (es. antenna, apparato industriale a radiofrequenza, elettrodotto, elettrodomestico) prevalgono il campo elettrico ed il campo magnetico, sono cioè indipendenti l'uno dall'altro, mentre per distanze superiori circa una lunghezza d'onda, diviene prevalente il campo elettromagnetico. La struttura dei campi assume, in questo caso, le caratteristiche della radiazione, cioè la mutua generazione tra campo elettrico e campo magnetico. Si parla quindi di condizioni di *campo lontano* quando i due campi sono in fase, ortogonali tra loro e trasversali rispetto alla direzione di propagazione (Fig.1.2.) (Lozito, 2002).

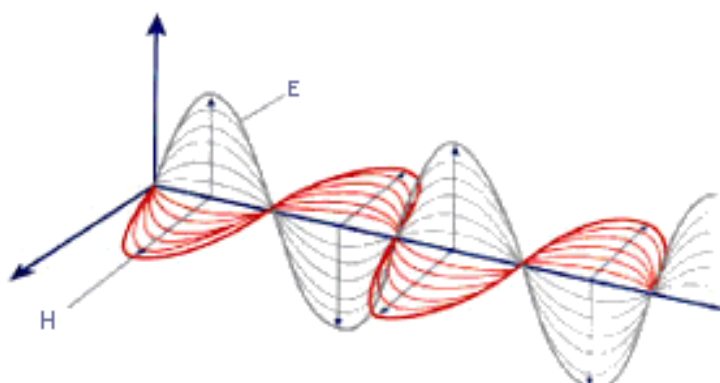


Fig.1.2. Il campo elettrico (E) ed il campo magnetico (H) si propagano perpendicolarmente tra loro e rispetto alla direzione dell'onda.

In molti casi le ampiezze dei campi radiativi variano in modo sinusoidale tanto nel tempo quanto nello spazio. Si parla allora, come già accennato prima, di onda elettromagnetica, che ha la proprietà di propagarsi a grande distanza dalla sorgente dalla quale è stata generata (antenna) ed in cui i campi, elettrico e magnetico, sono perpendicolari tra di loro e alla direzione di propagazione dell'onda (Fig.2.2).

Per riassumere, nell'onda elettromagnetica il campo elettrico (E) e quello magnetico (H) sono inscindibili l'uno dall'altro e l'esistenza dell'uno comporta sempre l'esistenza dell'altro.

La variabilità nel tempo viene descritta dalla frequenza, che è uguale al numero di oscillazioni del campo nell'unità di tempo, e si misura in *Hertz* (Hz). La frequenza f è legata alla lunghezza d'onda λ dall'equazione:

$$v = f\lambda$$

dove v è la velocità di propagazione dell'onda, quindi la frequenza e la lunghezza d'onda sono inversamente proporzionali (Serway, 1998). Viene chiamato spettro del campo elettromagnetico l'insieme continuo delle sue frequenze (Fig.2.3).

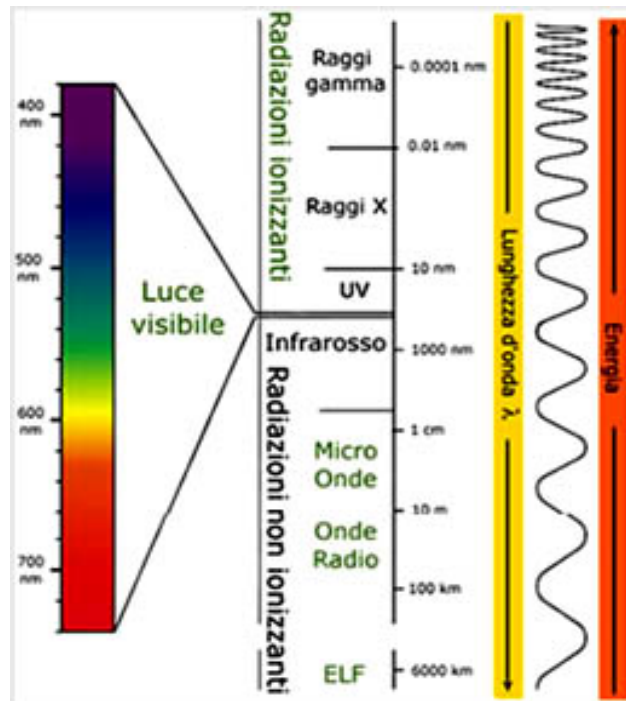


Fig.1.3. Spettro del Campo Elettromagnetico.

1.3. Elettricità e magnetismo: sorgenti artificiali di origine antropica

Tutte le tecnologie, che per il loro funzionamento usano energia elettrica, generano campi elettrici, campi magnetici, o campi elettromagnetici. Deve essere però precisato che per alcune tecnologie la generazione dei campi elettromagnetici durante il loro funzionamento costituisce un effetto non voluto, né necessario per il funzionamento stesso (Lozito, 2002). Ad esempio, lo scopo di un elettrodotto non è quello di generare campi elettrici e magnetici, ma quello di trasportare e distribuire energia elettrica, per cui si può affermare che il campo elettrico e magnetico sono effetti secondari non necessari al funzionamento dell'elettrodotto. Tale situazione è

però specifica solo per pochissime tecnologie, in quanto generalmente la produzione di campi elettromagnetici non rappresenta un effetto secondario, ma è lo scopo principale per il quale sono progettate le tecnologie elettriche ed elettroniche. Ciò è tipico dei sistemi di telecomunicazione, nei quali l'informazione, per essere trasmessa a distanza, deve necessariamente essere supportata da una emissione di campo elettromagnetico.

L'inquinamento elettromagnetico di origine antropica, cioè il cosiddetto *elettrosmog*, è causato da quella parte dello spettro delle radiazioni non ionizzanti, dette anche **N I R** (*Non Ionizing Radiation*) (Tab.1.1.), che hanno frequenza compresa tra 0 Hertz (Hz) e 3×10^{11} Hertz (300 GHz). Queste possono a loro volta essere suddivise in:

- campi magnetici a frequenze estremamente basse (**ELF**: *extremely low frequency*);
- radiofrequenze (**RF**);
- microonde (**MO**).

Le radiazioni non ionizzanti sono definite tali perché la loro energia è minore di quella necessaria a “strappare” un elettrone da un atomo (ionizzazione); questa energia è invece posseduta dai raggi ultravioletti, dai raggi X e γ che sono dette radiazioni ionizzanti. Le NIR non sono in grado di rompere direttamente i legami molecolari perché non possiedono energia sufficiente, ma tra gli effetti riconosciuti dalla comunità scientifica ci sono gli effetti termici (Lozito, 2002).

Nell'intervallo compreso tra 0 e 3000 Hz abbiamo le radiazioni a frequenza estremamente bassa (*Extremely Low Frequency*, ELF) le quali hanno una lunghezza d'onda maggiore di 100 Km. Questo tipo di onde vengono generate da elettrodotti a bassa, media ed alta tensione, da linee elettriche di distribuzione e tutti i dispositivi alimentati a corrente elettrica alla frequenza di 50 Hz, ad esempio elettrodomestici, videoterminali ecc. A queste frequenze molto basse il campo generato è in realtà molto simile alla somma di due campi statici, uno elettrico e l'altro magnetico, piuttosto che ad un vero campo elettromagnetico. L'esposizione ai campi elettrici e magnetici generati dagli elettrodotti alla frequenza di 50 Hz, provoca all'interno del

corpo umano correnti elettriche indotte i cui valori dipendo dall'intensità del campo (Lozito, 2002).

<u>DENOMINAZIONE</u>		<u>SIGLA</u>	<u>FREQUENZA</u>	<u>LUNGHEZZA D'ONDA (λ)</u>
FREQUENZE ESTREMAMENTE BASSE		ELF	0 – 3 kHz	> 100 Km
FREQUENZE BASSISSIME		VLF	3 – 30 kHz	100 – 10 Km
RADIOFREQUENZE	BASSE FREQUENZE (ONDE LUNGHE)	LF	30 – 300 kHz	10 – 1 Km
	MEDIE FREQUENZE (ONDE MEDIE)	MF	300 kHz – 3 MHz	1 Km – 100 m
	ALTE FREQUENZE	HF	3 – 30 MHz	100 – 10 m
	FREQUENZE ALTISSIME (ONDE METRICHE)	VHF	30 – 300 MHz	10 – 1 m
MICROONDE	ONDE DECIMETRICHE	UHF	300 MHz – 3 GHz	1 m – 10 cm
	ONDE CENTIMETRICHE	SHF	3 – 30 GHz	10 – 1 cm
	ONDE MILLIMETRICHE	EHF	30 – 300 GHz	1 cm – 1 mm

Tab. 1.1. Radiazioni non ionizzanti (NIR)

1.4. L'interazione per risonanza

Fin dagli anni '70, sono stati ottenuti dati sperimentali che evidenziavano in risposta all'applicazione di campi elettromagnetici un effetto biologico massimo a specifiche frequenze di stimolazione; questo suggerisce l'intervento di un fenomeno di risonanza (Liboff, 2004). Alla luce di questo, un modello appropriato per prevedere come gli organismi viventi rispondano ai campi magnetici è quello di

paragonarli ad un ricevitore radio. Infatti una radio è immersa in un ambiente ricchissimo di segnali ed onde, ma essa non li riceve tutti, perché non sono alla frequenza o alla modulazione appropriate. Ma se esponiamo la radio ad un segnale appropriatamente sintonizzato, questo interferirà con l'apparecchio, anche se è d'intensità molto bassa, e da esso sarà amplificato. Allo stesso modo, se esponiamo un sistema vivente ad una segnale elettromagnetico molto debole, ma opportunamente sintonizzato, questo potrebbe interagire in risonanza con una normale funzione biologica che sviluppa deboli correnti alternate endogene a quella stessa frequenza (Frey, 1993; Liboff, 2004). Questo tipo di interazione in risonanza è stato osservato in molti sistemi non viventi, suggerendo che deboli campi magnetici possano causare un effetto di risonanza a livello molecolare e sopra-molecolare nelle soluzioni di elettroliti, e pertanto possano influenzare in tal modo i processi biologici (Pazur,2004).

Un modello per spiegare questo aspetto dell'interazione tra campi magnetici a bassa frequenza ed i sistemi biologici basato quindi sulla risonanza è stato proposto da Liboff nel 1985. Liboff ha suggerito anche che il sito cellulare di interazione potessero essere i canali ionici di membrana, proprio in virtù delle loro caratteristiche elettriche. Infatti il trasporto ionico attraverso questi canali è governato non solo da sensori di voltaggio, ma anche da campi elettrici oscillatori, che risultano dalla distribuzione elicoidale degli ossigeni carbonilici che si trovano nelle pareti del canale sul lato luminale.

Liboff nella sua teoria ipotizzò che i periodici cambiamenti nella concentrazione ionica associati all'oscillazione dello ione Ca^{2+} potrebbero risultare in variazioni nel campo elettrico intracellulare. Il fenomeno della risonanza avverrebbe quando la cellula viene esposta ad una specifica combinazione di campi magnetici statici deboli e alternati a bassa frequenza. Secondo Liboff, alla frequenza di risonanza il campo ELF ed il campo magnetico statico accelererebbero le molecole e gli ioni in un moto a spirale, per esempio all'interno di un canale di membrana, e questo potrebbe alterare la normale fisiologia elettrochimica della cellula. Tali fenomeni di risonanza potrebbero essere non soltanto la modalità con cui campi magnetici esterni interagiscono con i sistemi biologici, ma la modalità stessa con cui funzionano tanti meccanismi cellulari (Liboff,1997).

1.5. Gli effetti dei campi ELF sulla cellula

Come è stato detto in precedenza, la membrana cellulare è uno dei siti candidati a svolgere il ruolo di sensore primario dei campi magnetici esterni. Una delle funzioni basilari che potrebbe essere alterata è il trasporto del calcio. Lo ione Ca^{2+} svolge molte funzioni fondamentali in tutti gli organismi viventi: oltre alla sua funzione strutturale, ad esempio nella matrice ossea o nella parete cellulare vegetale, gioca un ruolo importantissimo nell'omeostasi cellulare, ed in particolare come messaggero intracellulare. La concentrazione di Ca^{2+} libero citosolico è strettamente controllata, e mantenuta 3-4 ordini di grandezza al di sotto della concentrazione extracellulare e di quella nei depositi intracellulari. Aumenti localizzati del Ca^{2+} libero citosolico nella forma di gradienti e onde sono coinvolti nella regolazione delle funzioni cellulari, comprese quelle di base, quali la proliferazione e l'apoptosi. La bassa concentrazione citosolica è mantenuta mediante trasportatori attivi di membrana, quale la Ca^{2+} -ATPasi.

In alcuni tipi cellulari ed in alcune circostanze, i campi magnetici possono alterare i livelli di calcio libero citosolico, anche se questo effetto non sembra essere universale: la risposta sembra essere specifica relativamente al tipo cellulare, alla necessità di induzione, all'ampiezza e alla frequenza applicate. Inoltre la maggior parte degli studi effettuati riguardano le cellule del sistema immunitario e l'impiego di diversi metodi di misurazione, di coltura cellulare ed esposizione rendono difficile una comparazione dei dati (Murphy e Mild, 1997).

Bauréus Koch nel 1997 e colleghi hanno studiato gli effetti dei campi ELF in un sistema costituito da vescicole di membrana plasmatica altamente purificate; questo ha permesso di studiare la risposta di un modello isolato di membrana, evitando che l'effetto venisse compensato da qualche meccanismo di *feedback*. I lati intra- ed extracellulare sono stati invertiti in modo che l'ambiente intravescicolare corrispondesse a quello extracellulare. Le vescicole sono state caricate con ioni Ca^{2+} tramite Ca^{2+} -ATPasi, e stimulate con diverse frequenze in condizioni di risonanza per 30 minuti; quindi è stata misurata la concentrazione di calcio extravescicolare. È stato osservato che l'efflusso di calcio, corrispondente all'ingresso di calcio nella cellula, è funzione dell'ampiezza del campo magnetico variabile applicato. Ciò

dimostra che la membrana cellulare è senza dubbio un sito di interazione con i campi ELF, e che tale interazione porta all'apertura dei canali del calcio (Bauréus Koch *et al*, 1994).

Anche le vie di trasduzione del segnale sono influenzate dai campi magnetici; infatti la funzione di questi *pathways* è di ricevere dall'ambiente informazioni fisiche, oltre che biologiche, e di trasmetterle all'interno della cellula (Luben, 1991). L'opinione attuale è che vi sia un'associazione positiva tra i campi e la trasduzione, ma i passaggi iniziali dell'interazione, ed in particolare il primissimo *step* di riconoscimento, non sono stati ancora identificati. Questi effetti sono stati evidenziati per particolari tipi cellulari, ma sono necessari ulteriori esperimenti per dimostrare l'ampiezza dell'applicabilità di questo modello. Inoltre dovranno essere individuate le specifiche vie coinvolte ed i meccanismi di interazione.

Le attuali conoscenze suggeriscono che i campi elettromagnetici agiscano attraverso una interazione mediata dalla membrana cellulare che alteri le attività enzimatiche ad essa connesse: questo, tramite le cascate di trasduzione, porterebbe a variazioni nelle funzioni cellulari (Murphy e Mild, 1997).

Molti sono gli studi che riportano l'effetto dei campi magnetici sugli enzimi cellulari, in particolare sulla ornitina decarbossilasi (ODC). La ODC è un enzima presente in tutte le cellule che regola la sintesi delle poliammidi, che sono necessarie per la sintesi del DNA. C'è una evidenza sperimentale che i campi, in un ampio *range* di esposizione e frequenze, possano alterare l'attività della ODC su linee cellulari o tessuti. La maggior parte degli studi *in vitro* hanno dimostrato un aumento da 2 a 4 volte della sua attività; gli esperimenti su gli animali sono più variabili, forse a causa di una tessuto-specificità. Non è stato dimostrato però nessun effetto induttivo sulla trascrizione della ODC suggerendo che le alterazioni potrebbero essere dovute ad un aumento della concentrazione dell'enzima causato da variazioni nei tassi di degradazione. Sussistono tuttavia difficoltà nel riprodurre gli esperimenti: infatti sembrano essere coinvolti numerosi fattori nella responsività alla stimolazione, quali il tipo di linea cellulare, il livello di confluenza ed il numero di passaggi. Nonostante ciò, gli effetti osservati sulla attività ODC sono sufficientemente consistenti da poter essere considerati biologicamente significativi (Murphy e Mild, 1997).

2 I Recettori del Glutammato

I recettori del glutammato (GluRs) sono una famiglia di proteine transmembrana che media la maggior parte della trasmissione neuronale di tipo eccitatorio nel sistema nervoso centrale dei mammiferi. Esse partecipano anche ai cambiamenti nella plasticità sinaptica, soprattutto durante la formazione delle reti neuronali nel corso del differenziamento del sistema nervoso centrale (Mayer e Westbrook, 1987; Dingledine et al., 1988; Monaghan et al., 1989).

Questi recettori svolgono un ruolo importante sia nella fisiologia che nelle patologie del sistema nervoso, infatti molte malattie neurodegenerative sono correlate ad un loro eccessiva attivazione (Rothman e Olney, 1987; Choi e Rothman, 1990; Meldrum e Garthwaite, 1990).

I recettori del glutammato sono distinti in due principali classi: ionotropici e metabotropici (Seeburg, 1993; Hollmann e Heinemann, 1994). I recettori ionotropici (iGluRs) contengono specifici canali ionici e sono suddivisi in tre sottogruppi: *α*-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), KAINATO and N-methyl-D-aspartate (NMDA). I recettori metabotropici (mGluRs) sono accoppiati a *GTP-binding proteins* (*G-proteins*) e modulano la produzione di secondi messaggeri intracellulari.

2.1I Recettori Ionotropici

I recettori ionotropici sono stati suddivisi in tre gruppi, AMPA, KAINATO e NMDA, in base ai loro specifici agonisti. Tuttavia non esiste una distinzione netta tra i recettori AMPA e KAINATO, infatti sia gli uni che gli altri possono rispondere ai medesimi agonisti, per questo inizialmente i recettori ionotropici del glutammato venivano distinti in NMDA e non NMDA. Successivi studi di clonaggio molecolare hanno permesso di identificare le varie subunità che costituiscono i recettori AMPA e KAINATO dimostrando che si tratta di complessi distinti, formati da subunità diverse.

Questi recettori formano dei veri e propri canali ionici che in posizione postsinaptica, mediano la maggior parte della trasmissione neurosinaptica eccitatoria del cervello.

2.1.1 Classificazione e struttura

Studi di biologia molecolare hanno rivelato una maggiore varietà tra i recettori GluRs rispetto a quella attesa in base a studi elettrofisiologici e farmacologici. Infatti queste tre classi di recettori, sono costituite dall'assemblamento di più subunità. Per i recettori AMPA esistono 4 diverse subunità (GluR1-4), 5 per i recettori kainato (GluR5-7 e KA1, KA2), infine altre 5 per i recettori NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C e NR2D), (Hollmann et al., 1989; Moriyoshi et al., 1991), (Fig.2.1)

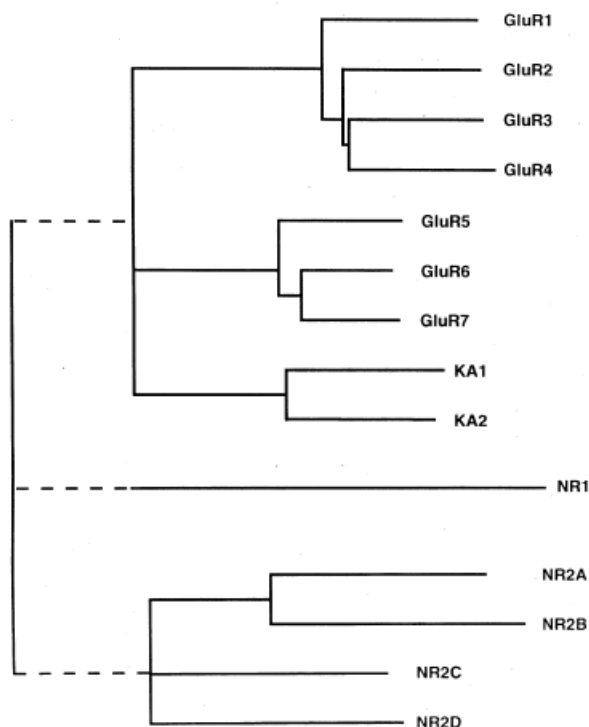


Fig.2.1 Dendrogramma dei membri della famiglia dei recettore ionotropici del Glutammato. (Ozawa et al., 1997)

Queste subunità sono codificate da geni diversi, alcuni dei quali presentano meccanismi di *splicing* alternativo ed *editing* del RNA, aumentando così la complessità dei possibili recettori presenti sulla membrana plasmatica del neurone.

