



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

NEUROSCIENZE

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO  
XXI

**Studio dell'espressione di  
SNAP-25 e SNAP-23  
nella corteccia cerebellare**

Dott.ssa Valentina Vanni

A.A. 2008/2009

Docente Guida:  
Prof. P. Strata

Coordinatore:  
Prof. G. Bernardi

*Al mio dolcissimo Tommaso*

## “Studio dell’espressione di SNAP-25 e SNAP-23 nella corteccia cerebellare”

Il sistema nervoso elabora le informazioni inviando segnali attraverso le sinapsi, giunzioni intercellulari specializzate. Tramite le sinapsi, i neuroni formano una rete di cellule in grado di comunicare tra di loro. Le sinapsi, costituite da un elemento pre- ed uno post-sinaptico, trasmettono gli impulsi nervosi molto velocemente e sono altamente plastiche. Le loro diverse proprietà funzionali sono determinate dalla presenza, all’interno dei due compartimenti, di molecole specifiche, dalla loro diversa combinazione nonché dal microcircuito nel quale sono immerse.

Di recente è stato osservato che diverse isoforme delle proteine appartenenti al complesso SNARE, coinvolto nel rilascio vescicolare sinaptico, sono preferenzialmente espresse in specifiche sinapsi piuttosto che in altre. Ad esempio in neuroni ippocampali GABAergici sembra che la SNAP-25 sia assente mentre sia presente la sua isoforma SNAP-23. Tale differenza si riflette in una diversa entrata di calcio in seguito a stimolazione, infatti in seguito a espressione esogena di SNAP-25 l’entrata di calcio risulta minore rispetto alla sola presenza di SNAP-23. Da questo studio e successivi è emerso un fatto molto interessante, che la SNAP-25 oltre ad essere coinvolta meccanicamente nel rilascio vescicolare ha anche un ruolo regolatorio a livello delle sinapsi tramite un’interazione con i canali voltaggio dipendenti. Interessante è che differenze nei livelli di espressione di SNAP-25 sono state riscontrate di recente anche in sottopopolazioni di terminazione glutamatergiche.

Poiché nel cervelletto non è stata condotta un’analisi approfondita riguardo la distribuzione dello SNARE complex ed in particolare delle isoforme SNAP, scopo della tesi è stato quello di caratterizzare la distribuzione della SNAP-25 e della SNAP-23 nelle sinapsi glutamatergiche e gabaergiche della corteccia cerebellare tramite tecniche di immunofluorescenza e microscopia confocale.

L'analisi quantitativa dei dati sperimentali, supportati dalla microscopia elettronica, ha rilevato un'espressione variabile della SNAP-25 nei diversi terminali sinaptici della corteccia cerebellare. I livelli di espressione estremamente bassi della SNAP-25 nelle terminazioni GABAergiche, e in una sottopopolazione glutamatergica, ci hanno suggerito che livelli molto bassi di tale proteina ed in particolare nella fibra rampicante, non possono essere responsabili del rilascio vescicolare che avviene in tali sinapsi. A conferma di tale ipotesi abbiamo eseguito degli esperimenti con la BoNT-A per verificare *in vivo* il rilascio vescicolare a livello della rampicante. I livelli di espressione estremamente bassi della SNAP-25 in una sottopopolazione glutamatergica, ci ha indotto inoltre a ricercare il possibile sostituto di tale proteina. Poichè l'isoforma SNAP-23, sembra essere in grado di sostituire funzionalmente la SNAP-25 nella secrezione neuroendocrina ne abbiamo analizzato la distribuzione nella corteccia cerebellare. Livelli di espressione non elevati della SNAP-23 nei terminali che non esprimono la SNAP-25 suggeriscono che anche tale isoforma non sembra essere coinvolta nel rilascio sinaptico evocato.

Tali risultati hanno aperto una nuove linee di ricerca che potrebbero aiutare a capire i meccanismi molecolari alla base della trasmissione sinaptica e della plasticità neuronale. Un obiettivo sarà quello di identificare l'isoforma o la proteina non nota che sostituisce la SNAP-25 nel rilascio vescicolare evocato in questi particolari terminazioni. Un altro progetto indagherà in maniera più approfondita il nuovo ruolo regolatorio della SNAP-25 esprimendo *in vivo* tale isoforma nel terminale glutamatergico in cui risulta assente (la fibra rampicante) e studiarne quindi gli effetti a livello elettrofisiologico.

Parole chiavi: "SNARE complex", "SNAP-25", "SNAP-23", "BoNT-A".  
"Cervelletto", "fibre rampicanti", "fibre parallele".

## “Study of the expression of SNAP-25 and SNAP-23 in the cerebellar cortex”

The brain processes information by transmitting signal at synapses, specialized intercellular junctions. The synapses connect neurons into vast networks of communicating cells. They are composed by a pre and a post-synaptic compartment, transmit information by an extremely fast mechanism, and are highly plastic. The functional properties of the synapses are specified by the presence, inside both compartments, of specific molecules, by their different arrangement and by the microcircuitry around them.