Tutte le subunità dei recettori GluRs hanno una struttura simile costituita da un largo dominio N-terminale extracellulare, 4 segmenti idrofobici di membrana (M1-M4) e un dominio C-terminale intracellulare (Holmann, 1994 et al; Kuryatov et al., 1994; Stern-Bach et al., 1994; Bennett and Dingledine, 1995; Wo e Oswald, 1995). Un esempio di una subunità del recettore AMPA, GluR2, secondo il modello proposto da Holmann è illustrato in figura 2.2.

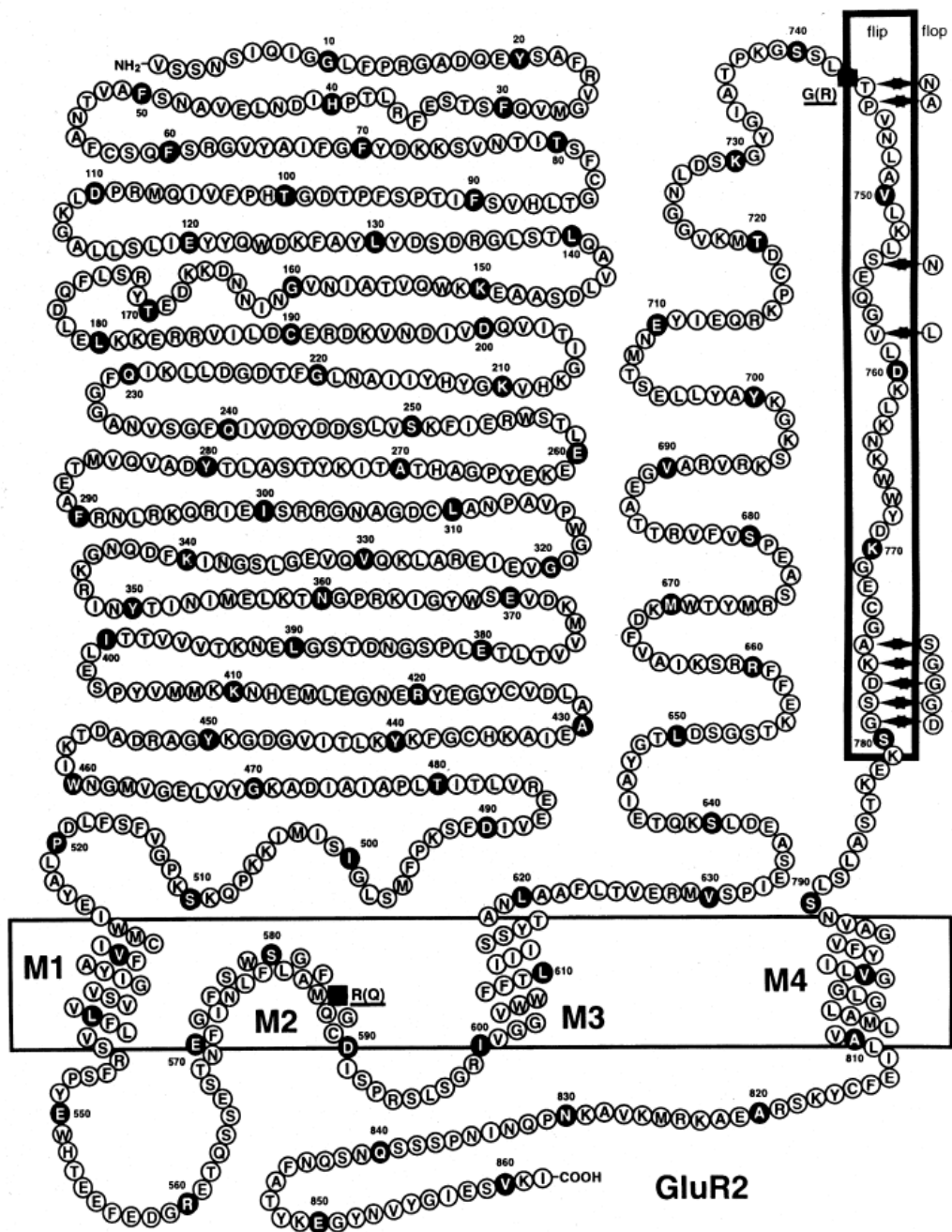


Fig.2.2 Struttura della subunità GluR2 del recettore AMPA.(Ozawa et al., 1997)

2.1.2 I recettori non NMDA: AMPA e KAINATO.

Questi recettori GluRs inizialmente venivano raggruppati in una unica classe dei non NMDA, in quanto era noto che non avevano come agonista NMDA, ma potevano essere attivati entrambi sia dal kainato, sia dall'AMPA. Dopo la scoperta delle varie subunità dei recettori del glutammato è stata messa in evidenza una chiara distinzione tra i due tipi di recettore. Infatti come detto in precedenza, essi sono costituiti da proteine diverse, anche se con una forte omologia, inoltre sono stati scoperti differenti antagonisti capaci di bloccare in maniera specifica, l'uno o l'altro recettore.

I recettori AMPA

I recettori AMPA mediano la neurotrasmissione eccitatoria veloce, nella maggior parte delle sinapsi del sistema nervoso centrale. Le differenti proprietà funzionali di questi recettori dipendono dal modo con cui si assemblano le varie subunità, formando complessi sia omomerici, sia eteromerici. I recettori AMPA sono considerati permeabili al Na^+ e al K^+ e in generale impermeabili al Ca^{2+} , tuttavia è stato dimostrato che in alcuni casi questi recettori sono permeabili al Ca^{2+} , in particolare si è visto che i recettori omomerici costituiti dalla subunità GluR2 sono impermeabili al Ca^{2+} , mentre i recettori omomerici costituiti dalle subunità GluR1, GluR3 e GluR4 sono permeabili allo ione, infine nei recettori eteromerici la presenza o meno della subunità GluR2 risulta decisiva per la permeabilità del recettore al Ca^{2+} , evidentemente questa subunità presenta caratteristiche strutturali che bloccano il passaggio dello ione attraverso il recettore (Seeburg, 1993; Hollmann e Heinemann, 1994; Jonas and Burnashev, 1995). L'unica proprietà che distingue la subunità GluR2 dalle altre è riscontrabile in un singolo aminoacido situato sul segmento idrofobico M2, questo residuo è un'arginina (R) con carica positiva, nelle altre tre subunità è invece presente una glutamina (Q) con carica neutra. La presenza di un'arginina riduce la permeabilità del recettore ai cationi monovalenti, lo rende impermeabile al Ca^{2+} e ne altera la relazione corrente/voltaggio. Quindi la permeabilità del recettore al Ca^{2+} cambia a seconda di quale dei due aminoacidi (arginina o glutamina) è presente in questo sito chiamato Q/R (Hume et al., 1991;

Mishina et al., 1991; Burnashev et al., 1992b). L'arginina presente nel sito Q/R della subunità GluR2 non è codificata dal gene ma viene aggiunta successivamente mediante un meccanismo post-transcrizionale definito *editing* dell'RNA. Esso utilizza una specifica RNA deaminasi (ADAR) che rimuove un gruppo amminico in una Adenina specifica, del pre-mRNA dei recettori, trasformandola in inosina.

I recettori Kainato

Nonostante questo recettore sia notevolmente distribuito nel sistema nervoso centrale, la sua funzione non è ancora del tutto chiara. Studi di espressione genica hanno dimostrato che recettori omomerici costituiti dalle subunità GluR5 e GluR6 formano canali funzionanti, mentre le subunità GluR7, KA1 e KA2 non possono formare canali che funzionanti (Werner et al., 1991; Bettler et al., 1992). Come per i recettori AMPA anche qui possiamo avere *editing* del RNA nel sito Q/R, in particolare nelle subunità GluR5 e GluR6 e anche in questo caso tale proprietà strutturale influenza la permeabilità del recettore al Ca^{2+} . Al contrario dei recettori AMPA, l'*editing* del RNA nel sito Q/R è incompleto durante lo sviluppo, quindi nell'adulto possono coesistere entrambe le forme di mRNA, quella che ha subito *editing* e quella che non lo ha subito.

2.1.3 I recettori NMDA

I recettori NMDA mediano la neurotrasmissione eccitatoria del sistema nervoso centrale in modo diverso rispetto ai recettori non NMDA. Essi infatti sono caratterizzati da un blocco voltaggio dipendente ad opera del Mg^{2+} (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984), una notevole permeabilità al Ca^{2+} e una lenta cinetica del canale ionico (MacDermott et al., 1986; Mayer e Westbrook, 1987a; Lester et al., 1990). Come per i recettori AMPA e kainato, anche gli NMDA possono formare complessi sia omomerici che eteromerici, tuttavia l'ampiezza della risposta ottenuta con recettori omomerici è molto più piccola rispetto a quelli eteromerici, inoltre studi molecolari hanno evidenziato che solo la subunità NR1 è in grado di formare strutture omomeriche funzionanti. Le altre subunità hanno il ruolo di aumentare l'efficienza della risposta del recettore eteromerico, quindi il recettore deve

necessariamente essere costituito dalla subunità principale NR1, a cui si aggiungono le altre subunità secondarie NR2 (A,B,C e D) (Nakanishi, 1992; Seeburg,1993; Mori e Mishina, 1995).

Per la loro attivazione i recettori NMDA hanno bisogno oltre che del legame del neurotrasmettitore, il glutammato, anche dello sblocco dall'inibizione ad opera del Mg^{2+} . Questo avviene nel momento in cui la membrana sinaptica subisce una depolarizzazione, che permette il rilascio del Mg^{2+} , il canale così può attivarsi (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Per queste proprietà i recettori NMDA possono essere considerati canali voltaggio dipendenti, questo spiega la lentezza della loro cinetica, infatti prima della loro attivazione è necessaria una depolarizzazione della membrana, a cui contribuisce l'apertura degli altri canali del glutammato (AMPA e kainato), che avviene più rapidamente.

Altri studi hanno evidenziato che l'efficienza della risposta di questi recettori è marcatamente aumentata dalla glicina (Johnson e Ascher,1987). L'effetto della glicina è rilevabile a bassissime concentrazioni dell'aminoacido (0,1-0,7 μ M) inoltre è stato dimostrato che la glicina non è un semplice potenziatore dell'attività del canale, ma è assolutamente necessario per la sua attivazione. Infatti anche se il recettore sembra funzionare in terreno privo di glicina, in realtà si è visto che una piccola contaminazione dell'aminoacido rimane sempre nelle soluzioni sperimentali (circa 20-50 nM). Utilizzando dei protocolli in cui viene eliminata completamente la glicina dal terreno di coltura (terreni glicina *free*), i recettori NMDA non sono funzionanti (Kemp et al.,1988; Vyklicky et al., 1990), questo ha portato alla conclusione che la glicina è un coagonista dei canali NMDA.

Anche per gli NMDA il sito corrispondente al Q/R svolge un importante ruolo nella fisiologia del recettore, questo sito, localizzato sul segmento idrofobico M2, è occupato da una asparagina (N) (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993; Hollmann e Heinemann,1994; Mori e Mishina, 1995), tale aminoacido in quella precisa posizione, influenza sia la permeabilità del canale al Ca^{2+} , sia il suo blocco dovuto al Mg^{2+} (Burnashev et al.,1992c; Mori et al., 1992; Sakurada et al., 1993). Infatti in esperimenti in cui viene rimossa l'asparagina nella subunità NR1, la permeabilità del recettore al Ca^{2+} e il blocco operato da Mg^{2+} vengono completamente aboliti (Burnashev et al.,1992c, Sakurada et al., 1993).

2.2 I Recettori Metabotropici

Il Glutammato attiva non solo i recettori ionotropici ma anche quelli metabotropici (mGluRs), i quali sono accoppiati alle G-proteins (Schoepp e Conn, 1993; Nakanishi, 1994; Pin e Duvoisin, 1995). Studi molecolari hanno portato all'identificazione di 8 geni, mGluR1-8, che codificano per i recettore metabotropici, alcuni di questi geni presentano splicing alternativo, aumentando la variabilità dei recettori (Abe et al., 1992; Tanabe et al., 1992, 1993; Nakajima et al, 1993, Pickering et al., 1992).

2.2.1 Classificazione e struttura

Gli otto sottotipi di mGluRs hanno una struttura primaria molto correlata la loro sequenza presenta più del 40% di omologia (Pin e Duvoisin, 1995),(Fig.2.3).

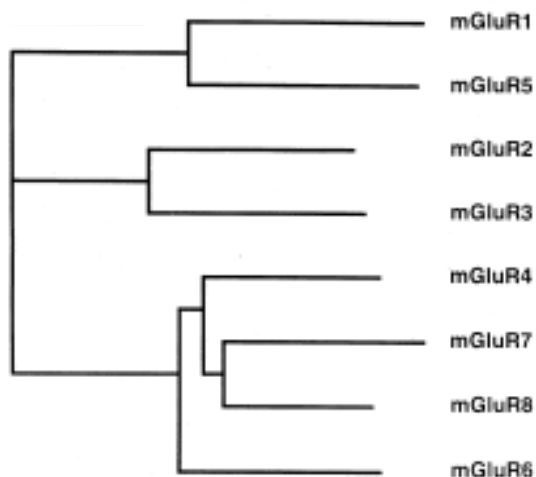


Fig.2.3 Dendrogramma dei membri della famiglia dei recettore metabotropici del Glutammato. (Ozawa et al., 1997)

Tutti i recettori metabotropici sono proteine molto grandi (854-1179 aminoacidi), hanno sette domini transmembrana, una regione N-terminale extracellulare e una porzione C-terminale intracellulare (Nakanishi, 1992; Hollmann e Heinemann, 1994; Pin e Duvoisin, 1995). Il dominio N-terminale contiene i siti di legame del glutammato, mentre quello C-terminale svolge un ruolo nel determinare l'efficienza degli agonisti recettoriali (Flor et al, 1996). Le sequenze del primo e del terzo dominio transmembrana sono altamente conservati, suggerendo il loro coinvolgimento nell'attivazione delle *G-proteins*.

I recettori metabotropici sono stati classificati in tre gruppi, in base alla somiglianza della loro sequenza e le loro proprietà farmacologiche e biochimiche. I recettori del gruppo I (mGluR1 e mGluR5) stimolano la fosfolipasi C (PLC) e la conseguente idrolisi del fosfatidilinositolo, che porta al rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari (Masu et al. 1991, Abe et al., 1992). Sono localizzati principalmente nelle postsinapsi dove regolano l'eccitabilità neuronale mediante la modulazione di canali ionici. I recettori del gruppo II (mGluR2 e mGluR3) e del gruppo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) inibiscono cAMP, con alcune eccezioni questi recettori sono localizzati nella membrana presinaptica, dove regolano il rilascio di glutammato o di altri neurotrasmettitori (Conn e Pin 1997; Alagarsamy et al, 2001).

2.3 Espressione genica dei Recettori Ionotropici

Le proprietà fisiologiche e farmacologiche dei recettori ionotropici del glutammato sono strettamente correlate alla loro regolazione trascrizionale e traduzionale. L'attivazione o l'inibizione dell'espressione genica delle varie subunità recettoriali può avvenire, in seguito ad episodi di ischemia, traumi, attivazione ripetuta dei circuiti afferenti o cronica somministrazione di particolari farmaci. Per esempio l'espressione delle diverse subunità del recettore AMPA può essere alterata in seguito ad episodi di ischemia (Pollard et al., 1993; Gorter et al., 1997) e l'espressione di GluR1 viene indotta durante la cronica esposizione alla morfina o ad altre droghe (Fitzgerald et al., 1996). Allo stesso tempo lo stadio di differenziamento

del neurone influenza notevolmente i meccanismi che regolano l'espressione genica di questi recettori. Per esempio durante il differenziamento dei granuli cerebellari, precisamente quando la loro migrazione arriva alla linea granulare interna, i recettori NMDA cambiano nella loro composizione, infatti l'espressione della subunità NR2B diminuisce mentre aumenta quella della subunità NR2C (Watanabe et al, 1994; Farrant et al, 1994; Monyer et al, 1994). La sovraespressione di NR2C è indotta dalla neurogulina- β , oltre che dall'attivazione del recettore stesso (Ozaki et al, 1997).

2.3.1 Regolazione trascrizionale

La regione del promotore, di alcuni geni che codificano per le subunità dei iGluRs, è stata clonata e ben caratterizzata, (in figura 4 sono rappresentati alcuni esempi). Questi studi hanno evidenziato che le diverse subunità dei recettori ionotropici, hanno molte somiglianze: il loro promotore è privo della TATA box e la CAAT box, hanno multipli siti di inizio trascrizionale, sparsi in zone ricche di GC, distribuiti su una regione che va da 18 a 190 basi, hanno sequenze consenso Sp, contengono inoltre siti di silenziamento RE1/NRSE che contribuiscono alla specificità neuronale (Myers et al.,1999). Oltre a questi elementi comuni il promotore dei recettori iGluRs, contengono elementi specifici, per esempio NR1 presenta nel suo promotore un sito che riconosce il MEF2C (*myocyte enhancer factor 2C*) e un sito AP-1, GluR2 invece presenta un sito NRF1 (*nuclear respiratory factor-1*), capace di aumentare l'attività del promotore in neuroni corticali trasfettati (Fif.2.4).

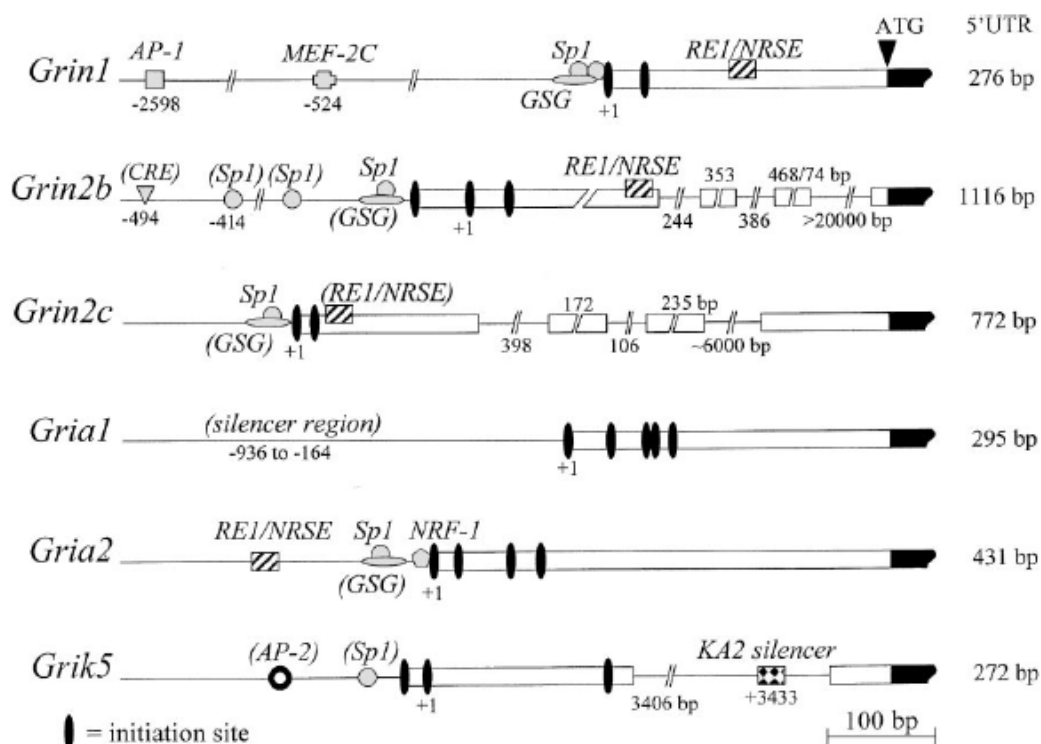


Fig.2.4 Rappresentazione schematica della regione prossimale dei promotori dei iGluRs. (Myers et al., 1999).