Recently it has been observed that different isoform of proteins belonging to the SNARE complex, involved in the synaptic vesicular release, are differentially expressed in different subtypes of neuronal populations. For example it has been reported that in hippocampal gabaergic neurons SNAP-25 is absent and that they are characterized by a higher calcium responsiveness compared with excitatory neurons. Exogenous expression of SNAP-25 in interneurons significantly reduces calcium responses to depolarizing stimuli. Interestingly, from this study and others it is emerging the notion that SNAP-25 is a multifunctional protein that participates in exocytotic function both at the mechanistic and at regulatory level by promoting inhibition of VGCCs. Interestingly, very recently it has been observed a difference in the expression levels of SNAP-25 in different subpopulations of glutamatergic neurons. Since in the cerebellum, the SNARE complex distribution has not been well characterized, the aim of the PhD thesis was to investigate the expression of SNAP-25 and SNAP-23 in the gabaergic and glutamatergic neurons of the cerebellar cortex by means of immunofluorescence experiments and confocal imaging. The quantitative analysis, supported by electron microscopy studies, showed a differential expression of SNAP-25 in the different synaptic terminals of the cerebellar cortex. Very low levels of SNAP-25 were detected in the gabaergic terminals and in a specific population of glutamatergic terminals represented by the

climbing fiber. The low levels of SNAP-25 can not be responsible of the synaptic vesicular release. This hypothesis was supported by an in vivo test by using the botulinum toxin A that cleaves specifically the SNAP-25. We therefore investigated the presence of SNAP-23, a potential isoform that could replace SNAP-25 in the regulated exocytosis. Also SNAP-23 resulted expressed at very low levels in the terminals SNAP-25 negative. The possible involvement of other homolog should be also taken into account.

These results have open different lines of research that could contribute in understanding the molecular mechanisms involved in synaptic transmission and plastic events. One goal will be to identify the potential substitute of SNAP-25 in such terminals. A second line of research aims at investigating the regulatory role of SNAP-25 by in vivo expression of this isoform in the glutamatergic terminals where is virtually absent, the climbing fiber, and by performing electrophysiological experiments.

Keywords: “*SNARE complex*”, “*SNAP-25*”, “*SNAP-23*”, “*BonT-A*”.  
“*Cerebellum*”, “*climbing fiber*”, “*parallel fiber*”.

## Indice

<b>Capitolo 1: Introduzione.....</b>	<b>10</b>
<i>1.1 Il cervelletto.....</i>	<i>10</i>
1.1.1 Struttura e funzione.....	10
1.1.2 La circuiteria cerebellare.....	15
<i>1.2 Sinapsi eccitatorie e sinapsi inibitorie del cervelletto.....</i>	<i>18</i>
1.2.1 Sinapsi eccitatorie.....	18
1.2.2 Sinapsi inibitorie.....	20
<i>1.3 Il rilascio vescicolare sinaptico.....</i>	<i>21</i>
<i>1.4 Il complesso SNARE.....</i>	<i>25</i>
1.4.1 VAMP/Sinaptobrevina.....	25
1.4.2 Syntaxina.....	25
1.4.3 Snap25.....	26
<i>1.5 Analisi del complesso SNARE mediante le tossine botuliniche.....</i>	<i>27</i>
<i>1.6 Analisi genetica delle funzioni del complesso SNARE.....</i>	<i>30</i>
<b>Capitolo 2: Scopo del lavoro.....</b>	<b>33</b>

<b>Capitolo 3: Materiali e Metodi</b> .....	35
3.1 <i>Iniezione in vivo</i> .....	35
3.2 <i>Istologia ed Immunofluorescenza</i> .....	36
3.3 <i>Analisi di colocalizzazione</i> .....	39
3.4 <i>Preparazione del campione per la microscopia elettronica e           marcatura in postembedding immunogold per SNAP-25 e           SNAP-23</i> .....	40
<b>Capitolo 4: Risultati</b> .....	42
4.1 <i>Caratterizzazione delle sinapsi glutamatergiche e gabaergiche           nella corteccia cerebellare</i> .....	42
4.2 <i>SNARE complex nelle terminazioni delle fibre rampicanti</i> .....	44
4.3 <i>Distribuzione della SNAP-25 nelle sinapsi glutamatergiche</i> ..	46
4.3.1 SNAP-25 nelle sinapsi glutamatergiche dello strato molecolare.....	46
4.3.2 Espressione della SNAP-25 durante lo sviluppo.....	48
4.3.3 SNAP-25 nelle sinapsi glutamatergiche dello strato granulare.....	50
4.4 <i>Distribuzione della SNAP-23 nelle sinapsi glutamatergiche</i> ..	52
4.4.1 SNAP-23 nelle sinapsi glutamatergiche dello strato molecolare.....	52
4.4.2 SNAP-23 nelle sinapsi glutamatergiche dello strato granulare.....	53
4.5 <i>Distribuzione della SNAP-25 e della SNAP-23 nelle sinapsi           GABAergiche</i> .....	55
4.5.1 SNAP-23 e SNAP-25 nelle sinapsi GABAergiche dello strato molecolare.....	55