Oltre agli studi che hanno permesso di caratterizzare il promotore dei recettori del glutammato, per alcuni di questi è stato possibile capire anche qualche meccanismo di regolazione trascrizionale ad opera di fattori specifici coinvolte in vie di traduzione ben note. Per esempio l'espressione di NR1 è regolata da segnali, mediati dal cAMP. Questa via è intimamente legata all'attivazione di MAPKs (PKA, ERK). I livelli di mRNA di NR1 vengono incrementati dal trattamento con Foscilina, un attivatore del cAMP. Tale attivazione viene bloccata da inibitori del PKA, indicando che cAMP regola la trascrizione di NR1, mediante l'attivazione di PKA. Alcuni studi mettono in evidenza che CREB è il fattore che collega la via del cAMP al promotore di NR1, infatti mutando tre siti di legame di CREB (CRE) sul promotore di NR1 la sua attività viene drasticamente ridotta, si ipotizza il modello secondo cui l' cAMP attiva la PKA, la quale a sua volta direttamente o mediante induzione di altre chinasi attiva CREB, che si lega al promotore di NR1 attivandolo. (Lau et al, 2004)

Altri studi hanno mostrato che durante il differenziamento neuronale NR1 viene indotto, mediante l'interazione di Sp con un sito NF-kB.(Liu et al, 2004).

Anche per la subunità GluR1 sono stati eseguiti approfonditi studi ed è stato dimostrato che la sua espressione è regolata da molti differenti stimoli. I livelli di proteina vengono aumentati dal fattore di crescita dei fibroblasti (Cheng et al., 1995). In colture primarie di granuli cerebellari, una alta concentrazione di potassio (25 mM) aumenta i livelli di mRNA e proteina (Conadorelli et al. 1993). GluR1 è anche indotto durante *shocks* dovuti a ripetute elettroconvulsioni (Naylor et al., 1996) e in seguito al trattamento cronico con morfina o cocaina (Churchill et al, 1999). Allo stesso tempo i livelli di GluR1 diminuiscono con l'avanzamento dello sviluppo cerebrale.

2.3.2 Regolazione traduzionale

L'efficienza della traduzione di un mRNA può essere regolata mediante modificazioni dei motivi strutturali situati sul 5' o 3' UTR, alterazione o aumento del numero di codoni AUG, legame all'RNA di specifiche proteine (Jackson et al, 1997; Wickens et al.1997). Molte evidenze sperimentali mostrano che esistono dei meccanismi di regolazione traduzionale direttamente a livello dendritico, questo chiaramente permette un fine controllo temporale e spaziale dell'espressione genica, soprattutto per proteine come i recettori del glutammato che svolgono un ruolo chiave nella funzionalità sinaptica (Miyashiro et al.,1994; Crino et al.1996; Steward 1997).

Le prime evidenze di una regolazione traduzionale dei recettori del Glutammato sono state ottenute confrontando i livelli di mRNA e proteina della subunità NR1 nella linea cellulare PC12. Infatti l'mRNA era presente nella cellula, sia nello stadio differenziato che in quello indifferenziato, mentre la proteina non era rilevabile. Da questi studi è stato proposto che la traduzione dell'mRNA viene soppressa, forse a causa di motivi strutturali presenti sul 5' o 3' UTR (Sucher et al.1993). Anche la subunità NR2A e la subunità GluR2 sono soggette a controllo traduzionale, infatti è stato dimostrato che la traduzione del loro mRNA può essere soppressa e anche in questo caso sembrano coinvolte strutture presenti sul 5'UTR, in

particolare dei *loop* nelle regioni ricche di GC, oltre che un alterato numero dei codoni AUG (Wood et al.1996; Myers et al.,1997). Per le altre subunità dei recettori del glutammato ancora non si hanno evidenze significative per un potenziale controllo traduzionale, ma appare chiaro che il contenuto in GC e il numero dei codoni AUG sembrano essere la chiave per questi meccanismi di regolazione.

2.4 Recettori Ionotropici e differenziamento

I recettori del glutammato svolgono un importante ruolo neurotrofico, durante il differenziamento neuronale, soprattutto nelle prime fasi dello sviluppo. Per esempio, l'attivazione del canale NMDA è essenziale per la corretta formazione delle connessioni sinaptiche, nel corso dello sviluppo del sistema visivo e del cervelletto (Cline et al., 1989; Kleinschmidt et al, 1987; Rabacchi et al., 1992), inoltre il blocco di questo recettore impedisce la migrazione dei granuli cerebellari che si accompagna al loro differenziamento (Komuro e Rakic, 1993). Anche i recettori non-NMDA mediano alcuni effetti neurotrofici del glutammato, per esempio possono alterare lo sviluppo dei neuriti nei granuli cerebellari (Pizzi et al.,1994) o anche in parte regolare il numero di neuroni nel corso della maturazione del cervelletto (Cox et al.1990).

I recettori del glutammato svolgono questo importante ruolo sul differenziamento neuronale, sia stimolando la produzione e il rilascio di fattori neurotrofici, sia attivando una cascata di segnali di traduzione, che coinvolgono principalmente il calcio. Infatti questo ione è responsabile dell'attivazione di protein chinasi, come Ras-MAPK/ERK e PI3-K-Akt, che contribuiscono alla regolazione dell'espressione genica, inducendo fattori trascrizionali, come CREB, SRF, MEF-2, NF-kappaB (Balazs 2006). L'effetto neurotrofico di questi recettori è strettamente dipendente dallo stadio di sviluppo e di differenziamento neuronale una eccessiva stimolazione ad opera del glutammato risulta neurotossica; questo fenomeno sta alla base delle malattie neurodegenerative.

3 I Granuli cerebellari: Un ottimo modello di studio

3.1 Il Cervelletto

Il cervelletto occupa la maggior parte della fossa cranica posteriore. E' costituito da un mantello esterno di sostanza grigia (la corteccia cerebellare), da sostanza bianca, all'interno, e da tre paia di nuclei profondi che proiettano al di fuori del cervelletto: il nucleo del fastigio, il nucleo interposito ed il nucleo dentato. Una singolare caratteristica della superficie cerebellare è la presenza di numerose convoluzioni trasversali e parallele tra loro che decorrono da un lato all'altro del cervelletto. Due profonde fessure trasversali dividono il cervelletto in tre lobi principali. La fessura primaria, disposta in corrispondenza della sua superficie superiore, separa il lobo anteriore da quello posteriore. La fessura posterolaterale, situata nella parte inferiore del cervelletto, separa il lobo posteriore dal piccolo lobo flocculo-nodulare (Fig.3.1).

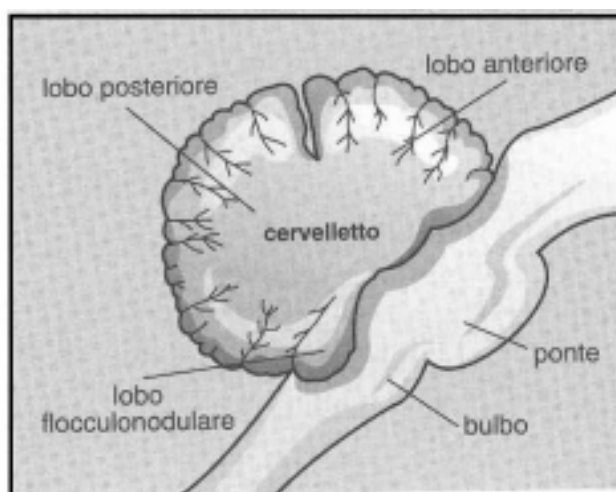


Fig.3.1 Organizzazione regionale del cervelletto.

Il cervelletto deriva sia dalla vescicola mesencefalica sia da quella rombencefalica. Usando le tecniche di trapianto è stato visto che il primordio del cervelletto deriva dalla parte più caudale del mesencefalo e dalla regione più anteriore del rombencefalo (Martinez e Alvarado-Mallart, 1989; Marin e Puelles, 1995).

La corteccia del cervelletto ha una struttura semplice ed uniforme, essendo costituita da tre strati contenenti solo cinque tipi di cellule: cellule stellate, a canestro,

del Purkinje, del Golgi ed i granuli (Fig.3.2). Lo strato più esterno o strato molecolare è costituito principalmente dagli assoni dei granuli, denominati fibre parallele, che decorrono parallelamente all'asse maggiore del folium. Contiene anche cellule stellate e a canestro, che sono interneuroni ed i dendriti dei neuroni del Purkinje dello strato sottostante.

Al di sotto dello strato molecolare è disposto lo strato delle cellule del Purkinje, costituito dai grandi corpi cellulari (50-80 μm) dei neuroni del Purkinje, che sono disposti l'uno accanto agli altri, formando uno strato omocellulare. Questi neuroni possiedono un considerevole albero dendritico che si estende fino allo strato molecolare ed è disposto in un solo piano perpendicolare all'asse principale del folium. I neuroni del Purkinje inviano i loro assoni alla sostanza bianca sottostante. Essi costituiscono l'unica uscita della corteccia cerebellare.

Lo strato interno o dei granuli contiene un elevato numero di piccoli neuroni densamente stipati, la maggior parte dei quali sono i granuli appunto. Il loro numero, all'incirca 10^{11} , è superiore a quello dei neuroni di tutta la corteccia cerebrale. Nella parte più esterna dello strato si trovano alcune cellule del Golgi. Lo strato dei granuli presenta piccoli spazi chiari detti glomeruli cerebellari, a livello dei quali le cellule di questo strato stabiliscono complessi rapporti sinaptici con le espansioni a forma di bulbo delle fibre afferenti (muscolari).

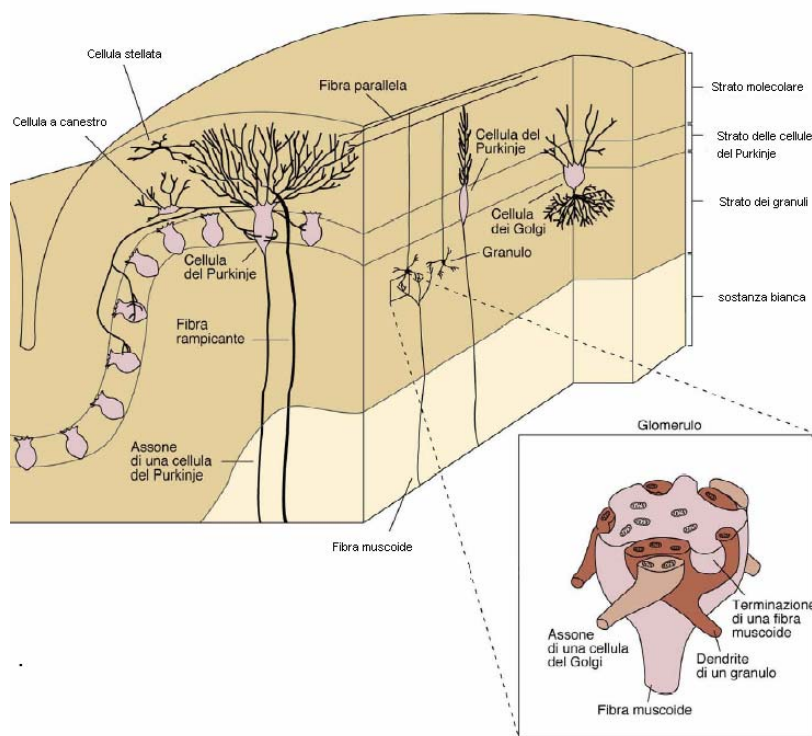


Fig.3.2 Rappresentazione degli strati della corteccia cerebellare

3.2 I granuli cerebellari

I Granuli cerebellari come è stato detto costituiscono il tipo cellulare maggiormente rappresentato nel cervelletto. Essi sono piccoli neuroni densamente stipati nello strato più interno della corteccia cerebellare.

Alcuni studi sui roditori hanno dimostrato che i precursori delle cellule granulari della corteccia cerebellare prendono origine dal rombencefalo, nel periodo postnatale attraverso un processo di migrazione tangenziale, questi vanno a ricoprire la zona superficiale del primordio del cervelletto formando la linea granulare esterna (EGL). A questo punto nella zona superiore dell'EGL, denominata zona proliferativa (PRZ), ha luogo un'intensa proliferazione dei granuli cerebellari. Dopo questa fase altamente mitotica, essi cominciano ad estendere i loro assoni nella regione inferiore della zona EGL, la cosiddetta zona premigratoria (PMZ). Quindi la zona EGL è costituita da due regioni ben distinte a cui corrispondono due differenti fasi dello

sviluppo dei granuli cerebellari: la fase proliferativa nella zona PRZ e la fase postmitotica nella zona PMZ (Altman, 1969;1972; Fujita et al. 1966). Successivamente, i granuli cerebellari si spostano dalla zona EGL alla linea interna (IGL) e qui raggiungono il loro completo differenziamento.

Queste cellule rappresentano un ottimo modello sperimentale in quanto è abbastanza semplice ricavarne delle colture primarie, mediante l'espanto del cervelletto da animali da laboratorio quali topi e ratti. Inoltre è stato dimostrato che la loro crescita e il loro sviluppo in vitro, mima molto bene i meccanismi di innervazione e formazione delle fibre glutamatergiche che si verificano normalmente durante lo sviluppo in vivo (Balazs et al.,1988; Gallo et al.,1987). Colture primarie di granuli cerebellari rappresentano anche un sistema cellulare omogeneo poiché contengono, virtualmente, una singola popolazione neuronale. Tale sistema è stato largamente impiegato sia per lo studio della sopravvivenza e del differenziamento neuronale che per misure di parametri farmacologici, elettrofisiologici e biochimici (Contestabile 2002).

Studi di espressione genica utilizzando i granuli cerebellari hanno permesso di comprendere molti importanti processi coinvolti nella proliferazione, nel differenziamento e nella migrazione cellulare (Savill et al 2005).

La maturazione e il differenziamento dei granuli cerebellari è promossa dall'attivazione dei recettori degli aminoacidi eccitatori (EAAs) come il glutammato (Hack e Balazs 1994), tuttavia un'eccessiva attivazione può compromettere la sopravvivenza stessa delle cellule, questo fenomeno denominato effetto eccitotossico è coinvolto in molte malattie neurodegenerative. I granuli cerebellari una volta messi in coltura hanno una vita breve, infatti col progredire della loro maturazione divengono via via sempre più vulnerabili all'azione del glutammato, e dopo otto giorni dall'espanto raggiungono la loro piena maturazione andando incontro a morte (Hack e Balazs 1994).

Questo fenomeno è dovuto all'incremento dell'espressione dei recettori del Glutammato che si verifica durante la maturazione e il differenziamento dei di questi neuroni, infatti una volta che le varie subunità dei recettori vengono sintetizzate, si vanno a localizzare sulla membrana plasmatica sinaptica espletando la loro funzione recettoriale.

RISULTATI

SCOPO DELLA RICERCA E STRATEGIA SPERIMENTALE

La mia tesi di dottorato ha avuto come obiettivo lo studio dell'effetto dei campi elettromagnetici a bassa frequenza (*Extremely Low Frequency*, ELF) su cellule del sistema nervoso centrale di ratto, in particolare granuli cerebellari espianati da ratti neonati. Queste cellule rappresentano la popolazione predominante a livello del cervelletto di ratto e le colture primarie di granuli cerebellari sono uno dei modelli sperimentali più diffusi per lo studio di numerosi parametri neuronali. Una vasta letteratura scientifica documenta l'impiego dei granuli cerebellari sia per lo studio di diversi aspetti dello sviluppo e delle funzioni che per l'analisi morfologica, biochimica e molecolare del sistema nervoso.

Il mio lavoro di dottorato si è articolata in due fasi:

Nella prima fase ho studiato gli effetti dell'esposizione a campi elettromagnetici a bassa frequenza (50 Hz, 1mT) su colture di granuli cerebellari prelevati da ratti all'ottavo giorno dalla nascita (P8).

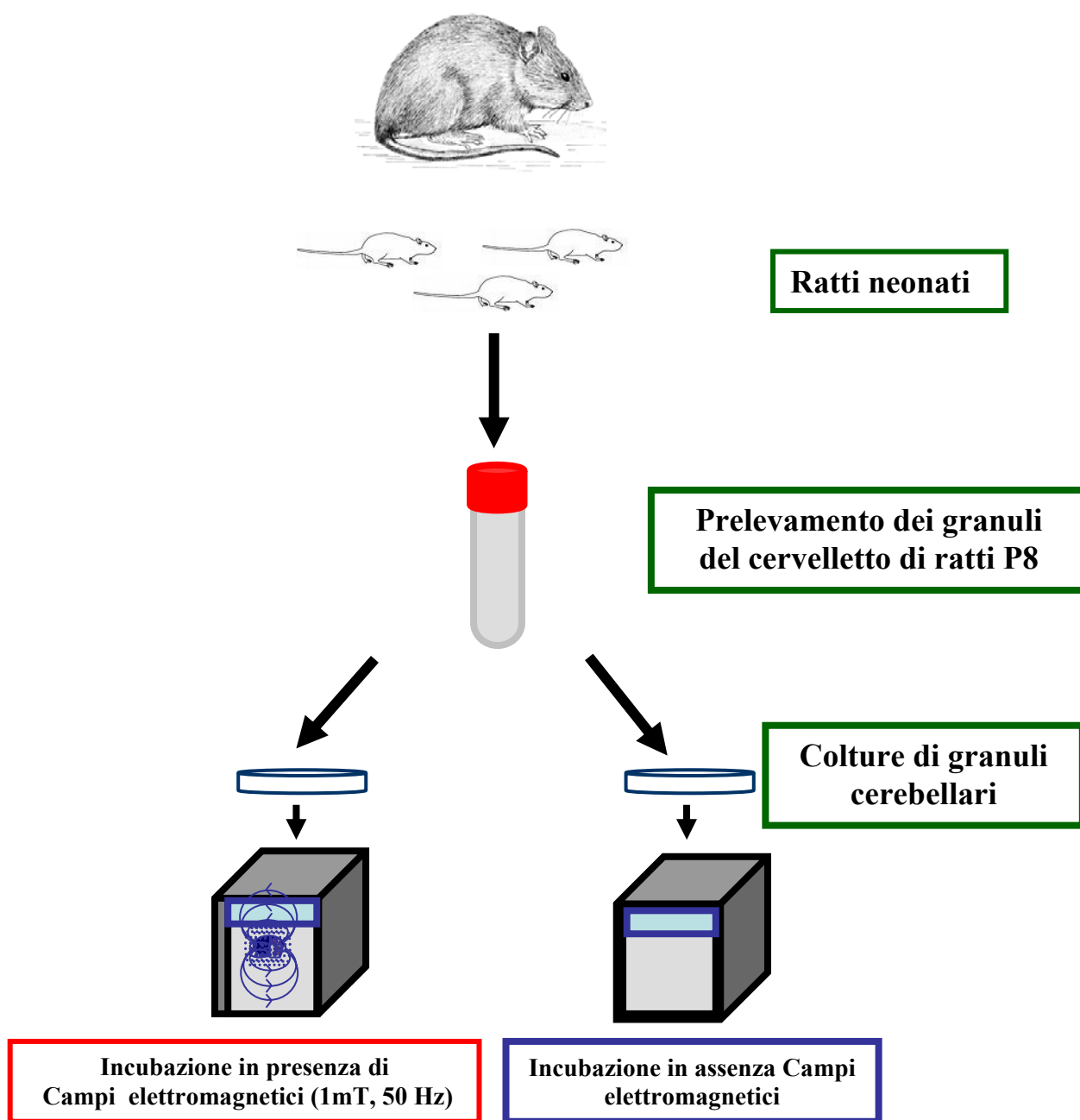
Nella seconda fase sono state esposte direttamente le ratte gravide per l'intera durata della gestazione (circa tre settimane) e i ratti neonati per un ulteriore periodo di otto giorni, a questo punto ho analizzato gli effetti di tale esposizione sui granuli cerebellari.