---

4.5.2 SNAP-23 e SNAP-25 nelle sinapsi GABAergiche dello strato granulare.....	56
4.6 <i>Analisi della SNAP-25 e della SNAP-23 mediante la microscopia elettronica nello strato molecolare.....</i>	<i>57</i>
4.7 <i>Iniezione in vivo della BoNT-A nel parenchima cerebellare...59</i>	<i>59</i>
<b>Capitolo 5: Discussione.....</b>	<b>61</b>
5.1 <i>Espressione della SNAP-25 e della SNAP- 23.....</i>	<i>62</i>
5.2 <i>Ruolo Regolatorio della SNAP-25.....</i>	<i>67</i>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>72</b>
<b>Ringraziamenti.....</b>	<b>87</b>

## *Capitolo 1*

# Introduzione

### ***1.1 Il cervelletto***

Il cervelletto, è una vasta porzione dell'encefalo, localizzato nella fossa posteriore del cranio e separato dai lobi occipitali degli emisferi cerebrali dal tentorio del cervelletto.

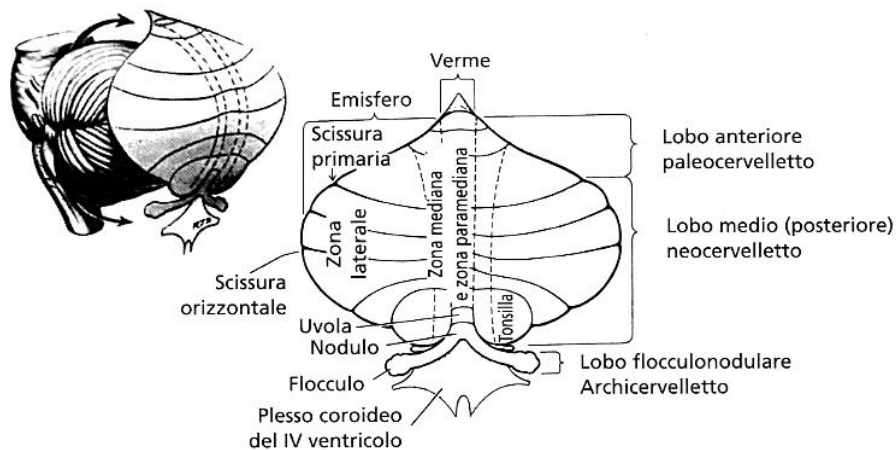
Il cervelletto sovrasta il tronco dell'encefalo a livello del ponte e del bulbo, formazioni con le quali è connesso attraverso i peduncoli cerebellari, tre per ogni lato, costituiti da grossi contingenti di fibre nervose afferenti ed efferenti mediante le quali comunica con le altre formazioni nervose.

#### *1.1.1 Struttura e funzione*

All'osservazione macroscopica (**Fig. 1.1**), la corteccia cerebellare presenta numerose convoluzioni trasversali e parallele tra loro che decorrono da un lato all'altro del cervelletto.

Due profonde scissure, la primaria e la posterolaterale, dividono il cervelletto in tre lobi. La scissura primaria separa il lobo anteriore da quello

posteriore; la scissura posterolaterale separa invece il lobo posteriore da quello flocculonodulare. Quest'ultimo è la parte più antica di tutto il cervelletto e perciò viene anche detto *archicervelletto*; il lobo anteriore e parte del lobo posteriore vengono invece detti *paleocervelletto*. Quasi il 90% del lobo posteriore è invece di origine relativamente recente, raggiunge un elevato sviluppo specialmente nei primati, ed in particolare nell'uomo, ed è chiamato *neocervelletto*. Altre scissure meno profonde delle due appena enunciate suddividono ciascun lobo in molti lobuli. In sezione sagittale, i lobi ed i lobuli assomigliano ai rami di un albero che si dipartono da un tronco comune costituito da sostanza bianca. Da ogni ramo prendono origine numerosi piccoli rami secondari, denominati *folia*, che rappresentano sezioni di piccole convoluzioni che decorrono da un lato all'altro del cervelletto.



**Fig. 1.1** Riproduzione distesa della superficie cerebellare che mostra le principali suddivisioni

Dal punto di vista funzionale è più opportuno considerare il cervelletto suddiviso in tre parti principali sulla base delle diverse sedi di provenienza delle afferenze. Il **cerebro-cervelletto** occupa la maggior parte dell'emisfero cerebellare laterale e riceve proiezioni da molte aree della corteccia cerebrale. Il cerebro-cervelletto è coinvolto nella regolazione di movimenti altamente specializzati, in particolare nella pianificazione ed esecuzione di complesse sequenze spaziali e temporali di movimenti (compresi quelli inerenti il linguaggio). Il **vestibolo-**

**cervelletto** è invece la porzione del cervelletto che comprende i lobi caudali del cervelletto ed include il flocculo ed nodulo. Come suggerisce il suo nome il vestibolo-cervelletto riceve proiezioni dai nuclei vestibolari del tronco dell'encefalo e la sua funzione principale riguarda la regolazione dei movimenti alla base dell'equilibrio e della postura. Lo **spino-cervelletto** occupa la zona mediale e paramediale e riceve proiezioni principalmente dal midollo spinale. La parte laterale dello spino-cervelletto è interessata principalmente nel controllo dei movimenti generati dai muscoli distali, tra cui i movimenti relativamente grossolani degli arti della deambulazione. La porzione centrale del cervelletto detta verme, è coinvolta principalmente nel controllo dei muscoli prossimali, oltre che nella regolazione dei movimenti oculari in risposta ai segnali di natura vestibolare.

Ad eccezione di una proiezione diretta dal vestibolo-cervelletto ai nuclei vestibolari, la corteccia cerebellare proietta sempre ai nuclei cerebellari profondi, che a loro volta proiettano sia verso la corteccia cerebrale sia verso il midollo spinale. Vi sono tre principali nuclei profondi: il **nucleo dentato**, il **nucleo interposto** (diviso in una parte anteriore ed una posteriore) ed il **nucleo del fastigio**. Ciascuno di questi riceve afferenze da una diversa regione della corteccia cerebellare. In generale si può affermare che il cerebro-cervelletto proietta principalmente al nucleo dentato, lo spino-cervelletto al nucleo interposto e al nucleo del fastigio, a cui proietta inoltre il vestibolo-cervelletto

Le connessioni tra il cervelletto e le altre parti del sistema nervoso, sono stabilite tramite tre ampie vie che costituiscono i peduncoli cerebellari. Il *peduncolo cerebrale superiore* è costituito quasi interamente da fibre efferenti. I neuroni che danno origine a questa via si trovano nei nuclei cerebellari profondi ed i loro assoni proiettano al nucleo rosso, agli strati profondi del collicolo superiore e tramite l'interposizione del talamo dorsale, ai neuroni delle aree primarie motoria e premotoria della corteccia. Il *peduncolo cerebellare medio* è una via afferente al cervelletto, che prende origine dai nuclei del ponte. La maggior parte di questi assoni pontini riceve segnali dalla corteccia e li ritrasmette al cervelletto. Infine, il *peduncolo cerebellare inferiore* è il più piccolo ma anche il più complesso dei peduncoli cerebellari, contenendo sia fibre afferenti che efferenti. Le fibre efferenti che transitano in questo peduncolo proiettano ai nuclei vestibolari e alla

formazione reticolare; le fibre afferenti provengono dai nuclei vestibolari, dal midollo spinale e da diverse regioni del tronco encefalico. In tale peduncolo, passano le fibre rampicanti che provengono dall'oliva inferiore situata nel bulbo.

Pertanto il cervelletto fa parte di un ampio circuito che riceve proiezioni dalla corteccia cerebrale, dal tronco encefalico e dal midollo spinale e, a sua volta, proietta a ritroso alle stesse aree. La funzione fondamentale del cervelletto è chiaramente quella di rilevare la differenza o "errore motorio" tra un movimento pianificato e il movimento effettivo e, una volta rilevato l'errore, inviare segnali, tramite le sue proiezioni alle aree motorie superiori. Queste correzioni possono essere effettuate sia durante l'esecuzione del movimento sia immagazzinate come una forma di apprendimento motorio.

Esistono due forme di apprendimento motorio ampiamente analizzate, l'eye-blink conditioning ed il riflesso vestibolo-oculare (VOR). Normalmente il VOR, agisce determinando il continuo orientamento degli occhi al muoversi della testa, in modo da mantenere stabile l'immagine di un bersaglio visivo sulla retina. Quando il soggetto sperimentale è costretto ad osservare il mondo visivo attraverso lenti che rimpiccioliscono il bersaglio, inizialmente gli occhi reagiscono con movimenti troppo ampi rispetto allo "slittamento" dell'immagine visiva sulla retina. Dopo un certo periodo di allenamento tuttavia, il VOR viene calibrato rispetto alla nuova situazione e gli occhi tornano a spostarsi alla giusta distanza in relazione ai movimenti della testa, compensando in tal modo le dimensioni alterate dell'immagine visiva. Ciò significa che le informazioni relative alle modificazioni del contesto sensoriale del VOR devono essere apprese e ricordate per eliminare gli errori introdotti artificialmente. Il danneggiamento o la rimozione del cervelletto abolisce la capacità del VOR di adattarsi a condizioni nuove o modificate. Queste osservazioni portano quindi a concludere che il cervelletto svolge un ruolo fondamentale nel controllo dei processi di apprendimento motorio.