1. Studio in vitro: Effetto dell'esposizione a campi elettromagnetici ELF (*Extremely Low Frequency*) su colture primarie di granuli cerebellari prelevati da ratti neonati.

Lo studio in vitro è stato condotto, esponendo ai campi elettromagnetici ELF, colture primarie di granuli cerebellari ottenute dal cervelletto di ratti a otto giorni dalla nascita. Queste colture sono state mantenute in un incubatore per cellule, all'interno di un solenoide generante un campo elettromagnetico di frequenza 50 Hz

e intensità 1 mT , per un periodo che variava da tre giorni ad otto giorni. Durante questo intervallo di tempo ho eseguito una serie di esperimenti volti allo studio dell'eventuale maturazione e differenziamento indotti dai campi elettromagnetici ELF in queste cellule. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti confrontando granuli cerebellari esposti e non esposti.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE IN VITRO



1.1 Test di eccitotossicità da glutammato.

Nelle colture neuronali, trattate con il glutammato alle opportune concentrazioni, il 90%-95% dei neuroni maturi vanno incontro a morte causata dall'effetto eccitotossico dell'aminoacido. Infatti il glutammato attiva i canali ionotropici che aprendosi provocano una massiccia entrata di Ca^{2+} nella cellula con conseguenze tossiche per il neurone (Favaron et al, 1988; Choi, 1990, Schramm et al, 1990; Mercanti et al, 1992). Le colture di granuli cerebellari rispondono al test di eccitotossicità da glutammato solo all'ottavo giorno dall'espianto, quando tutte le subunità dei recettori per il neurotrasmettitore sono presenti sulla membrana plasmatica sinaptica; tale risposta è un indice dell'avvenuta maturazione neuronale.

Come mostrato in figura 1.1 dopo cinque giorni di esposizione ai campi elettromagnetici (1 mT, 50 Hz) i granuli cerebellari mostrano una differente risposta al test di eccitotossicità da acido glutammico rispetto alle cellule non esposte. In particolare nelle cellule esposte e trattate con il glutammato alla concentrazione 100 μM (Glu+Exp) è presente una mortalità maggiore del 30% rispetto alla mortalità fisiologica rilevata nei campioni non esposti trattate con la stessa concentrazione di glutammato(Glu). Questo aumento della mortalità riscontrato nelle cellule esposte, è inibito se le stesse sono trattate con 10 μM di dizocilpine maleato (MK-801), un antagonista dei canali NMDA del glutammato, durante i cinque giorni di esposizione.

La precoce risposta al test di eccitotossicità dei granuli cerebellari che ho riscontrato dopo cinque giorni di esposizione ai campi elettromagnetici ELF, mi ha fatto supporre una precoce comparsa dei recettori del glutammato sulla membrana sinaptica.

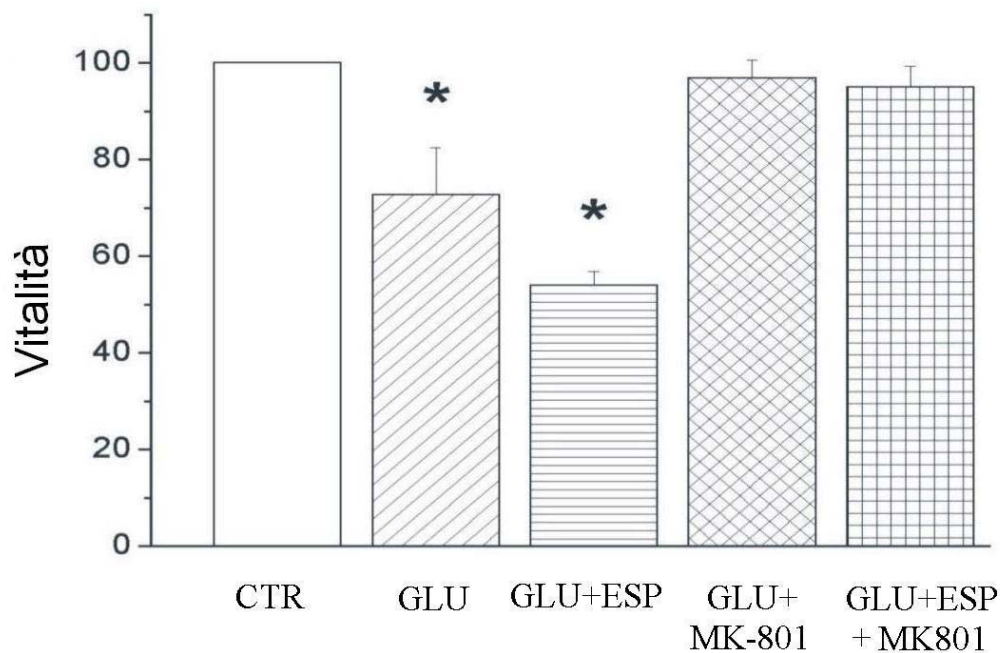


Fig. 1.1 Test di eccitossicità da glutammato su granuli del cervelletto di ratto neonato dopo cinque giorni di esposizione ai campi elettromagnetici ELF.

1.2 Analisi dei canali del glutammato, mediante la tecnica del *Patch clamp*

La tecnica del *patch-clamp* che permette lo studio delle correnti che passano attraverso i singoli canali ionici, consiste nel fare aderire la punta di una sottilissima pipetta di vetro ad una membrana cellulare; praticando poi una lieve aspirazione attraverso la pipetta è possibile ottenere una perfetta saldatura tra la micropipetta e la membrana in modo da isolare una piccola area della membrana stessa, in questo modo si può misurare la corrente attraverso i pochi canali contenuti nella zona selezionata (Fig 1.2).

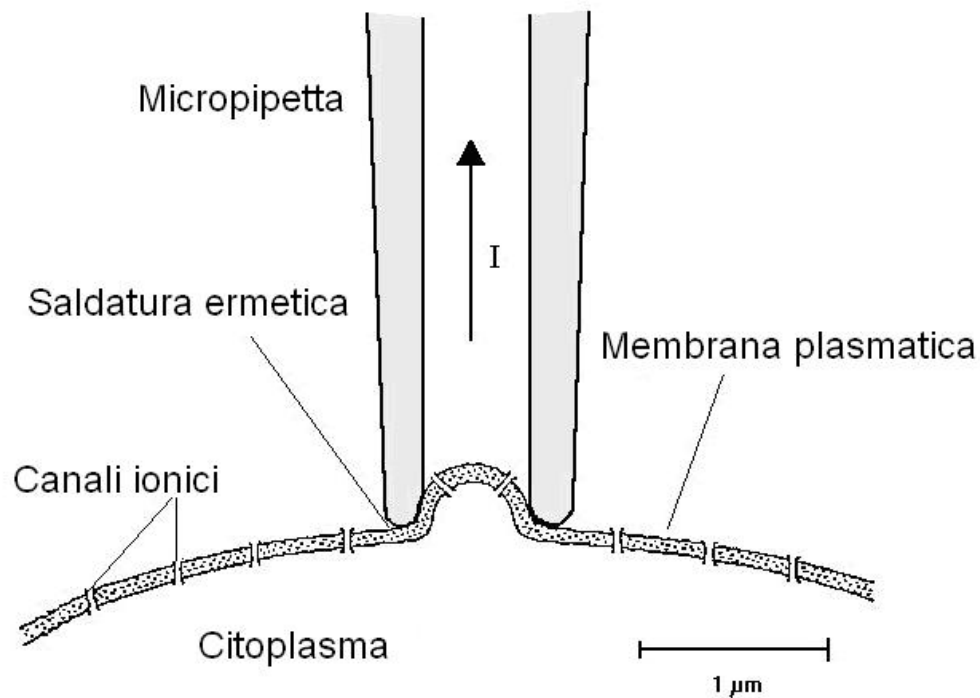


Fig. 1.2 Schema esplicativo della tecnica del *Patch clamp*.

Mediante la tecnica del *patch-clamp* è stato possibile misurare le correnti ioniche dei canali del KAINATO sia su cellule esposte ai campi magnetici ELF sia su cellule non esposte. Quando veniva somministrato ai granuli cerebellari 200 μM di kainato per 2-10 secondi, si aveva un induzione delle correnti in tutti i neuroni testati. Queste correnti si mantenevano in presenza dell'esposizione dell'agonista e raggiungevano uno livello di *plateau* per poi decadere una volta rimosso il kainato. Il passaggio di corrente attraverso la membrana veniva completamente bloccato da una soluzione di 10 μM di CNQX, un antagonista competitivo dei recettori non-NMDA, indicando che la somministrazione del kainato attivava specificatamente i recettori non-NMDA.

Come illustrato in figura 1.3 l'esposizione per sei giorni ad un campo elettromagnetico di 50 Hz e 1 mT induce un aumento delle correnti legate ai recettori del KAINATO significativamente più grande rispetto alle cellule non esposte. Questa differenza scompare a sette ed a otto giorni di esposizione, quando i granuli cerebellari raggiungono la loro maturazione fisiologica.

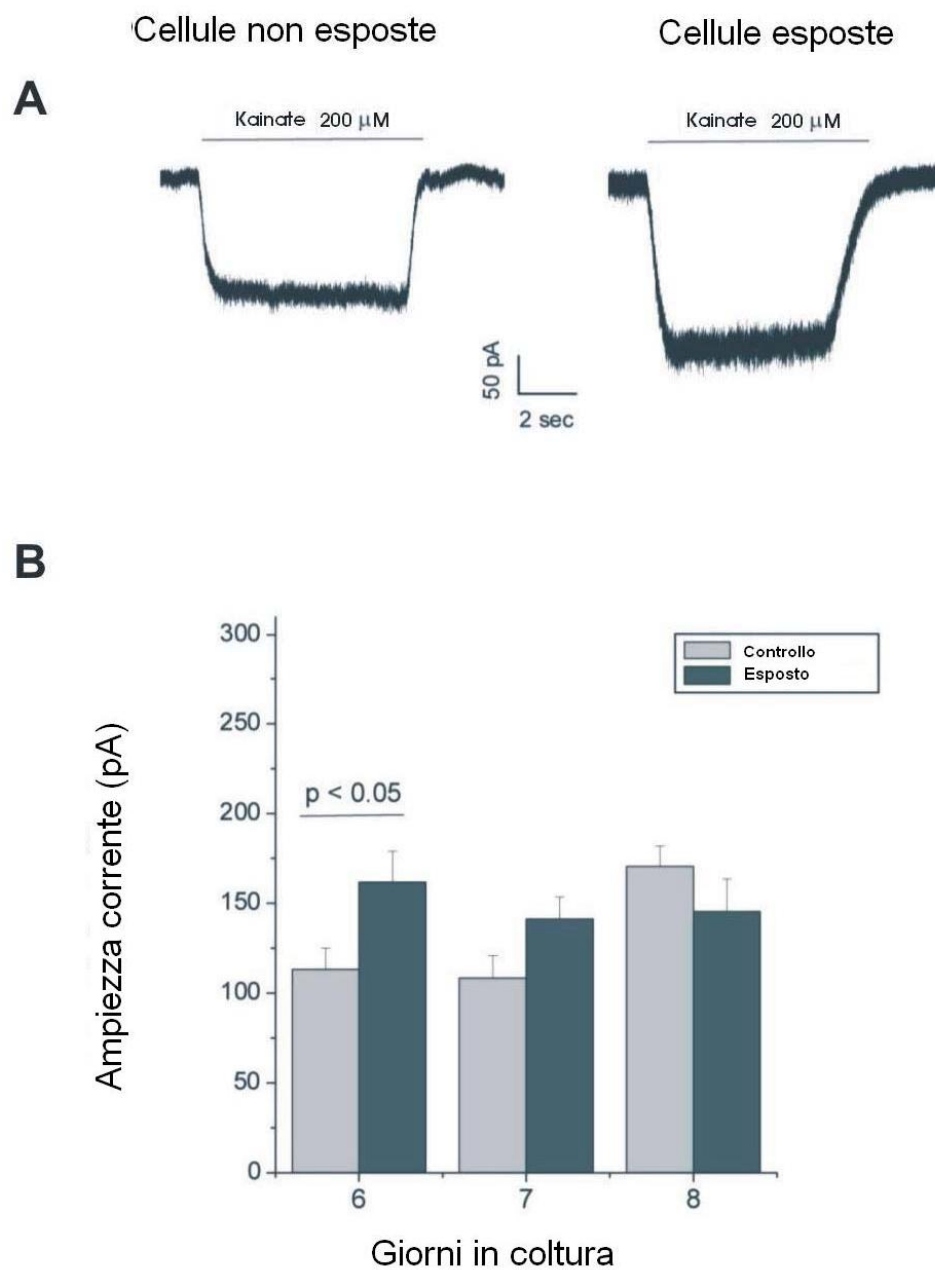


Fig.1.3 Analisi mediante *patch-clamp* delle correnti ioniche dei canali del kainato su granuli del cervelletto di ratto neonato dopo sei, sette e otto giorni di esposizione a campi elettromagnetici ELF.

1.3 Analisi dell'espressione dei recettori dell'acido glutammico

Mediante tecniche di RT-PCR e *Western Blotting* ho analizzato l'espressione dei recettori per l'acido glutammico sia a livello trascrizionale che traduzionale.

Come mostrato in figura 1.4 l'esposizione ai campi elettromagnetici delle colture di granuli cerebellari induce una precoce espressione delle diverse subunità dei recettori per l'acido glutammico. Infatti mentre nelle cellule non esposte è possibile mettere in evidenza una grande produzione di mRNA per queste subunità solo all'ottavo giorno dall'espianto, come risultato di una fisiologica maturazione, nelle cellule esposte si evidenzia la presenza di mRNA per le subunità NR1, GluR1, GluR2, GluR3 e GluR5 già a partire dal quarto giorno. L'mRNA del gene per la β -Actina e l'rRNA per il gene 18S sono costitutivamente espressi per tutti i tempi considerati e rappresentano quindi il mio controllo interno.

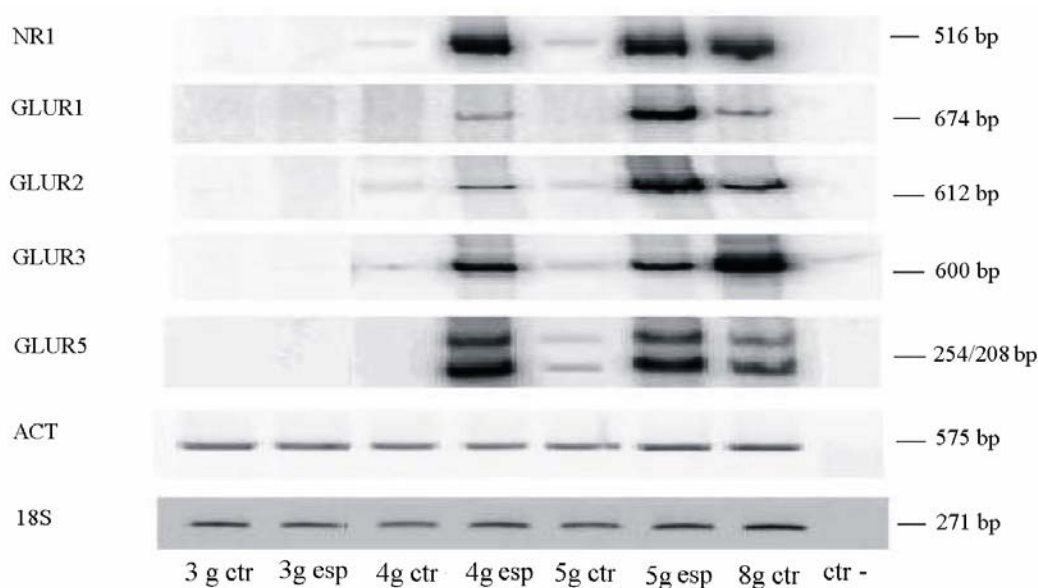


Fig.1.4 Analisi dell'espressione degli RNA messaggeri per le subunità dei recettori ionotropici del glutammato NR1, GluR1, GluR2, GluR3 e GluR5 mediante RT-PCR su granuli del cervelletto di ratto neonato, a vari giorni di maturazione.

Questi risultati sono stati poi confermati dall'analisi in *Western Blotting* per le stesse subunità recettoriali. In figura 1.5 si evidenzia infatti una precoce produzione delle proteine per le subunità NR1, GluR1, GluR2-3 e GluR5 dei recettori per il glutammato. Le cellule esposte ai campi ELF mostrano un incremento della presenza di proteine per queste subunità a partire dal quinto giorno di coltura, rispetto alle cellule di controllo. Le proteine estratte dalla linea cellulare PC12 sono state usate come controllo positivo.

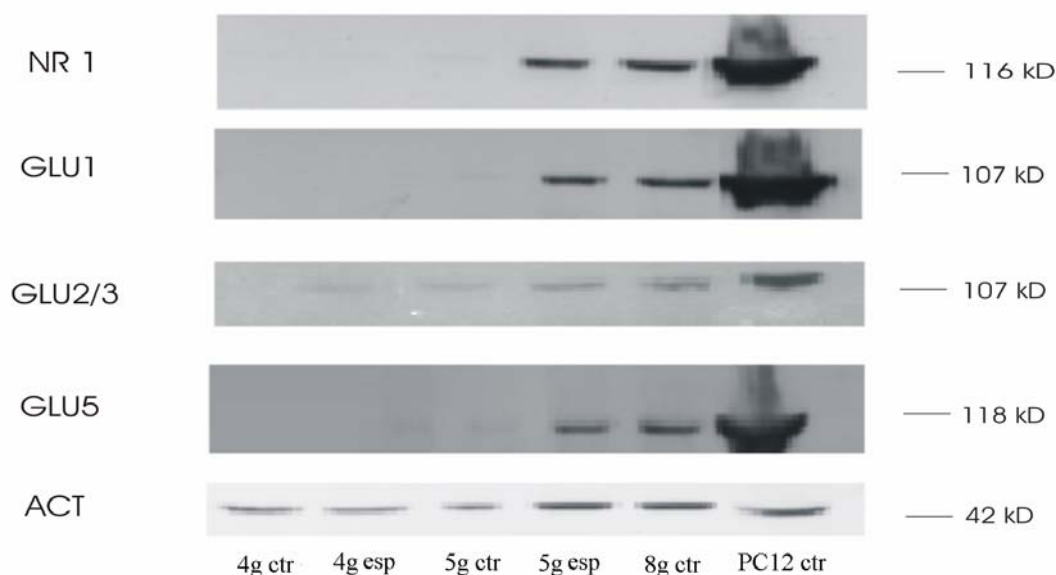


Fig 1.5 Analisi dell'espressione delle proteine per le subunità dei recettori ionotropici del glutammato NR1, GluR1, GluR2-3 e GluR5 mediante *Western Blotting* su granuli del cervelletto di ratto neonato a vari giorni di maturazione.

1.4 Analisi della distribuzione ed espressione dei neurofilamenti (NF200)

I neurofilamenti sono i filamenti intermedi della cellula neuronale. Sono disposti, rispetto all' assone, in fasci longitudinali di diametro medio di circa 10nm e uniti da legami crociati che conferiscono sostegno meccanico ed impediscono la rottura dell'assone stesso. Sono costituiti da lunghe proteine lineari a forma di bastoncino, suddivisibili in tre classi principali in base al loro peso molecolare, 68, 160 e 200 kDa.

Poiché i neurofilamenti rappresentano un indice del differenziamento neuronale, ho eseguito l'analisi dell'espressione dei neurofilamenti, in particolare degli NF200 (con peso molecolare di 200kD), mediante tecniche di immunofluorescenza indiretta e *Western Blotting*. La figura 1.6 mostra l'effetto dell'esposizione ai campi elettro-magnetici ELF, sulla distribuzione dei NF200 nei granuli cerebellari. Come si può notare dalla marcatura con l'anticorpo Anti-NF200, nelle cellule esposte per cinque giorni i neurofilamenti formano una rete molto più estesa rispetto alle cellule non esposte, inoltre sempre nelle cellule esposte si evidenzia un incremento della percentuale di cellule positive alla marcatura che risulta simile alle cellule pienamente mature, in coltura da otto giorni (controllo positivo).

L'analisi in *Western Blotting* conferma gli stessi risultati, infatti la proteina NF200 risulta maggiormente espressa nelle cellule esposte sia per quattro che per cinque giorni rispetto alle stesse non esposte.