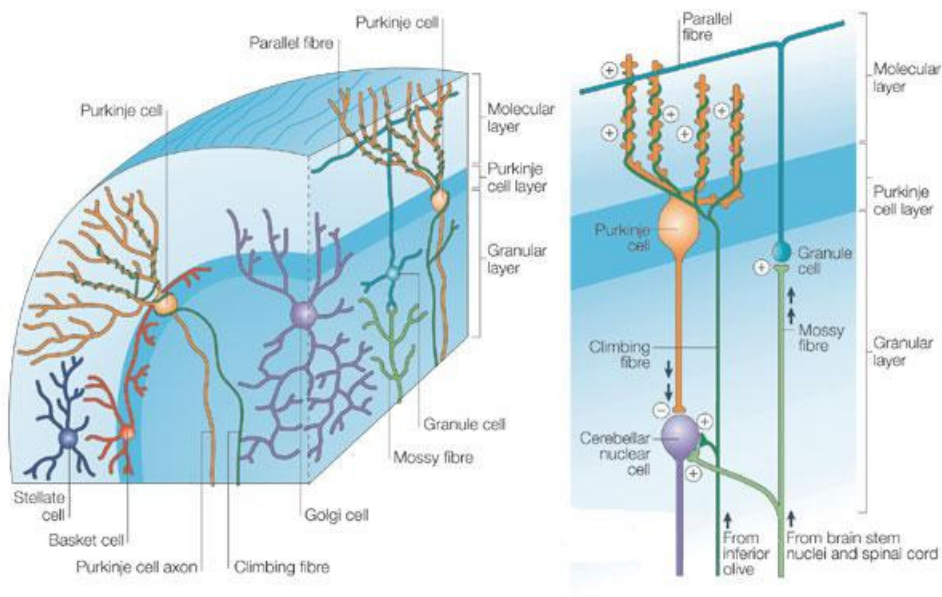
Alla fine degli anni '60, si riteneva che il cervelletto fosse coinvolto esclusivamente nel controllo del movimento, agendo da comparatore che corregge gli errori del movimento paragonandone l'intendimento con l'esecuzione. Marr (Marr, 1969) fu il primo a proporre il coinvolgimento del cervelletto nell'apprendimento motorio. La regolazione dei flussi di informazione attraverso i

moduli (il modulo di funzionamento del cervelletto è costituito dal circuito di base che si ripete continuamente lungo tutte le suddivisioni del cervelletto) costituisce la base del controllo del movimento e della plasticità a lungo termine che permette l'apprendimento motorio. Nei processi di apprendimento motorio è implicato l'LTD (Long Term Depression) la cui esistenza è stata dimostrata, all' inizio del 1970, da Ito (Ito, 1984). Sono ormai sostanziali inoltre, le evidenze che dimostrano il coinvolgimento del cervelletto, oltre che nel apprendimento motorio, anche nelle funzioni emozionali ed in particolar modo nei processi correlati alla paura. La relazione tra la paura ed il cervelletto è stata infatti ben dimostrata nell'uomo in numerosi studi. Ploghaus e collaboratori (1999, 2000) hanno osservato che il cervelletto posteriore viene attivato durante la fase antecedente lo stimolo doloroso. Tale stimolo viene segnalato da una luce colorata che precedentemente è stata accoppiata ad una stimolazione avversa. Anche Damasio e collaboratori (2000), con la PET imaging, hanno trovato un'attivazione del cervelletto quando il soggetto sperimentale ricorda episodi di paura personali. Recentemente, con la stessa tecnica, Hasler e collaboratori (2007) hanno descritto un'attivazione del cervelletto associata alla fase 'cued' della paura.

Nei roditori è stato osservato che dopo 'fear conditioning', l'inattivazione del verme mediante somministrazione intraparenchimale di TTX, subito dopo la fase di acquisizione, danneggia il consolidamento del "fear memory" (Sacchetti et al, 2002). Inoltre, nel verme, viene registrato in seguito al "fear learning" ottenuto con l'associazione di un tono ad uno stimolo contrario, un potenziamento a lungo termine delle sinapsi GABAergiche e FP-CP (Sacchetti et al, 2004; Scelfo et al, 2008).

### 1.1.2 La circuiteria cerebellare

All'osservazione microscopica l'istologia ci mostra come il cervelletto sia caratterizzato da: un mantello esterno di sostanza grigia (la corteccia cerebellare), da sostanza bianca, all'interno, e da tre paia di nuclei cerebellari profondi che proiettano al di fuori del cervelletto. A livello cellulare, la corteccia cerebellare ha un'organizzazione estremamente omogenea.



**Fig. 1.2** Circuito intrinseco del cervelletto. Si noti che le varie classi di neuroni sono localizzate in strati cellulari diversi. Particolare delle connessioni alla cellula del Purkinje

Il circuito intrinseco del cervelletto (**Fig. 1.2**) si basa principalmente su 5 tipi cellulari organizzati in 3 strati, che a partire dalla sostanza bianca sono:

- Lo **Strato dei granuli** presenta un elevatissimo numero di neuroni ( $10^{11}$ ) densamente stipati, la maggior parte dei quali sono rappresentati dalle *cellule dei granuli*. Tali cellule sono neuroni eccitatori glutamatergici e rappresentano la popolazione più numerosa di neuroni del cervelletto se non del cervello. Gli assoni dei granuli ascendono fino allo strato molecolare e si biforcano dando origine alle cosiddette fibre parallele che intersecano i dendriti delle Purkinje ricchi di spine nella regione distale

dell'albero. Lo strato dei granuli è inoltre caratterizzato dalla presenza dei *glomeruli* a livello dei quali i dendriti delle cellule dei granuli stabiliscono complessi rapporti sinaptici con le espansioni a forma di bulbo delle fibre muscoidi e con le terminazioni inibitorie delle *cellule del Golgi*. Queste ultime sono, interneuroni inibitori che utilizzano il GABA come neurotrasmettitore, hanno il corpo cellulare nello strato dei granuli ed i loro dendriti proiettano nello strato molecolare dove sono contattati dalle fibre parallele; esiste inoltre una connessione tra fibra muscoide e dendriti delle cellule di Golgi. Recentemente è stato evidenziato nello strato dei granuli, un nuovo tipo di interneurone eccitatorio glutamatergico detto brush. Le cellule brush, ricevono input da una singola fibra muscoide ed il loro assone contatta i granuli e le Golgi. La loro distribuzione non è uniforme nella corteccia cerebellare e la loro funzione non è ancora del tutto conosciuta.