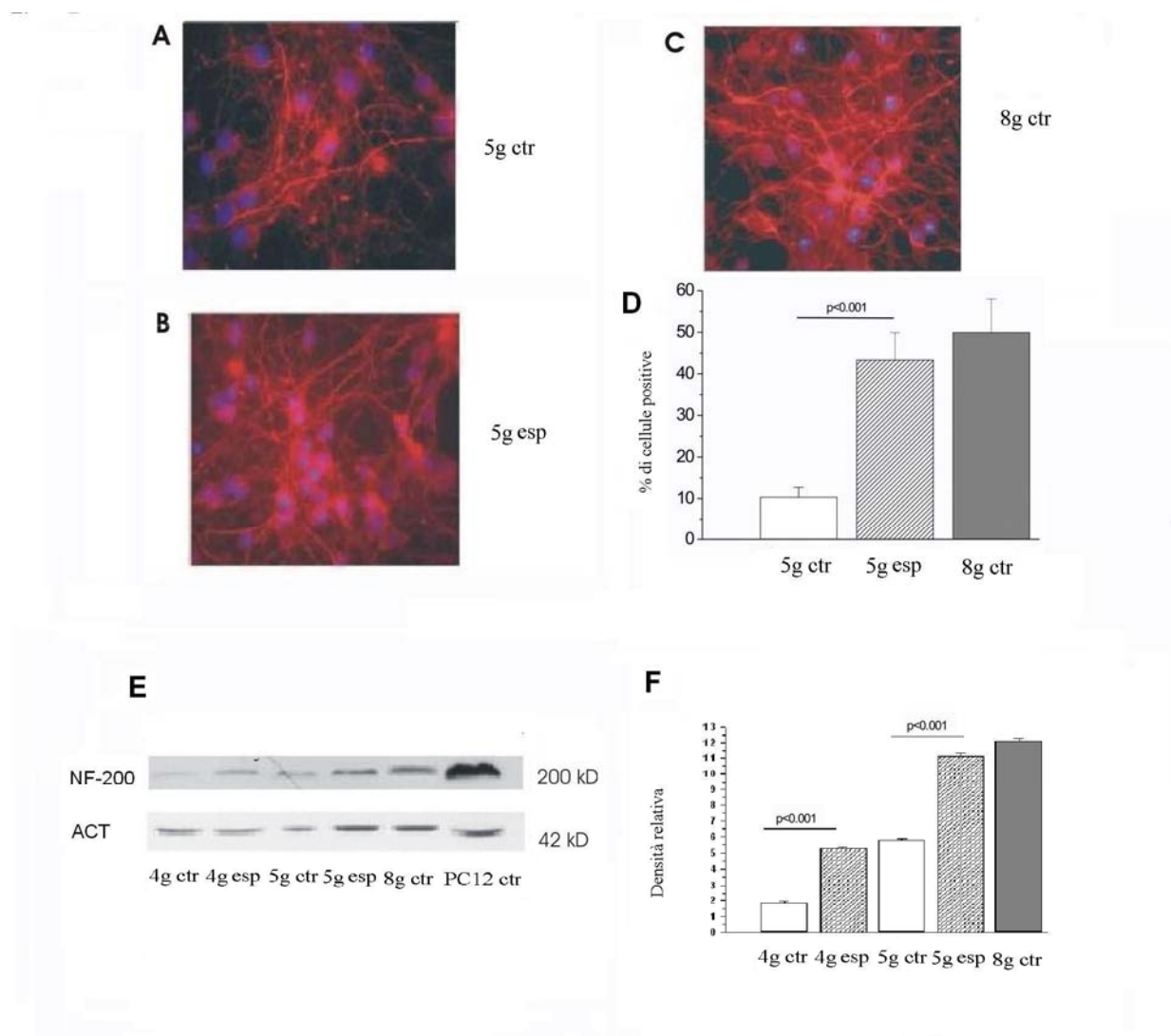
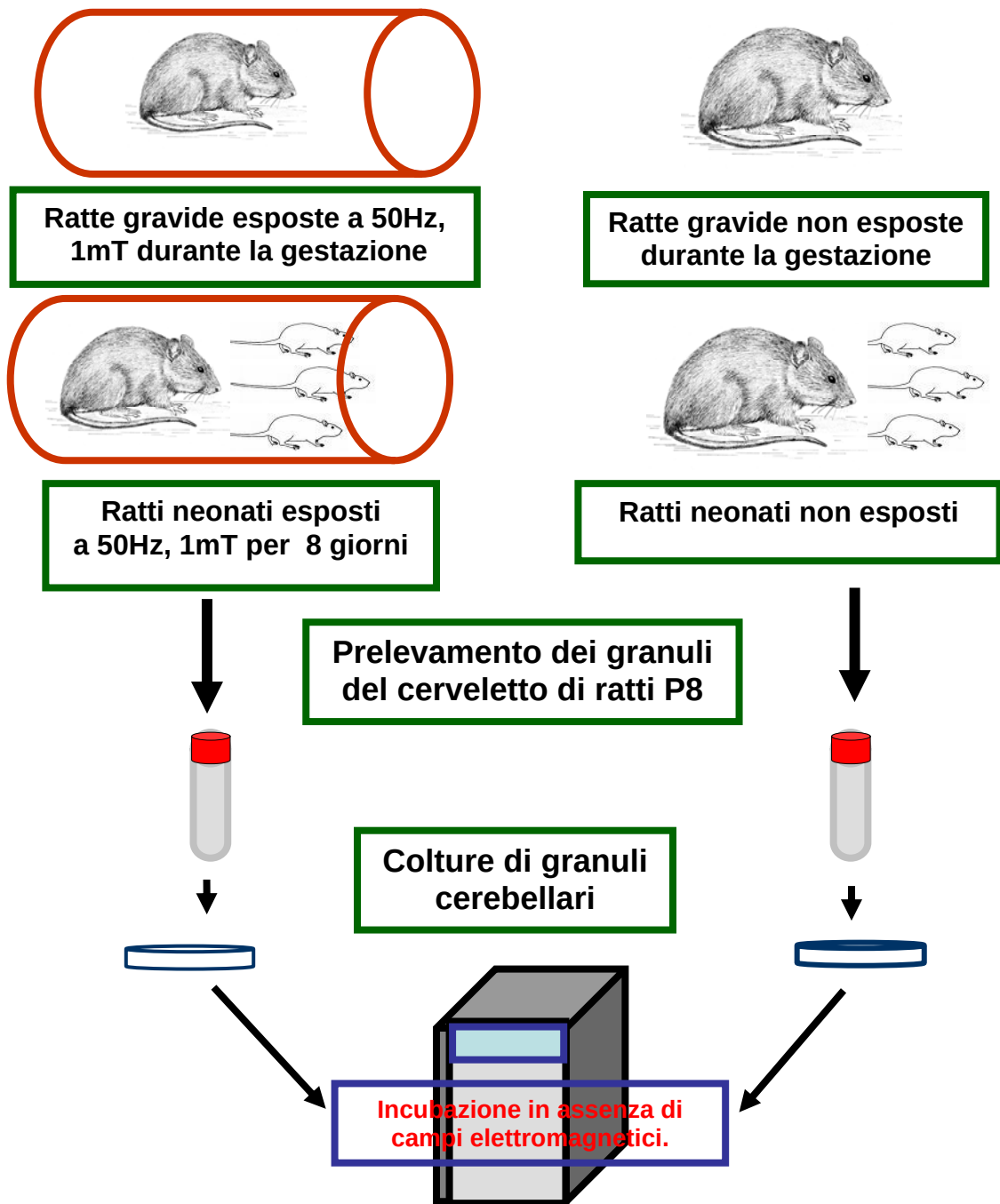


Fig.1.6 Analisi della distribuzione della rete di neurofilamenti mediante immunofluorescenza indiretta (A-D) e analisi dell'espressione della proteina NF200, mediante *Western Blotting* (E-F), su granuli del cervelletto di ratto neonato a vari giorni di maturazione.

2. Studio in vivo: effetto dell'esposizione a campi elettromagnetici ELF (*Extremely Low Frequency*) su ratti neonati

Lo studio in vivo è stato condotto esponendo le ratte gravide ai campi ELF per l'intera durata della gestazione (circa tre settimane). I ratti neonati sono stati esposti per un ulteriore periodo di otto giorni ai suddetti campi, al termine del quale è stato prelevato loro il cervelletto e sono state allestite le colture primarie di granuli cerebellari. Queste colture sono state mantenute in un incubatore per cellule per un periodo che variava da quattro ore ad otto giorni. Durante questo intervallo di tempo ho eseguito su queste cellule una serie di esperimenti allo scopo di studiare il loro grado di maturazione e di differenziamento per mettere in evidenza gli eventuali effetti dell'esposizione ai campi elettromagnetici ELF durante embriogenesi e nei primissimi giorni dopo la nascita. I risultati ottenuti sono stati confrontati con esperimenti eseguiti in parallelo, utilizzando granuli cerebellari prelevati da ratti non esposti.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE IN VIVO



2.1 Test di eccitotossicità da glutammato

Gli esperimenti in vitro, illustrati precedentemente, hanno evidenziato una risposta precoce dei granuli cerebellare esposti ai campi ELF al test di eccitotossicità da glutammato, infatti dopo cinque giorni di esposizione la risposta al test di eccitotossicità è maggiore del 30% rispetto a quella rilevata nei campioni di controllo.

Gli esperimenti in vivo mostrano un effetto simile. Infatti come illustrato in figura 2.1, colture di granuli cerebellari prelevati da ratti che sono stati esposti ai campi elettromagnetici ELF durante la loro embriogenesi e nei successivi otto giorni dopo la nascita, mostrano una differente risposta al test di eccitotossicità da acido glutammico rispetto ai controlli (cellule prelevate da ratti non esposti). In particolare nelle cellule prelevate da ratti esposti e trattate con una concentrazione di glutammato 100 μ M (exp+glu) è presente già a partire dal secondo giorno dall'espianto una mortalità maggiore rispetto a quella rilevata nei campioni non esposti trattati con la stessa concentrazione di glutammato(Glu). Questo differenza aumenta nei successivi giorni di coltura. Come si può notare la diminuzione della vitalità dopo l'aggiunta del glutammato è riscontrabile sia nei campioni di controllo che in quelli esposti, ma in questi ultimi tale diminuzione è notevolmente più marcata, indicando una maggiore attività dei recettori del glutammato.

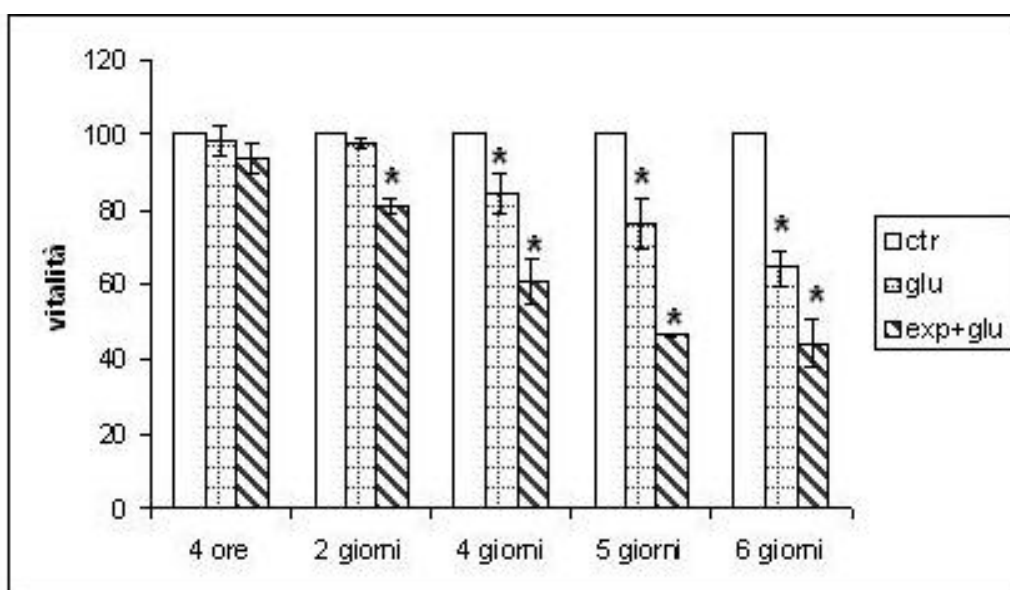


Fig. 2.1 Test di eccitossicità da glutammato su colture di granuli del cervelletto prelevati da ratti neonati esposti a radiazioni non ionizzanti ELF, durante la loro embriogenesi e nei primi otto giorni dopo la nascita .

2.2 Analisi dei canali del glutammato, mediante la tecnica del *Patch clamp*

Gli esperimenti in vitro sono stati eseguiti esponendo colture primarie di granuli cerebellari, a radiazioni non ionizzanti (50 Hz, 1 mT) e come è stato detto in precedenza, l'analisi mediante la tecnica del *patch-clamp* ha prodotto dei risultati che evidenziano un incremento delle correnti nelle cellule esposte rispetto a quelle di controllo.

Ho eseguito la stessa analisi per gli esperimenti condotti in vivo e i risultati ottenuti, illustrati in figura 2.2, mostrano un aumento significativo delle correnti ioniche dei canali del kainato, prodotte da granuli cerebellari prelevati da ratti che sono stati esposti durante la loro embriogenesi e nei successivi sette giorni dopo la nascita, rispetto alle cellule di controllo. In particolare questo incremento in corrente rilevato mediante il *patch-clamp* si registra a partire dal terzo giorno di coltura dopo

l'espianto, si mantiene al quarto giorno e scompare nei successivi giorni quando i granuli del cervelletto cominciano a raggiungere la loro piena maturazione.

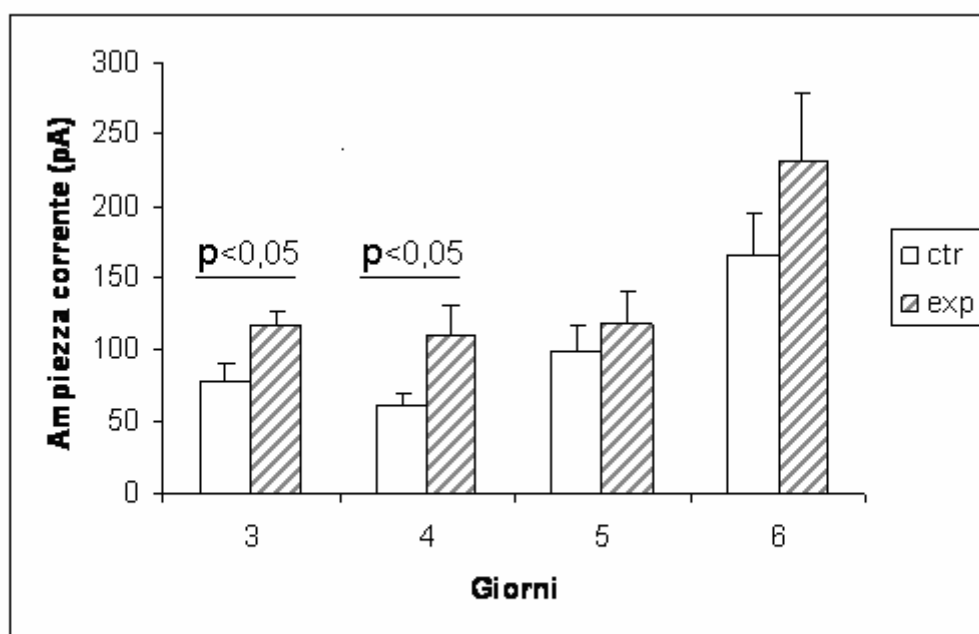


Fig 2.2 Analisi mediante *patch-clamp* delle correnti ioniche dei canali del kainato su colture di granuli del cervelletto prelevati da ratti neonati esposti ai campi elettromagnetici ELF, durante la loro embriogenesi e nei primi otto giorni dopo la nascita .

2.3 Analisi dell'espressione dell'mRNA delle subunità NR2B e NR2C del recettore del glutammato NMDA

Come detto nell'introduzione lo stadio di differenziamento del neurone influenza notevolmente i meccanismi che regolano l'espressione genica dei recettori del glutammato. In particolare durante il differenziamento dei granuli cerebellari, nei primi giorni subito dopo la nascita, i recettori NMDA cambiano nella loro composizione, infatti l'espressione della subunità NR2B diminuisce mentre aumenta

quella della subunità NR2C (Watanabe et al, 1994; Farrant et al, 1994; Monyer et al, 1994).

Poiché negli studi in vivo, i ratti neonati sono stati esposti ai campi elettromagnetici ELF nei primi otto giorni dalla nascita, ho ritenuto interessante studiare l'espressione delle due subunità NR2B e NR2C mediante un'analisi in Real Time RT-PCR, questa tecnica essendo estremamente quantitativa, permette di evidenziare cambiamenti anche piccoli di espressione dell'mRNA di una cellula.

In figura 2.3 è riportato il grafico che mostra l'andamento della sintesi del mRNA di NR2B e NR2C rispetto al primo giorno di coltura, in granuli cerebellari prelevati da ratti neonati non esposti ai campi elettromagnetici. Come si può notare l'espressione del RNA messaggero delle due subunità del recettore NMDA mima perfettamente quello che si verifica normalmente durante lo sviluppo in vivo. Infatti la subunità NR2B aumenta nei primi giorni di coltura e diminuisce negli ultimi; viceversa la subunità NR2C diminuisce nei primi giorni e aumenta negli ultimi, quando cioè i granuli del cervelletto sono in via di definitiva maturazione.

Questa analisi mi ha permesso di verificare e confermare che nelle colture di granuli cerebellari prelevate da ratti neonati si verificano, nei primi giorni dall'espanto, alcuni meccanismi molecolari che si hanno durante il normale differenziamento dei granuli di cervelletto in vivo.

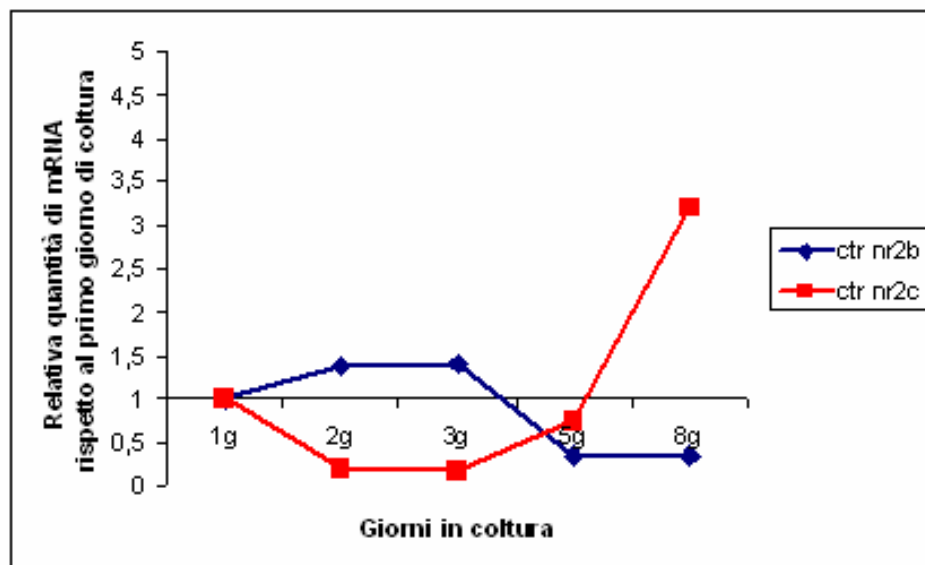


Fig 2.3 Andamento della sintesi dell'mRNA di NR2B e NR2C rispetto al primo giorno di coltura di granuli cerebellari prelevati da ratti neonati non esposti ai campi elettromagnetici.

A questo punto ho analizzato le possibili differenze di espressione del mRNA delle due subunità NR2B e NR2C nelle colture di granuli cerebellari prelevati da ratti che erano stati esposti ai campi elettromagnetici ELF durante la loro embriogenesi e nei successivi otto giorni dopo la nascita, rispetto alle cellule di controllo.