- Lo **Strato delle cellule di Purkinje** è costituito principalmente dalle *cellule di Purkinje*, cellule inibitorie GABAergiche, distribuite in uno strato monocellulare che separa lo strato molecolare da quello granulare. L'albero dendritico delle Purkinje, che si estende nello strato molecolare, è disposto in un piano perpendicolare all'asse medio-laterale del folium, quindi nelle sezioni sagittali è possibile apprezzare virtualmente l'albero dendritico di una singola Purkinje nella sua totalità, nelle sezioni coronali si osserva principalmente il tronco primario. I loro assoni attraversano il sottostante strato dei granuli confluendo nella sostanza bianca sottostante e terminando nei nuclei cerebellari. Tra una cellula di Purkinje e l'altra sono presenti le cellule gliali di Bergmann. Subito al di sotto delle Purkinje sono presenti le cellule del Lugaro. Queste cellule sono parallele allo strato delle Purkinje e sono interneuroni inibitori.
- Lo **Strato molecolare** è lo strato più esterno costituito principalmente dai dendriti delle Purkinje che formano contatti sinaptici con le fibre parallele e le fibre rampicanti (come descritto dettagliatamente in seguito), dalle *cellule a canestro*, presenti nella porzione più bassa dello strato molecolare

e dalle *cellule stellate*, presenti invece nella parte più alta (entrambi interneuroni inibitori che utilizzano il GABA come neurotrasmettitore). Sia le cellule a canestro che le cellule stellate vengono eccitate dalle fibre parallele. Queste cellule inviano i loro assoni in direzione perpendicolare a quella delle fibre parallele e provocano inibizione laterale delle cellule di Purkinje adiacenti.

Il modulo funzionale di base del cervelletto è caratterizzato dall'interazione di elementi neuronali differenti presenti nella corteccia cerebellare e nei nuclei cerebellari profondi. La corteccia cerebellare riceve due afferenze, le fibre rampicanti e le fibre muscoidi, e genera una singola efferenza, gli assoni delle cellule di Purkinje (Ramon y Cajal, 1904). I nuclei cerebellari profondi ricevono le collaterali delle fibre rampicanti e delle muscoidi (Ito, 1982) e sono il target principale degli assoni delle cellule di Purkinje. Ogni volta che un segnale afferente perviene al cervelletto esso si distribuisce direttamente ad uno dei nuclei profondi ed alla corrispondente area della corteccia cerebellare. Dopo l'avvenuta elaborazione dei segnali giunti alla corteccia cerebellare, segnali in uscita raggiungono il corrispondente nucleo profondo.

La corteccia cerebellare inoltre, riceve afferenze diffuse da fibre aminergiche provenienti da due gruppi di nuclei del tronco dell'encefalo, il locus coeruleus e i nuclei del raphe (Ito, 1984). Le proiezioni dei nuclei del rafe sono serotoninergiche e terminano sia a livello dello strato dei granuli che nello strato molecolare, le proiezioni provenienti dal locus coeruleus sono noradrenergiche e terminano formando un plesso in tutti e tre gli strati della corteccia cerebellare. Entrambi i tipi di afferenze esercitano un'azione modulatoria diffusa.

## ***1.2 Sinapsi eccitatorie e sinapsi inibitorie del cervelletto***

### *1.2.1 Sinapsi eccitatorie*

Le due principali afferenze eccitatorie presenti nel cervelletto, caratterizzati da una elevata plasticità strutturale (Strata e Rossi, 1998) sono le fibre muscoidi e le fibre rampicanti. Le fibre muscoidi prendono origine da numerosi nuclei del tronco encefalico ed influenzano le Purkinje in modo indiretto attraverso le fibre parallele che intersecano i dendriti delle Purkinje pieni di spine nella regione distale dell'albero. Nel ratto, ogni cellula del Purkinje riceve segnali afferenti da circa 200.000 fibre parallele provenienti dai granuli ed ogni granulo riceve afferenze da quattro fibre muscoidi. Le fibre rampicanti che costituiscono l'altro sistema afferente eccitatorio, prendono origine da un'unica struttura posta nel bulbo, l'oliva inferiore. Esse penetrano nella corteccia cerebellare e si avvolgono attorno al soma ed ai dendriti delle Purkinje, a livello dei quali stabiliscono numerosi contatti sinaptici, con le regioni prossimali dei dendriti. Ogni Purkinje riceve connessioni sinaptiche da una sola rampicante mentre ogni fibra olivocerebellare contrae sinapsi con più Purkinje. Le connessioni delle rampicanti costituiscono una potente sinapsi eccitatoria del sistema nervoso centrale. Un singolo potenziale d'azione di una fibra rampicante evoca, sia a livello del soma che a livello dei dendriti, potenziali postsinaptici molto ampi che determinano l'insorgenza di un ampio potenziale d'azione seguito da una scarica ad alta frequenza di potenziali d'azione di minore ampiezza. Questa caratteristica attività è stata denominata *spike complesso*. L'attivazione delle fibre parallele determina l'insorgenza di potenziali postsinaptici più brevi. E' necessaria una sommazione spaziale e temporale di questi piccoli potenziali postsinaptici eccitatori per generare un singolo potenziale d'azione, denominato *spike semplice*. L'attività delle fibre muscoidi e di quelle rampicanti viene modulata in modo diverso in risposta alla stimolazione sensoriale e durante l'esecuzione dei movimenti. I neuroni di origine delle fibre muscoidi ed i granuli scaricano spontaneamente ad alta frequenza, generando 50-100 potenziali d'azione al secondo nei neuroni del Purkinje. Gli stimoli sensoriali ed i movimenti volontari, agendo sulle fibre muscoidi, possono