Come mostrato in figura 2.4, per quanto riguarda l'mRNA della subunità NR2B ho messo in evidenza un incremento, rispetto al controllo, nei primi due giorni dall'espianto e un decremento dal terzo giorno in poi, che risulta massimo ad otto giorni di coltura. L'mRNA della subunità NR2C mostra invece un incremento per tutti i giorni di coltura analizzati anche se tale incremento risulta più evidente ad otto giorni dall'espianto.

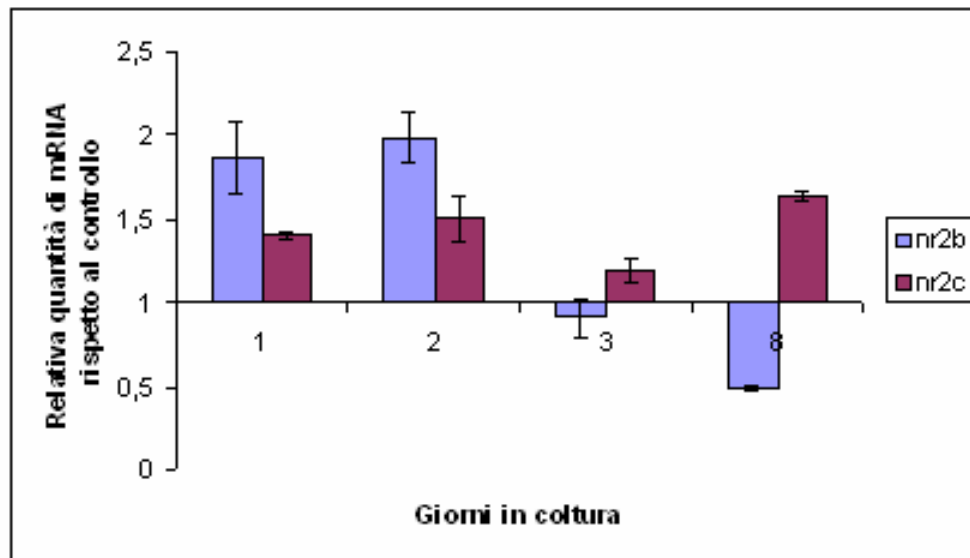


Fig 2.4 Analisi, mediante Real Time RT-PCR, dell'espressione del mRNA delle due subunità NR2B e NR2C su colture di granuli cerebellari prelevati da ratti neonati esposti ai campi elettromagnetici ELF, durante la loro embriogenesi e nei primi otto giorni dopo la nascita.

DISCUSSIONE

Gli avanzamenti tecnologici dell'ultimo secolo hanno determinato un uso diffuso dell'energia elettrica, la quale causa inevitabilmente la generazione di campi elettrici e magnetici. L'interesse nell'investigazione degli effetti dei campi ELF (*extremely low frequency*) sui sistemi biologici è andato crescendo negli ultimi 20 anni dato l'aumento dell'esposizione a queste radiazioni.

Sono state proposte alcune teorie per spiegare l'effetto dei campi ELF sul materiale biologico, ma il meccanismo d'azione non è stato ancora compreso.

Da un punto di vista sperimentale si è visto che campi ELF anche di debole intensità possono, su alcuni modelli sperimentali, agire sull'omeostasi del calcio. Un tale fenomeno seppur verificato in diversi laboratori non trova ancora una giustificazione teorica in quanto l'energia che tali campi ELF trasferiscono allo ione è di diversi ordini di grandezza inferiore all'energia termica del sistema. Nel 1985 Liboff e Blackman elaborarono la teoria fisicamente accettata per cui un campo statico in combinazione con un campo dinamico anche se di debole intensità (alla risonanza di ciclotrone di ioni o molecole di interesse biologico) avrebbero fornito al sistema biologico energia sufficiente a modificarne alcuni parametri biologici. Successivamente Zhadin dimostrò come tale effetto possa essere verificato in pratica su ioni in soluzione.

Alcuni studi, inoltre hanno dimostrato che i campi elettromagnetici a bassa frequenza a 50-60 Hz sono in grado di stimolare la rigenerazione dei nervi (Rusovan et al., 1992), alterare la trascrizione di alcuni mRNA (Phillips et al., 1992) e possono anche svolgere un ruolo sinergico nei processi cellulari già avviati, come per esempio la proliferazione cellulare (Walleczek et al., 1992; Manni et al., 2002).

Alcuni tipi di radiazioni non ionizzanti vengono ampiamente utilizzati a scopo terapeutico, per esempio è stata dimostrata l'efficacia dei campi magneti pulsati nello stimolare il rinsaldamento di fratture ossee. Questo conferma che in determinate condizioni i campi elettromagnetici a bassa frequenza possono influenzare i processi fisiologici (Basset, 1993).

Il lavoro che ho svolto nel corso del mio dottorato di ricerca ha avuto come oggetto lo studio dell'interazioni fra le radiazioni elettromagnetiche (1mT, 50Hz) ed i granuli del cervelletto di ratto neonato. Questo modello cellulare viene ampiamente utilizzato, sia per lo studio delle proprietà chimiche ed elettriche dei neuroni, sia per

capire i meccanismi di maturazione neuronali. Una caratteristica peculiare di questo modello è che i meccanismi di differenziamento in vitro sono paragonabile a quelli in vivo (Zona et al., 1993). La maturazione del cervelletto inoltre dipende da una precisa sequenza di eventi (Komuro e Rakic, 1993; Vignes e collingridge, 1997), molti dei quali sono mediati dai recettori del glutammato, la cui espressione è strettamente regolata durante le varie fasi dello sviluppo del cervelletto (Ripellino et al., 1998; Komuro e Rakic, 1993).

Questo studio è stato condotto in due fasi. In un primo momento ho analizzato l'effetto delle radiazioni non ionizzanti (1mT, 50Hz) su cellule prelevate dal cervelletto e messe in coltura, nella seconda fase dello studio sono state esposte direttamente le ratte gravide per l'intera durata della gestazione e successivamente sono stati esposti anche i ratti neonati per i primi otto giorni di vita.

Studi in vitro

Per lo studio in vitro ho utilizzato una serie di tecniche che mi hanno consentito di verificare il livello di espressione dei recettori del glutammato da vari punti di vista sperimentali.

L'analisi della vitalità neuronale, eseguita mediante un test di eccitossicità da glutammato, ha messo in evidenza un aumento della mortalità del 30% nelle cellule esposte per cinque giorni ai campi elettromagnetici (50Hz, 1mT), rispetto alle cellule di controllo. Questa differenza viene completamente annullata dal trattamento con un antagonista dei recettori NMDA (Fig 1.1), indicando che l'effetto evidenziato sulla vitalità neuronale va attribuito ad un meccanismo che coinvolge specificatamente questo tipo di recettori del glutammato.

La tecnica del *patch-clamp* ha confermato che l'attività dei canali del glutammato viene fortemente influenzata dall'esposizione dei granuli cerebellari alle radiazioni non ionizzanti. Infatti, mediante questo approccio sperimentale, è stato evidenziato che le cellule esposte per sei giorni ai campi ELF, presentano un significativo incremento delle correnti indotte dal Kainato rispetto alle cellule non esposte. Questa differenza nell'ampiezza delle correnti si mantiene anche al settimo

giorno di coltura, ma scompare all'ottavo, quando i granuli cerebellari raggiungono la loro piena maturazione (Fig.1.3).

Il test di eccitotossicità e il Patch clamp hanno quindi mostrato una maggiore attività dei recettori del glutammato nelle cellule esposte ai campi elettro-magnetici ELF, rispetto ai controlli; questo mi ha fatto ipotizzare una precoce comparsa dei recettori del glutammato sulla membrana sinaptica.

Per verificare tale ipotesi ho eseguito degli esperimenti di biologia molecolare allo scopo di studiare l'espressione delle subunità dei recettori ionotropici del glutammato. In particolare ho condotto un'analisi in RT-PCR e in *Western Blotting* che mi ha permesso di rilevare i livelli di mRNA e di proteine delle subunità recettoriali NR1, GLUR1, GLUR2, GLUR3 e GLUR5. Tali esperimenti hanno evidenziato nelle cellule esposte alle radiazioni non ionizzanti, una precoce espressione di queste subunità rispetto alle cellule di controllo. Infatti è noto che i granuli cerebellari presentano la loro massima espressione dei recettori iGLURs dopo otto giorni di coltura (Janssen et al., 2001), nelle cellule esposte invece già a partire dal terzo giorno si evidenzia la presenza degli mRNAs e al quarto giorno delle proteine per le subunità analizzate (Fig.1.4 e 1.5).

Come detto in precedenza è noto che durante la maturazione e il differenziamento dei granuli cerebellari si verifica un incremento della sintesi dei recettori del Glutammato. La precoce espressione delle subunità dei canali del glutammato, che si ottiene in seguito all'esposizione di questi neuroni alle radiazioni elettromagnetiche, indica quindi che questo agente fisico è in grado di stimolare la loro maturazione e il loro differenziamento.

Per confermare questi risultati, è stata analizzata l'espressione di un altro importante marcatore neuronale, la proteina NF-200, che fa parte della famiglia dei neurofilamenti, i filamenti intermedi della cellula neuronale. Esperimenti di immunofluorescenza indiretta su cellule esposte per cinque giorni ai campi ELF, hanno evidenziato un incremento della percentuale di cellule positive alla marcatura con un anticorpo anti-NF-200 che risulta simile alle cellule pienamente mature, in coltura da otto giorni (controllo positivo). L'analisi in *Western Blotting* conferma gli stessi risultati, infatti la proteina NF200 risulta maggiormente espressa nelle cellule esposte per quattro e cinque giorni rispetto alle cellule non esposte (Fig.1.6).

Tutti questi risultati, ottenuti mediante l'utilizzo di metodiche diverse, indicano che i campi elettromagnetici (50Hz, 1mT) sono in grado di indurre una precoce maturazione dei granuli di cervelletto di ratto neonato, attivando l'espressione di importanti marcatori neuronali, quali i recettori del glutammato e i neurofilamenti.

Studi in vivo

Il cervelletto è un organo notevolmente complesso che continua a subire cambiamenti strutturali anche nel periodo postnatale. Come illustrato precedentemente, tali modificazioni coinvolgono soprattutto i granuli cerebellari, che rappresentano anche la popolazione cellulare più rappresentativa di questa parte del cervello.

Alla luce dei risultati ottenuti nello studio in vitro, che hanno messo chiaramente in evidenza un effetto delle radiazioni non ionizzanti sul livello di maturazione dei granuli cerebellari, ho ritenuto interessante studiare la possibile influenza di questo agente fisico sulla maturazione e il differenziamento del cervelletto di ratto neonato nei primissimi giorni di vita dell'animale.

Per tale scopo sono state esposte delle ratte gravide durante l'intero periodo gestazionale e i ratti neonati per ulteriori otto giorni dopo la nascita. Dopo di che sono stati prelevati i granuli cerebellari e una volta messi in coltura ho condotto una serie di esperimenti confrontato il comportamento delle cellule prelevate dai ratti esposti con quelle prelevate da ratti non esposti.

Come per gli esperimenti in vitro ho eseguito l'analisi della vitalità neuronale, mediante un test di eccitossicità da glutammato, che ha messo in evidenza nelle cellule prelevate da ratti esposti e trattate con una concentrazione di glutammato 100 μ M, un aumento della mortalità rispetto a quella rilevata nei campioni di controllo già a partire dal secondo giorno dall'espanto (Fig.2.1).

Anche l'analisi mediante la tecnica del patch-clamp ha confermato i risultati ottenuti in vitro, infatti granuli cerebellari prelevati da ratti esposti ai campi elettromagnetici ELF mostrano un aumento significativo delle correnti ioniche dei canali del kainato, rispetto alle cellule di controllo. In particolare questo incremento

in corrente si registra a partire dal terzo giorno di coltura dopo l'espianto, si mantiene al quarto giorno e scompare nei successivi giorni, quando i granuli del cervelletto cominciano a raggiungere la loro piena maturazione (Fig.2.2).

Questi risultati preliminari mostravano un evidente effetto sul funzionamento dei recettori del glutammato nei granuli cerebellari prelevati da ratti esposti. Anche in questo caso come per gli studi in vitro, ho ipotizzato che i risultati riscontrati mediante il test di eccitossicità e l'analisi per *patch-clamp* fossero direttamente correlati ad un effetto dei campi elettromagnetici sulla maturazione neuronale.

Per verificare questa ipotesi ho analizzato i livelli di espressione di due particolari subunità del recettore NMDA, le subunità NR2B e NR2C. L'analisi dell'espressione di queste due subunità è particolarmente indicata per valutare lo stadio di differenziamento dei granuli cerebellari, in quanto, come detto in precedenza, durante il differenziamento di questi neuroni, nel periodo postnatale, i recettori NMDA cambiano la loro composizione; infatti l'espressione della subunità NR2B diminuisce mentre aumenta quella della subunità NR2C (Watanabe et al, 1994; Farrant et al, 1994; Monyer et al, 1994). Tale andamento è stato confermato nei miei esperimenti di Real Time RT-PCR su cellule prelevate da ratti non esposti, come mostrato in figura 2.3. A questo punto ho eseguito ulteriori esperimenti in Real Time RT-PCR che hanno mostrato un incremento del mRNA della subunità NR2B, nelle cellule prelevate da ratti esposti, rispetto ai controlli; questo andamento si osserva nei primi due giorni dall'espianto. Dal terzo giorno in poi si ha un decremento, che risulta massimo ad otto giorni di coltura. L'mRNA della subunità NR2C mostra invece un incremento per tutti i giorni di coltura analizzati anche se tale incremento risulta più evidente ad otto giorni dall'espianto.

Quindi nei granuli cerebellari prelevati da ratti esposti l'andamento dell'espressione delle due subunità NR2B e NR2C cambia significativamente rispetto alle cellule di controllo ed in particolare risulta maggiormente marcato il passaggio dall'espressione di NR2B a quella di NR2C.

Questi risultati confermano la capacità dei campi elettromagnetici (50Hz, 1mT) di stimolare il differenziamento dei granuli cerebellari.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti durante il mio dottorato di ricerca e illustrati in questa tesi, evidenziano un chiaro effetto dei campi elettro-magnetici di frequenza 50Hz ed intensità 1 mT, sulla maturazione e il differenziamento dei granuli cerebellari di ratto neonato in esperimenti condotti sia in vitro, che in vivo. In particolare tale agente fisico è risultato capace di indurre una precoce maturazione di questo tipo di neuroni.

Il meccanismo di interazione tra i campi elettro-magnetici ELF e i granuli cerebellari non è ancora noto. Nel nostro laboratorio sono attualmente in corso degli esperimenti che hanno proprio lo scopo di comprendere, sia a livello biochimico che molecolare, le dinamiche del processo di induzione del differenziamento neuronale, osservato nei campioni esposti.

I risultati illustrati aprono la possibilità di utilizzare i campi elettro-magnetici a bassa frequenza, per la loro capacità differenziativa, nel trattamento di alcune patologie neuronali, in particolare quelle in cui si verifica una perdita massiccia di neuroni. Prima di definire un possibile protocollo terapeutico, sono necessarie tuttavia ulteriori indagini sperimentali, anche su altri modelli neuronali, quali per esempio le cellule staminali murine.

MATERIALI E METODI

MATERIALI

COLTURE PRIMARIE DI GRANULI CEREBELLARI

<u>Origine</u>	<u>Descrizione</u>
Rattus norvegicus	Colture primarie ottenute dalla dissociazione del cervelletto di ratti (Wistar) otto giorni dopo la nascita. Secondo la procedura descritta da Levi et al.(1984).

TERRENO DI CULTURA

BME	(Gibco)
FCS 10%	(Gibco)
L-glutammina 2 mM	(Gibco)
Gentamicina 100µg/ml	(Gibco)
KCl 2mM	(Sigma)

TAMPONI E SOLUZIONI

Test di eccitossicità

Soluzione di Locke

154 mM NaCl, 5.6 mM KCL, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5.6 mM glucoso, 10 mM HEPES, pH 7.4

Soluzione di lisi

0.5% ethylhexadecyldimethylammonio bromide, 0.28% acido acetico, 0.5% Triton X-100, 3mM NaCl, 2mM MgCl₂, in PBS pH 7.4 diluito 1/10

Patch clamp

Soluzioni di riempimento degli elettrodi

140mM CsCl, 1mM EGTA, 10mM HEPES, 6mM D-glucose, pH 7.3.

Soluzione sperimentale

130mM NaCl, 3mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 10mM TEA, 6mM D-glucosio, 10mM HEPES, pH 7.3

Elettroforesi gel di Agarosio

Gel di Agarosio

TBE 0.5X (Invitrogen.)

Agarosio (Invitrogen)

H₂O distillata

La quantità di Agarosio da utilizzare varia in relazione alla concentrazione che si vuole ottenere. Solitamente sono stati preparati gel 1%: 1gr in 100ml TBE 0.5%.

<u>Bromuro d'Etidio</u> (Sigma.)		10mg/ml
<u>Colorante per DNA</u> (6X)	Blu di Bromofenolo (Biorad)	0,25%
	Xylene Cianolo (Kodak)	0,25%
	Glicerolo (Sigma)	30%
	H ₂ O distillata	(a volume)

Estrazione RNA

Trizol Reagent (Invitrogen)	1ml per 5X10 ⁶ cellule.
Cloroformio (Merck)	0,2 ml per 1ml di Trizol.
Isopropanolo (MP Biomedicals)	0,5 ml per 1ml di Trizol.
Etanolo 75% in H ₂ O distillata (Merck)	1 ml per 1ml di Trizol.

Estrazione proteica

Soluzione di lisi

(100µl 1ml per 5X10⁶ cellule).

Tris/HCl (BRL.) pH 8	50mM
NaCl (Merck)	150mM
EDTA (Sigma)	0.5 mM
EGTA (Sigma)	0.1 % mM
Glicerolo(Merck)	10 %
NP-40 (Sigma)	1%
PMSF: <i>Phenylmethyllsulfonyl fluoride</i>	1%

Western Blotting

Gel Poliacrilamide in SDS

Resolving gel

H₂O distillata
30% Acrilammide mix (29:1) (Biorad)
1.5M Tris (pH 8.8) (BRL)
10% SDS (Biorad)
10% Ammonio Persolfato(Biorad)
TEMED (Biorad)

Stacking gel

H₂O distillata
30% Acrilammide mix(29:1) (Biorad)
1.5M Tris (pH 6.8) (BRL)
10% SDS (Biorad)
10% Ammonio Persolfato (Biorad)
TEMED (Biorad)

I volumi relativi di H₂O e Acrilammide variano a seconda della percentuale del gel che si vuole preparare. Tale percentuale dipende dal peso molecolare della proteina da separare.

Running Buffer

Tris-glicina SDS 10%-Running buffer (1X) (Invitrogen)

Transfer Buffer

Tris glicina (1X) (Invitrogen)
20% MeOH (Carlo Erba Reagenti)
H₂O distillata

SDS-Gel Loading Buffer (5X) (Laemmli buffer)

Tris HCl (pH 6.8) (BRL)	250 mM
SDS (Biorad)	10%
Blu di Bromofenolo (BioRad)	tracce
β -Mercaptoetanol (Sigma)	0,7N
Glicerolo (Sigma)	50%

Immunoblotting

Soluzione per il blocking:

5% Blotto-non fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology)

Soluzione di lavaggio

(TBST 1X) pH 7,4

Tris-HCl (BRL)	50mM
EDTA (Sigma)	5mM
NaCl (Merck)	150mM
Tween Twenty (Sigma)	0,1%
H ₂ O	(a volume)

Soluzione Anticorpo Primario

4% Blotto-non fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology)

Anticorpo I	Ditta	Diluizione
anti-NR1	Sigma.	1:2000
anti-GluR1	Sigma	1:100
anti-GluR2/3,	Sigma	1.200
anti-GluR5	Sigma	1:200
anti-NF-200	Sigma	1.200
Anti- β Actina	Sigma	1:6000

Soluzione Anticorpo Secondario 4% Blotto-non fat dry milk (Santa CruzBiotechnology)

Anticorpo II (Ig biotinilato)	Ditta	Diluizione
anti-Mouse	Amersham B.	1.5000
anti-Rabbit	Amersham B.	1:5000

Soluzione Reagente Terziario

Streptavidin Horseradish Peroxidase
(Amersham Biosciences)
Diluizione 1:2000

Luminolo

ECL Western Blotting analysis system
(Amersham Biosciences)
Soluzioni 1 e 2 (1:1)

Soluzioni di sviluppo e fissaggio
della lastra fotografica

(Merck)

Immunofluorescenza

Soluzione di fissaggio

Paraformaldeide (4%) in PBS

Soluzione di lavaggio

PBS 1X (pbi International)

Soluzione di
permeabilizzazione membrane

Triton X-100 (0.1%) (Sigma)

Soluzione marcatura neurofilamenti

Anti-NF200 (Sigma)

Diluizione 1:1000 in PBS 1X

Soluzione Marcatore Nuclei

Hoechst (Sigma)

Diluizione 1:8000 in PBS 1X

METODI

COLTURA DEI GRANULI CEREBELLARI

Le colture primarie di granuli cerebellari sono state ottenute dalla dissociazione del cervelletto di ratti (Wistar) otto giorni dopo la nascita. Le cellule sono state piastrate ad una densità di $3,5 \times 10^5$ cellule/cm² su piastre petri (Nunc) da 35 o 92 mm, precedentemente ricoperte da poly l-lysina (10µg/ml) per 30' a RT. La proliferazione delle cellule non neuronali è stata bloccata aggiungendo al mezzo di coltura 10µM di cytosine arabinoside (AraC), 18 ore dopo il piastramento.

SISTEMA ESPOSITIVO IN VITRO

Le cellule sono state esposte ad un campo elettromagnetico sinusoidale di 50 Hz, secondo protocolli con tempi variabili, che vanno dalle 24 ore ai 7 giorni, , ad una densità di flusso di 1 mT (rms), in un solenoide inserito all'interno di un incubatore per cellule appropriatamente ventilato e con atmosfera al 5% di CO₂. La temperatura era mantenuta costante a $37 \pm 0.3^\circ\text{C}$, e continuamente controllata mediante un termometro Hanna HI 9274 OC. I campioni di controllo sono stati collocati in un secondo incubatore dello stesso tipo di quello contenente il solenoide e nelle stesse condizioni sperimentali di temperatura, umidità e CO₂. Tutti gli esperimenti sono stati condotti alla cieca.

Il solenoide utilizzato in questo lavoro di tesi è già stato ampiamente descritto in precedenti pubblicazioni (Santoro *et al*, 1997; Lisi *et al*, 2000; Lisi *et al*, 2005). Il corpo principale del solenoide consiste in un cilindro di asbesto spesso 2 cm, avente diametro di 20 cm ed un'altezza di 40 cm. E' costituito da 1200 spire di filo di rame di 2 mm di diametro avvolte intorno al cilindro di asbesto in tre strati, procedendo in continuità da un'estremità all'altra per tre volte avanti e indietro. L'intensità di campo è stata generata da un autotrasformatore variabile generante un flusso di densità di 1 mT (rms) per un voltaggio applicato pari a 12 Volts (rms). Il solenoide, come precedentemente detto, è stato posto in un incubatore per cellule munito di un

ventilatore per un'appropriata circolazione dell'aria. Il modesto riscaldamento dovuto all'effetto *Joule* è stato quindi efficientemente disperso grazie all'azione della continua ventilazione forzata nella massa totale dell'incubatore a CO₂. Poiché una lunga permanenza a temperature più alte di quella fisiologica induce in genere nei campioni esposti la sintesi delle proteine da stress termico denominate *Heat Shock Proteins* (HSP), è stata effettuato un *Western Blotting* per la proteina da shock termico HSP-70 sia sulle cellule esposte che su quelle di controllo. Questo esperimento non ha mostrato differenze di espressione della HSP-70 nei due tipi di campioni, suggerendo che le cellule esposte non vanno incontro ad uno stress indotto da un aumento della temperatura. L'intensità del campo (B), misurata con una sonda Hall, rimaneva entro il 5% del valore centrale del volume cilindrico di esposizione, che era di 11 cm x 17 cm lungo l'asse del solenoide. Il campo geomagnetico ambientale misurato era di 32 μ T per la componente verticale e 16 μ T per la componente orizzontale. I campi ambientali sporadici erano al di sotto di 0.1 μ T

SISTEMA ESPOSITIVO IN VIVO

Gli esperimenti in vivo sono stati eseguiti esponendo le ratte gravide per tutto il periodo della gestazione fino ad otto giorni dopo la nascita ad un campo elettromagnetico di frequenza 50Hz e intensità 1mT. Il solenoide utilizzato consiste in un cilindro di 2 cm, avente diametro di 40 cm e lunghezza di 86 cm. E' costituito da 860 spire di filo di rame di 1mm di diametro, avvolte intorno al cilindro in unico strato, procedendo in continuità da un'estremità all'altra. L'intensità di campo di è stata prodotta da un autotrasformatore variabile generante un flusso di densità di 1 mT (rms) per un voltaggio applicato pari a 32 Volts (rms).

Il solenoide è stato posto in una stanza a temperatura controllata (temperatura ambientale) e le ratte gravide sono state posizionate al centro del solenoide, dove il campo elettromagnetico misurato è uniforme. Le ratte gravide usate come controllo sono state posizionate nella stessa stanza ad una distanza dal solenoide tale da non registrare nessun segnale elettromagnetico.

TEST DI ECCITTOSSICITA E VITALITA NEURONALE

Dopo cinque giorni di coltura in presenza o meno dei campi magnetici le cellule sono state lavate con tampone di Locke e incubate per 30 minuti a RT con 100 μ M di Mg²⁺ in tampone di Locke. Successivamente le cellule sono state lavate in tampone di Locke, è stato aggiunto il loro terreno di crescita e sono state riposizionate nell'incubatore. Dopo 18 ore sono stati contati i nuclei intatti secondo il metodo descritto da Soto and Sonnenchein (1985), e modificato per i granuli cerebellari da Volontè et al. (1994). Le cellule venivano trattate con una soluzione di lisi, dopo 2 minuti, le cellule formavano una sospensione omogenea che veniva trasferita in un eppendorf e i nuclei intatti venivano contati. In tutti gli esperimenti, il 100% di sopravvivenza cellulare era riferito ai campioni non trattati con glutammato.

PATCH CLAMP

Gli elettrodi per il Patch-clamp sono costituiti da tubi capillari. Gli elettrodi erano riempiti con soluzioni appropriate (vedi materiali) e avevano una resistenza di 4 M Ω . Le correnti sono state registrate a temperatura ambiente usando un amplificatore *voltage-clamp* (Axopatch 1D, Axon Instruments). Il segnale di corrente veniva filtrato a 2KHz, registrato a 10 KHz e salvato sul *hard disc*. I Dati sono stati analizzati il pClamp 6 software (Axon Instruments) ed Origin (Microcal) software. Le varie soluzioni venivano applicate per gravità mediante piccoli tubi (con diametro < 1 mm).

ESTRAZIONE RNA

Il reagente Trizol (Invitrogen) è una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato che permette di isolare l'RNA totale da cellule e tessuti. Durante l'omogenizzazione e lisi del campione, il Trizol mantiene l'integrità dell'RNA distruggendo le cellule e dissolvendo le componenti cellulari. L'aggiunta di Cloroformio seguito da centrifugazione, separa la soluzione in una fase acquosa ed una fase organica. L'RNA si trova esclusivamente nella fase acquosa.

Il protocollo prevede quattro fasi:

1. SEPARAZIONE DELLE FASI

- sciacquare la piastra con PBS
- trasferire 1ml di Trizol nella piastra e incubare per 5 minuti a RT per consentire la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici
- aggiungere 0,2ml di Cloroformio (per 1ml di Trizol) e agitare vigorosamente i tubi eppendorf per 15 secondi e incubare per 3 minuti a RT
- centrifugare i campioni a non più di 12000 x g per 15 minuti a 2-8 °C

2. PRECIPITAZIONE DELL'RNA

- i campioni vengono separati in tre fasi, una rossa inferiore (fase fenolo-cloroformio), una intermedia ed una superiore acquosa che contiene l'RNA. Trasferire la fase acquosa in tubi puliti.
- precipitare l'RNA con 0,5ml Isopropanolo (per 1ml Trizol), agitare i tubi e incubare per 10 minuti a RT
- centrifugare a non più di 12000 x g per 10 minuti a 2-8 °C

3. LAVAGGIO DELL'RNA

- rimuovere il sopranatante e lavare l'RNA pellet con 1ml Etanolo 75% in H₂O MilliQ (per 1ml Trizol)
- vortexare, centrifugare a 7500 x g per 5 minuti a 2-8 °C

4. RISOSPENSIONE DELL'RNA

- togliere l'Etanolo e far asciugare il pellet all'aria per 5-10 minuti tenendo le eppendorf in ghiaccio
- aggiungere 50µl H₂O MilliQ
- effettuare le letture delle assorbanze a 260nm in cuvetta di quarzo utilizzando lo spettrofotometro GeneQuantPro (Amersham Biosciences)
- conservare a -20°C

TRASCRIZIONE INVERSA DELL'RNA

La reazione di trascrizione inversa permette di ottenere dall'RNA di origine cellulare il cDNA corrispondente.

Il sistema utilizzato è stato quello della Trascrittasi Inversa *Im Prom-II* (Promega, Madison, WI) ed il protocollo prevede una reazione che si svolge in quattro fasi:

<i>Fasi</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Durata</i>
<i>Incubazione iniziale</i>	<i>70°C</i>	<i>5 minuti</i>
<i>Incubazione</i>	<i>25°C</i>	<i>5 minuti</i>
<i>Trascrizione inversa</i>	<i>42°C</i>	<i>60 minuti</i>
<i>Inattivazione enzima</i>	<i>70°C</i>	<i>10 minuti</i>

La fase di Incubazione iniziale si svolge in un volume di 10µl e prevede i seguenti reagenti:

Random Primers	0,5mg/ml
RNA	1µg
H ₂ O distillata	(a volume)

Le successive tre fasi si svolgono aggiungendo al volume precedente i seguenti reagenti (volume finale di 20µl):

MgCl ₂ 25mM	4µl
Im Prom-II 5X Reaction Buffer	4µl
dNTP Mix 10mM	1µl
Im Prom-II Reverse Transcriptase	1µl
Inibitore di RNasi	40u/µl

AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR CLASSICA

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica mediante la quale è possibile amplificare un frammento di DNA attraverso l'utilizzo di specifici inneschi. Questa tecnica è stata utilizzata per amplificare i cDNA ottenuti dalla reazione di trascrizione inversa dell'RNA estratto dai granuli cerebellari negli esperimenti in vitro. I geni analizzati sono di seguito elencati:

- **NR1**: Subunità del recettore ionotropico NMDA
- **GLUR1**: Subunità del recettore ionotropico AMPA
- **GLUR2**: Subunità del recettore ionotropico AMPA
- **GLUR3**: Subunità del recettore ionotropico AMPA
- **GLUR5**: Subunità del recettore ionotropico kainato
- **B-ACTINA**: β -Actina citoscheletrica
- **18S**: Rna ribosomale

Sequenze usate per RT-PCR

Target	Primer sequence	Annealing temperature(C°)	Accession number
NR1	5'-tacactgccaaacttggcagctttc-3' 5'-catgaagaccctgccatgtt-3'	58	U11418
GluR1	5'-gcttcattggacattgactta-3' 5'-atctcaagtcggtaggagta-3'	58	M36418
GluR2	5'-attgtagactacgatgattc-3' 5'-aatagtcagcttgacttga-3'	58	M39419
GluR3	5'-aaacgatacttgattgactg-3' 5'-gctgattgttgatctgaga-3'	58	M36420
GluR5	5'-agtgccatcgacataagccat-3' 5'-atccgtcatgttcagccca-3'	54	M83560
Act	5'-agcaagagaggtatcctgacc-3' 5'-gccaatagtgatgacctggcc-3'	62	NM007393
18S	5'-tttcggaactgaggccatgattaag-3' 5'-agtttcagcttgcaaccatactcc-3'	62	X00686

Il sistema utilizzato è stato quello della *Taq Polimerasi* (Amersham Biosciences) ed il protocollo prevede una reazione che si svolge in tre fasi:

Fasi	Temperatura	Durata	N° cicli
Denaturazione iniziale	94°C	2 minuti	1
Denaturazione	94°C	30 secondi	x cicli
Appaiamento	60°C	30 secondi	
Estensione	72°C	30 secondi	
Estensione finale	72°C	7 minuti	1

La reazione avviene in un volume finale di 50 μ l e i reagenti utilizzati sono i seguenti:

PCR buffer (10X)	5 μ l
dATP 100mM	0,1 μ l
dTTP 100mM	0,1 μ l
dGTP 100mM	0,1 μ l
dCTP 100mM	0,1 μ l
Oligo up	20pmol
Oligo down	20 pmol
Taq DNA Polimerasi 5Ku	0,3 μ l

AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR REAL TIME

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione (PCR) e quantificazione simultanea del DNA.

Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi. Dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti (Sybr green) che intercalano con il DNA doppio-filamento (ds) e gli oligonucleotidi modificati del DNA (denominati sonde) che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA.

Questa tecnica è stata utilizzata per amplificare i cDNA ottenuti dalla reazione di trascrizione inversa dell'RNA estratto dai granuli cerebellari negli esperimenti in vivo. I geni analizzati sono di seguito elencati:

- **NR2B**: Subunità del recettore ionotropico NMDA
- **NR2C**: Subunità del recettore ionotropico NMDA
- **GAPDH**: gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (gene normalizzatore)

Sequenze usate per RT-PCR Real Time

Target	Primer sequence	Annealing temperature(C°)
NR2B	5'-tgagcatctgttctattggca-3' 5'-tggcgctcctctatggcta-3'	60
NR2C	5'-cctgggtctactggaaacttc-3' 5'-gggactcgggaaggctctg-3'	60
GAPDH	5'-caccaccaactgcttagcc-3' 5'-ggatgcagggatgatgttct-3'	60

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il sybr green come fluoroforo che intercalandosi alle doppie eliche di DNA, man mano che vengono sintetizzate, permette la quantificazione del cDNA di partenza. I dati sono stati analizzati usando l'equazione descritta da livak et al.(2001), secondo la quale la quantità di cDNA del campione trattato rispetto a quello non trattato è uguale a $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Dove:

$$\Delta C_t = (C_t \text{ del gene target} - C_t \text{ del gene normalizzatore GAPDH})$$

$$\Delta\Delta C_t = (\Delta C_t \text{ del campione trattato} - \Delta C_t \text{ del campione non trattato})$$

Per esempio se il ΔC_t del campione trattato è 2 e quello del campione non trattato è 3, avremo:

$$\Delta\Delta C_t = 3 - 2 = 1$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-1} = 0.5$$

Questo valore indica che il cDNA di partenza del campione trattato era il doppio rispetto a quello non trattato.

Prima di poter usare l'equazione $\Delta\Delta C_t$ per la quantificazione dei cDNA di nostro interesse, abbiamo eseguito un esperimento di taratura per verificare che l'efficienza

di retrotrascrizione dei geni target e del gene normalizzatore erano paragonabili. Le PCR Real sono state condotte usando Sybr Green I Master mix (Applied Biosystems) con lo strumento ABI PRISM™ 7000 Sequence Detection System. Ogni reazione veniva condotta in triplicato utilizzando 0,5 µl di cDNA e 250nM di primers in un volume di 25 µl.

I parametri di PCR sono i seguenti:

Fasi	Temperatura	Durata	N° cicli
Attivazione della DNA polimerasi	95°C	2 minuti	1
Denaturazione Appaiamento allungamento	95°C 60°C	15 secondi 1 secondi	40 cicli

ESTRAZIONE PROTEICA

Il protocollo utilizzato è il seguente:

- Togliere il terreno di coltura dalle piastre petri 92 mm
- Eseguire 2 lavaggi in PBS 1X
- Trasferire 200 µl di soluzione di lisi su ogni piastra e raccogliere il lisato con uno “screaper”
- Trasferire il lisato di ogni piastra in eppendorf e lasciare 10 minuti in ghiaccio
- Centrifugare a 10000 x g per 10 minuti a 4° C
- Prelevare il surnatante e trasferirlo in una nuova eppendorf

SDS-PAGE

L'elettroforesi è il processo per cui molecole cariche si separano in un campo elettrico a causa delle loro diverse mobilità. I fattori che influenzano la mobilità di una molecola in un campo elettrico sono la sua carica, il gradiente di voltaggio del campo elettrico e la resistenza di attrito del mezzo di supporto che ne contrasta il movimento.

Le proteine hanno una carica netta a qualunque pH diverso dal loro punto isoelettrico pI, quindi quando poste in un campo elettrico, migreranno verso l'elettrodo di carica opposta.

Per semplificare l'analisi di una miscela di proteine è possibile fare in modo che la separazione si basi soltanto sulle dimensioni delle catene polipeptidiche. Questo si ottiene denaturando le proteine, in presenza di β -Mercaptoetanololo, agente riducente che rompe i legami disolfuro, del detergente Sodio Dodecil Solfato (SDS). Poiché ogni molecola di SDS ha due cariche negative ai valori di pH usati per l'elettroforesi, la carica netta delle catene polipeptidiche sarà negativa. Inoltre, il rapporto carica/massa sarà essenzialmente identico per proteine diverse poiché il rivestimento di SDS domina la carica.

Per questa metodica viene utilizzato un gel discontinuo di poliacrilammide, costituito da due parti: *stacking gel* al 5%, che permette di compattare le proteine prima della separazione attraverso il *resolving gel*, che può essere a diverse percentuali a seconda del peso molecolare della proteina da separare.

Come marcatore di peso molecolare viene utilizzata una miscela commerciale di proteine a peso molecolare noto (Invitrogen): 250, 148, 93, 64, 50, 36, 22, 16, 6, 4 kDa.

WESTERN BLOTTING (*Immunoblotting*)

Il Western blotting si utilizza per rilevare e quantificare proteine che reagiscono con un anticorpo specifico. Si esegue la frazione delle proteine di un campione in SDS-PAGE. Il gel viene rimosso e steso su un filtro di nitrocellulosa. Si usa uno spessore di un materiale poroso per tenere insieme gel e membrana come un

sandwich. Un campo elettrico trasversale forza le proteine a migrare fuori dal gel sulla membrana di nitrocellulosa alla quale aderiscono. Poiché sulla membrana rimangono dei siti liberi, essa viene rivestita con una miscela di proteine non specifica per bloccarli. A questo fine vengono usati generalmente la BSA (*Bovin Serum Albumin*) o il latte. Il metodo comunemente utilizzato si avvale dell'utilizzo di due anticorpi:

- Ab I, lega la proteina d'interesse
- Ab II, lega il frammento cristallizzabile (Fc) dell'Ab I (Ninfa & Ballou, 2000).

Durante la mia tesi è stato utilizzato un anticorpo secondario legato alla Biotina; questa reagisce con la Streptavidina del reagente terziario, *Streptavidin Horseradish Peroxidase-HRP*. La perossidasi catalizza l'ossidazione del Luminolo in condizioni alcaline. Una volta ossidato il Luminolo si trova in uno stato eccitato che decade al livello base con emissione di luce. La massima emissione di luce è ad una lunghezza d'onda di 428 nm e questo permette di impressionare una lastra fotografica sensibile alla luce blu (*ECL Western Blotting detection reagents and analysis systems*; Amersham Biosciences).