modulare questa attività e quindi possono controllare istante per istante la frequenza di scarica delle cellule del Purkinje. Al contrario, i neuroni del nucleo olivare inferiore, che danno origine alle fibre rampicanti, scaricano spontaneamente a bassa frequenza e generano in media uno spike complesso al secondo a livello delle cellule del Purkinje. Gli stimoli sensoriali o i movimenti provocano l'insorgenza di uno o due spike complessi solamente. Nonostante la bassa frequenza di scarica, le fibre rampicanti, possono alterare l'output cerebellare modulando l'effetto sinaptico delle fibre parallele in modi diversi. 1. Ogni spike complesso, è seguito da una pausa dovuta all'iperpolarizzazione della membrana indotta dalla permeabilità  $Ca^{2+}$ - $K^+$  dipendente, questo determina un cambiamento nel "pattern" di scarica. 2. In seguito alla disattivazione dell'oliva inferiore mediante il raffreddamento, le Purkinje scaricano ad alta velocità (Montarolo, Palestini et Strata, 1982; Benedetti et al, 1983). Tale effetto non è dovuto alla soppressione della pausa successiva alla fibra rampicanti, ma alla soppressione della forte inibizione esercitata dall'oliva inferiore sulle Purkinje attraverso le collaterali che contattano gli interneuroni inibitori. Recentemente, Szapiro e Barbour (2007) hanno dimostrato come l'inibizione sia mediata, almeno in parte, dallo "spillover" del glutammato dalle fibre rampicanti agli interneuroni. 3.L'attività delle fibre rampicanti può indurre l'LTD.

Nei processi di apprendimento motorio è infatti implicato l'LTD (Long Term Depression) cerebellare che risulta essere associativa in quanto compare quando le parallele e le rampicanti sono attivate simultaneamente. In questa circostanza quindi l'LTD riduce selettivamente la forza della trasmissione nelle sinapsi relative alle fibre parallele. I meccanismi molecolari coinvolti richiedono l'attivazione dei recettori degli AMPA, dei recettori mGluR1 e dei canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio dipendenti. Le sinapsi tra fibre parallele e la cellula del Purkinje possono essere non solo depresse (LTD), ma possono inoltre essere potenziate (LTP). A seconda del pattern di stimolazione elettrica possono essere indotte, due tipi di LTP. La stimolazione delle fibre parallele a bassa frequenza induce un rafforzamento a lungo termine di tale di sinapsi che avviene a livello presinaptico ed è dipendente da cAMP (Salin et al, 1996). Un altro pattern di stimolazione

induce l'altra forma di LTP, che avviene a livello postsinaptico, è dipendente dall'ossido nitrico ed è coinvolta nel fear conditioning. (Sacchetti et al, 2005)

### *1.2.2 Sinapsi inibitorie*

L'attività delle cellule del Purkinje viene modulata da tre tipi di interneuroni inibitori: le cellule stellate, le cellule a canestro e le cellule del Golgi. Al pari delle cellule del Purkinje, le cellule stellate e a canestro ricevono afferenze di tipo eccitatorio dalle fibre parallele (che sono gli assoni dei granuli). Le cellule stellate possiedono assoni brevi che stabiliscono contatti sinaptici, a livello dello strato molecolare, con i dendriti delle cellule del Purkinje circostanti, mentre gli assoni delle cellule a canestro decorrono perpendicolarmente alle fibre parallele e stabiliscono contatti sinaptici con i corpi cellulari delle Purkinje. Quando un gruppo di fibre parallele eccita una fila di neuroni del Purkinje, le cellule a canestro che vengono eccitate dagli stessi segnali inibiscono i neuroni del Purkinje disposti ai lati. Di conseguenza, quando un gruppo di fibre parallele eccita una fila di neuroni del Purkinje, le cellule a canestro che vengono eccitate dagli stessi segnali inibiscono i neuroni del Purkinje situati ai lati di quelli eccitati dalle fibre parallele. Il terzo tipo di interneurone inibitorio, la cellula del Golgi, possiede un complesso albero dendritico a livello del quale riceve afferenze (di tipo eccitatorio) dalle fibre parallele. Le terminazioni assoniche delle Golgi raggiungono lo strato dei granuli con i quali stabiliscono sinapsi asso-dendritiche all'interno dei glomeruli. Quindi i neuroni del Golgi sopprimono l'eccitamento dei granuli da parte delle fibre muscoidi e riducono la durata dell'eccitamento indotto sulle cellule del Purkinje per il tramite delle fibre parallele (Kandel).