Le proteine, trasferite su filtro di nitrocellulosa tramite *elettro-blotting*, e trattate per *Immunoblotting* sono le seguenti:

- **NR1**: Subunità del recettore ionotropico NMDA
- **GLUR1**: Subunità del recettore ionotropico AMPA
- **GLUR2/3**: Subunità del recettore ionotropico AMPA
- **GLUR5**: Subunità del recettore ionotropico kainato
- **NF-200**: Neurofilamenti, filamenti intermedi specifici delle cellule neuronali.
- **β-ACTINA**: β-Actina citoscheletrica

Il protocollo utilizzato è il seguente:

- blocking in latte 5% in H₂O per 1 ora

- incubare il filtro di nitrocellulosa in 10 ml di soluzione con anticorpo primario diluito in milk 4 % (diluizione e tempo di incubazione variabili a seconda dell'anticorpo)
- eseguire 3 lavaggi in TBST 1X di 5 minuti ciascuno
- incubare il filtro in 10 ml di soluzione anticorpo secondario (Ig-biotinilato) per 35 minuti
- eseguire 3 lavaggi in TBST 1X di 5 minuti ciascuno
- incubare il filtro in 10 ml di soluzione con reagente terziario (Streptavidin Horseradish Peroxidase) per 45 minuti.
- eseguire 3 lavaggi in TBST 1X di 5 minuti ciascuno
- immergere il filtro nel luminolo (4ml soluzione 1 e 4 ml soluzione 2) e lasciare 1 minuto
- impressione su lastra fotografica (Hyperfilm ECL-Amersham Biosciences), sviluppo e fissaggio della stessa.

IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

Le cellule sono state fatte crescere su vetrini porta oggetto da 13mm polilisinati di diametro posti in *multiwell* da quattro pozzetti per cinque giorni in presenza o meno del campo magnetico.

Al termine dei cinque giorni di esposizione le cellule è stata analizzata la distribuzione dei neurofilamenti mediante immunofluorescenza indiretta. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata con microscopio Olympus IX51 equipaggiato con una telecamera RT Slider SPOT (Diagnostic instruments. Inc. 6540 Bourroughs- Sterling Height, MI 48314-2133).

Il protocollo utilizzato è il seguente:

- Eseguire 2 lavaggi in PBS 1X
- Trasferire 500µl di Paraformaldeide al 4% in PBS e lasciare 15 minuti (fissaggio delle cellule ai vetrini)
- Eseguire 2 lavaggi in PBS

- Trasferire 1ml Triton 0,1% in PBS in ogni pozzetto e lasciare 8 minuti (permeabilizzazione della membrana)
- Eseguire 3 lavaggi in PBS 1X
- Marcare le cellule con l'anticorpo primario anti-NF200 (1:1000 in PBS 1X) per 1 ora al buio
- Effettuare 3 lavaggi in PBS 1X
- Incubare le cellule con l'anticorpo secondario anti-mouse (1:2000) legato al fluoroforo rodamina.
- Trasferire 500µl di soluzione contenente il marcatore dei nuclei HOECHST (1:8000 in H₂O distillata) e lasciare 2 minuti
- Eseguire 3 lavaggi in PBS 1X
- Prelevare i vetrini, asciugarli e posizionarli, capovolti, su vetrini porta oggetto su gocce di glicerolo
- Lasciar condensare a +4°C
- Fissare il bordo del vetrino con smalto

BIBLIOGRAFIA

Abe, T., Sugihara, H., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267, 13361-13368.

Alagarsamy S, Sorensen SD, Conn PJ (2001) Coordinate regulation of metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 11, 357-362.

Altman J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 1972. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J.Comp.Neurol.* 145, 353-398.

Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J.Comp. Neurol.* 136, 269-294.

Balazs R, Jorgensen OS, Hack N. 1988. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience.* Nov;27(2),437-51

Balazs R. Trophic effect of glutamate. *Curr Top Med Chem.* 2006;6(10),961-8. Review

Basset CAL. 1993. Beneficial effects of electro-magnetic fields. *Journal of Cellular Biochemistry* 51, 387-393.

Bauréus Koch CLM, Sommarin M, Persson BRR, Salford LG, Eberhardt JL. 2003. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell Membranes. *Bioelectromagnetics.* 24, 395-402.

Bennett, J. A. and Dingledine, R. (1995) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channelling reentrant membrane loop. *Neuron* 14, 373-384.

Betti E, Marchetti S, Cadossi R, Faldini A. 1997. Effect of electromagnetic field stimulation on fractures of the femoral neck. A prospective randomized double-blind study. In Second World Congress for Electricity and Magnetism and in Biology and Medicine. Bologna June 8-13,

Bettler, B., Egebjerg, J., Sharma, G., Pecht, G., Hermans-Borgmeyer, I., Moll, C., Stevens, C. F. and Heinemann, S. 1992. Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. *Neuron* 8, 257-265.

Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H. and Sakmann, B. (1992b) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8, 189-198.

Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J. P., Günther, W., Seeburg, P. H. and Sakmann, B. (1992c) Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science (Wash. DC)* 257,1415-1419.

Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E. and Sakmann, B. (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J. Physiol.(Lond.)* 485, 403-418.

Cheng, B., Furukawa, K., O'Keefe, J. A., Goodman, Y., Kihiko, M., Fabian, T., and Mattson, M. P. 1995. Basic fibroblast growth factor selectively increases AMPA-receptor subunit GluR1 protein level and differentially modulates Ca²⁺ responses to AMPA and NMDA in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 65, 2525–2536

Choi DW. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:171-182.

Choi, D. W. and Rothman, S. M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci.* 13, 171-182.

Churchill, L., Swanson, C. J., Urbina, M., and Kalivas, P. W. (1999) Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J. Neurochem.* 72, 2397–2403

Cline HT, Constantine-Paton M. 1989. NMDA receptor antagonists disrupt the retinotectal map. *Neuron.* 3, 413-426.

Condorelli, D. F., Dell'Albani, P., Aronic, E., Genazzani, A. A., Casabona, G., Corsaro, M., Balazs, R., and Nicoletti, F. (1993). Growth conditions differentially regulate the expression of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) receptor subunits in cultured neurons *J. Neurochem.* 61, 2133–2139

Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 37,205-237.

Contestabile A.2002. Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum.* (1), 41-55. Review

Cox J.A., Felder C.C. and Henneberry R.C. 1990. Differential expression of excitatory amino acid receptor subtypes in cultured cerebellar neurons. *Neuron* 4, 941-947.

Crino PB, Eberwine J. 1996. Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* 17,1173–87

Dingledine, R., Boland, L. M., Chamberlin, N. L., Kawasaki, K., Kleckner, N. W., Traynelis, S.F. and Verdoorn, T. A. (1988). Amino acid receptors and uptake systems in the mammalian central nervous system. *CRC Crit. Rev. Neurobiol.* 4, 1-96.

Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cull-Candy SG. 1994. NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* 368,335–39

Favaron M, Manev H, Alho H, Bertolino M, Ferret B, Guidotti A, Costa E. 1988. Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7351-7355.

Fitzgerald LW, Ortiz J, Hamedani AG and Nestler EJ 1996. Drugs of abuse and stress increase the expression of *gluR1* and *NMDAR1* glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: Common adaptations among acrossdesensitizing agents. *J Neurosci* 16,274–282

Flor, P. J., Gomeza, J., Tones, M. A., Kuhn, R., Pin, J.-P. and Knopfel, T. (1996) The C-terminal domain of the *mGluR1* metabotropic glutamate receptor affects sensitivity to agonists. *J. Neurochem.* 67, 58-63.

Frey AH. 1993. “Electromagnetic field interactions with biological systems”. *FASEB.*, Feb; 7:272-281. Liboff AR.1997. “Electric-field ion cyclotron resonance”. *Bioelectromagnetics.*, 18:85-87.

Fujita K, Koga Y. 2005. “Clinical application of single-pulse transcranial magnetic stimulation for the treatment of depression”. *Psychiatry Clin Neurosci.*, Aug; 59(4):425-32.

Fujita S., Shimada M. and nakamura T. 1966. H-thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layer of the mouse cerebellum. *J.Comp. Neurol.* 128, 191-208.

Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS. 1987 The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci.* 7(7),2203-13.

Gorter JA, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosenbaum DM, Opitz T, Bennett MVL, Connor JA and Zukin RS 1997. Global ischemia induces downregulation of *GluR2* mRNA and increases AMPA receptor- mediated Ca^{2+} influx in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 17,6179–6188

Hack N, Balazs R. 1994 Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of granule cells in culture: effect of quisqualate and AMPA. *Neurochem Int.* 25(3),235-41

Hollmann, M. and Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17, 31-10

Hollmann, M., Maron, C. and Heinemann, S. (1994) N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13, 1331-1343.

Hollmann, M., Maron, C. and Heinemann, S. (1994) N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13, 1331-1343.

Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S. W. and Heinemann, S. (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature (Lond.)* 342, 643-648.

Hume, R. I., Dingledine, R. and Heinemann, S. F. (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science (Wash. DC)* 253, 1028-1031

Jackson RJ, Wickens M. 1997. Translational controls impinging on the 50-untranslated region and initiation factor proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7,233-41

Janssens N, Lesage ASJ. 2001. Glutamate receptor subunit expression in primary neuronal and secondary glial cultures. 77: 1457-1474.

Johnson, J. W. and Ascher, P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature (Lond.)* 325, 529-531.

Jonas, P. and Burnashev, N. (1995) Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* 15, 987-990.

Karabakhtsian R, Bronde N, Shalts N, Kochlatyi S, Goodman, R, Henderson AS. 1994. Calcium is necessary in the cell response to EM fields. *FEBS Letters* 301: 53-59.

Kemp, J. A., Foster, A. C., Leeson, P. D., Priestley, T., Tridgett, R., Iversen, L. L. and Woodruff, G. N. (1988) 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycinemodulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6547-6550.

Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen. 2001 Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. 25, 402-408

Kleinschmidt A., Bear M.F., Singer W. 1987. Blockade of NMDA receptors disrupts activity-dependent plasticity of kitten striate cortex. *Science* 238, 355-358.

Komuro H, Rakic P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptor. *Science* 260: 95-97.

Komuro H. and Rakic P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260, 95-97.

Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H. and Kuhse, J. (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12, 1291-1300.

Lau GC, Saha S, Faris R, Russek SJ.(2004) Up-regulation of NMDAR1 subunit gene expression in cortical neurons via a PKA-dependent pathway. *J Neurochem* 88(3),564-75.

Lester, R. A. J., Clements, J. D., Westbrook, G. L. and Jahr, C.E. (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature (Lond.)* 346, 565-567.

Levi G, Aloisi F, Ciotti M T, and Gallo V. 1984. Autoradiographic localization and depolarization-induced release of acidic amino acids in differentiating granule cultures. *Brain Res* 290:77-86.

Liboff AR. 2004. "Toward an electromagnetic paradigm for biology and Medicine". *J Altern Complement Med.*, 10,41-47.

Lisi A, Ciotti MT, Ledda M, Pieri M, Zona C, Mercanti D, Rieti S, Giuliani L, Grimaldi S. 2005. "Exposure to 50 Hz electromagnetic radiation promote early maturation and differentiation in newborn rat cerebellar granule neurons". *J Cell Physiol.*, Aug; 204(2):532-8.

Lisi A, Pozzi D, Pasquali E, Rieti S, Girasole M, Cricenti A, Generosi R, Serafino AL, Congiu-Castellano A, Ravagnan G, Giuliani L, Grimaldi S. 2000 . "Three dimensional (3D) analysis of the morphological changes induced by 50 Hz magnetic field exposure on human lymphoblastoid cells (Raji)". *Bioelectromagnetics.*, Jan; 21(1):46-51.

Lozito, A. 2002. Atti seminario ASSTRA. "Emissioni elettromagnetiche nel trasporto urbano collettivo", Castello di Riomaggiore, Cinque Terre, 11-12 aprile.

Luben RA. 1991."Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems. *Health Phys.*, Jul;61(1):15-28. Review.

MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S.J. and Barker, J. L. (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature (Lond.)* 321, 519-522.

Manni V, Lisi A, Pozzi D, Rieti S, Serafino AL, Ledda M, Giuliani L, and Grimaldi S. 2002. Effect of Extremely Low Frequency (50 Hz) Magnetic field on Morphological and Biochemical Properties of Human Keratinocytes. *Bioelectromagnetics* 23: 298-305.

Marchetti N, Barbieri E, Guido G, Lisanti.1988. "Magnetoterapia in ortopedia. Indicazioni e risultati". Aulo Gaggi, Bologna.

Marin F, Puelles L. 1995. Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci.* Aug 1;7(8),1714-38.

Martinez S, Alvarado-Mallart RM. 1989. Rostral Cerebellum Originates from the Caudal Portion of the So-Called 'Mesencephalic' Vesicle: A Study Using Chick/Quail Chimeras.. *Eur J Neurosci.* Jan;1(6),549-560.

Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R. and Nakanishi, S. (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature (Lond.)* 349, 760-765.

Mayer, M. L. and Westbrook, G. L. (1987a) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 394,501-527.

Mayer, M. L. and Westbrook, G. L. (1987b). The physiology of ex-citatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 28, 197-276.

Mayer, M. L., Westbrook, G. L and Guthrie, P. B. (1984) Voltage dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature (Lond.)* 309, 261-263

Meldrum, B. and Garthwaite, J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 379-387.

Mercanti D, Galli C, Liguori M, Ciotti MT, Gullà P, Calissano P. 1992. Identification of the serum complex which induces cerebellar granule cell in vitro differentiation and resistance to excitatory amino acids. *Eur.J. Neurosci.* 4: 733-744.

Mishina, M., Sakimura, K., Mori, H., Kushiya, E., Harabayashi, M., Uchino, S. and Nagahari, K. (1991) A single amino acid residue determines the Ca²⁺ permeability of AMPA-selective glutamate receptor channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 813-821.

Miyashiro K, Dichter M, Eberwine J.1994. On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,10800-4

Monaghan, D. T., Bridges, R. J. and Cotman, C. W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 365±402.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12,529-40

Mori, H. and Mishina, M. (1995) Review: Neurotransmitter receptors VIII, Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34, 1219-1237.

Mori, H., Masaki, H., Yamakura, T. and Mishina, M. (1992) Identification by mutagenesis of a Mg^{2+} -block site of the NMDA receptor channel. *Nature (Lond.)* 358, 673-675.

Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature (Lond.)* 354, 31-37.

Murphy E, Mild KH. 1997. "EMF Science Review Symposium: Theoretical Mechanisms and In Vitro Research Findings". NIHS & EMF RAPID. see <http://www.niehs.nih.gov/emfrapid/html/Symposium1/3.htm>.

Myers SJ, Revennaugh JB, Dingledine R. 1997. A translational inhibitory motif resides in the GluR2 50-untranslated leader. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23(1), 923

Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akazawa, C., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1993) Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* 268, 11868-11873.

Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science (Wash. DC)* 258, 597-603.

Nakanishi, S. (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 13, 1031-1037

Naylor, P., Stewart, C. A., Wright, S. R., Pearson, R. C. A., and Reid, I. C. (1996) Repeated ECS induces GluR1 mRNA but not NMDAR1A-G mRNA in the rat hippocampus. *Mol. Brain Res.* 35, 349-353

Ninfa AJ, Ballou DP. 2000. Copyright ©. Metodologie di base per la biochimica e la biotecnologia. (Zanichelli).

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. and Prochiantz, A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature (Lond.)* 307, 462-465.
of an NMDA-receptor subunit. *Nature* 390, 691-694

Pazur A. 2004. "Characterization of weak magnetic field effects in an aqueous glutamic acid solution by nonlinear dielectric spectroscopy and voltammetry". *Biomagnetic Research and Technology.*, 2:8.

Pelligrini-Giampietro, D. E., Bennett, M. V. L., and Zukin, R. S. (1992) Are Ca(2+)-permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain? *Neurosci Lett.* 1992 Sep 14;144(1-2):65-9. *Neurosci. Lett.* 144, 65–69

Phillips JL, Haggren W, Thomas WJ, Jones TI, Adey W. 1992. Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. *Biochimica Biophysica Acta.* 1132: 140-144.

Pickering, D. S., Thomsen, C., Suzdak, P. D., Fletcher, E. J., Robitaille, R., Salter, M. W., MacDonald, J. F., Huang, X.P. and Hampson, D. R. (1993) A comparison of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor coupled to phosphoinositides turnover. *J. Neurochem.* 61, 85-92.

Pin, J.-P. and Duvoisin, R. (1995) Review: Neurotransmitter receptors I, The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1-26.

Pin, J.-P. and Duvoisin, R. (1995) Review: Neurotransmitter receptors I, The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1-26.

Pizzi M., Fallacara C., Consolandi O., Memo M., and Spano P.F. 1994. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionate and kainite differentially affect cytoarchitecture of rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett.* 166, 77-80.

Pollard H, Heron A, Moreau J, Ben-Ari Y and Khrestchatisky M 1993. Alterations of the GluR-B ampa receptor subunit flip/flop expression in kainate-induced epilepsy and ischemia. *Neuroscience* 57,545–554.

Rabacchi S., Bailly Y., Delhay-Bouchaud N. and Mariani J. 1992. Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science* 256. 1823-1825.

Ripellino JA, Neve RL, Howe JR. 1998. Expression and heteromeric interactions of non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits in the developing and adult cerebellum. *Neuroscience* 82:485-497.

Rothman, S. M. and Olney, J. W. (1987) Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci.* 10, 299-302.

Rusovan A and Kanje M. 1992. Magnetic fields stimulate peripheral nerve regeneration hypophyctiomia rats. *Neuroreport* 3 (12): 1039-1041

Sakurada, K., Masu, M. and Nakanishi, S. (1993) Alteration of Ca²⁺ permeability and sensitivity to Mg²⁺ and channel blockers by a single amino acid substitution in the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 410-415.

Santoro, N., Lisi, A., Pozzi, D., Pasquali, E., Serafino, A. & Grimaldi, S. 1997. "Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure on morphological and biophysical properties of human lymphoid cell line (Raji)". *Biochim. Biophys. Acta.*, 1357, 281-290.

Savill RM, Scotting PJ, Coyle B. 2005 Strategies to investigate gene expression and function in granule cells. *Cerebellum.*, 4(4):271-8

Schoepp, D. D. and Conn, P. J. (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 13-20.

Schramm M, Eimerl S, Costa E. 1990. Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1193-1197.

Scott J. Myers, Raymond Dingledine, and Karin Borges Seeburg, P. H. (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16, 359-365.

Seeburg, P. H. (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16, 359-365.

Seiji ozawa, Haruyuki Kamiya and Keisuke Tsuzuki (1997) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 54, 581-618

Serway RA. 1998. Copyright ©. Principi di fisica. (Saunders College Publishing).
Soto AM, Sonnenchein C. 1985. The role of estrogen in the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J. Steroid Biochem.* 23: 1087-94.

Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P. O., O'Hara, P. J. and Heinemann, S. F. (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specied by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 13, 1345-1357.

Steward O. 1997. mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? *Neuron* 18,9-12

Sucher NJ, Brose N, Deitcher DL, Awobuluyi M, Gasic G, et al. 1993. Expression of endogenous NMDAR1 transcripts without receptor protein suggests posttranscriptional control in PC12 cells. *J.Biol. Chem.* 268, 22299-304

Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R. and Nakanishi, S. (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8, 169-179.

Tanabe, Y., Nomura, A., Masu, M., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1993) Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* 13, 1372-1378.

Vignes M, Collingridge GL. 1997. The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388: 179-182.

Volontè C, Ciotti MT, Battistini L. 1994. Developmental of a method for measuring cell number: application to CNS primary neuronal cultures. *Cytometry* 17:274-276.

Vyklicky, L. Jr., Benveniste, M. and Mayer, M. L. (1990) Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 428, 313-331.

Walleczek J. 1992. Electro-magnetic field effect on cells of the immune system: the role of calcium signalling. *Faseb Journal* 6 : 3177-3185.

Watanabe M, Mishina M, Inoue Y. 1994. Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 343, 513-19

Werner, P., Voigt, M., Keinänen, K., Wisden, W. and Seeburg, P.H. (1991) Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature (Lond.)* 351, 742-744.

Wickens M, Anderson P, Jackson RJ. 1997. Life and death in the cytoplasm: messages from the 30 end. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 220-32

Wo, Z. G. and Oswald, R. E. (1995) Unravelling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 18, 161-168.

Wood MW, VanDongen HMA, VanDongen AMJ. 1996. The 50-untranslated region of the N-methyl-D-aspartate receptor NR2A subunit controls efficiency of translation. *J. Biol. Chem.* 271, 8115-20

Zona C., Ragozzino G., Ciotti MT., Mercanti D., Avoli M., Brancati A., Calissano P. 1993. Sodium, Calcium and late potassium currents are reduced in cerebellar granule cells cultured in the presence of a protein complex conferring resistance to excitatory amino acids. *Eur. J. Neurosci.*, 5: 1479-1484.