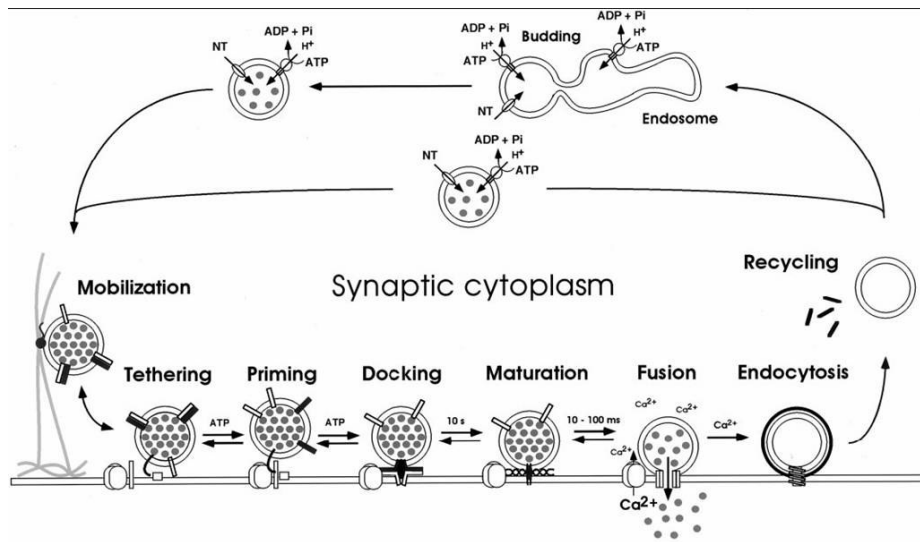
La maggior parte degli studi sui cambiamenti a lungo termine nella trasmissione sinaptica in relazione ai processi di apprendimento e memoria sono stati effettuati nelle sinapsi eccitatorie utilizzando stimolazioni elettriche per indurre l'LTP. Recentemente, sono stati osservati, anche nelle sinapsi inibitorie, cambiamenti a lungo termine indotti da stimolazione elettrica. È stato infatti dimostrato che in concomitanza con l'LTP in uno dei pathway eccitatori sulle Purkinje c'è anche un

LTP inibitorio. Questo comportamento evidenzia un cambiamento plastico a lungo termine delle sinapsi inibitorie indotto dal comportamento (Scelfo et al, 2008).

### ***1.3 Il rilascio vescicolare sinaptico***

Nelle terminazioni presinaptiche si trovano strutture vescicolari specializzate, le vescicole sinaptiche, ognuna delle quali racchiude migliaia di molecole di uno specifico neurotrasmettitore. La natura dei neurotrasmettitori è solitamente amminica come la dopamina la serotonina o l'epinefrina, oppure aminoacidica come l'acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA) la glicina o il glutammato. Le vescicole, vengono sintetizzate a livello dell'apparato di Golgi nel corpo cellulare della cellula e da qui portate, tramite il trasporto assonale rapido, al terminale presinaptico. Qui le vescicole vuote si riempiono di neurotrasmettitori tramite **trasportatori attivi** grazie al gradiente elettrochimico che viene stabilito dall'attività di pompe protoniche. In particolare, i trasportatori vescicolari del glutammato, VGluT1-3 consentono l'accumulo del glutammato nelle vescicole sinaptiche dei neuroni eccitatori, mentre i trasportatori vescicolari del GABA, VGAT, consentono l'accumulo dell'acido  $\gamma$ -aminobutirrico nelle vescicole sinaptiche dei neuroni inibitori. Le vescicole riempite del neurotrasmettitore mediante tali trasportatori, vengono poi portate verso la zona attiva (zona specializzata per la liberazione dei neurotrasmettitori) del terminale presinaptico. Le proteine nel terminale presinaptico, sono circa 1000, delle quali un centinaio si pensa essere coinvolte nel processo di eso-/endocitosi delle vescicole sinaptiche. Purificazioni attraverso metodi biochimici hanno identificato tre diversi complessi proteici ognuno con una funzione chiave nel terminale presinaptico. Il **complesso SNARE** [*solubile NSF(N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor*], le cui componenti proteiche sono state divise in due gruppi, v-SNAREs e t-SNAREs, dove la v- e la t- stanno rispettivamente per vescicolare e di membrana. Del primo gruppo fa parte la **sinaptobrevina**, o **VAMP**(*vescicole-associated membrane protein*), mentre al secondo gruppo appartengono la

*syntaxina* e la *SNAP-25* (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*). Questo complesso è essenziale per il processo di fusione delle vescicole con la membrana. Il secondo complesso proteico è formato da Munc18/UNC-18 (*mammalian uncoordinated 18/uncoordinated-18*), Munc13/UNC13, e sinaptotagmina (*syt*), che interagiscono con il complesso SNARE e regolano il processo d'esocitosi delle vescicole. Il terzo complesso è composto da varie proteine, come Piccolo o Bassoon, che formano una struttura a matrice nella zona attiva del terminale presinaptico, necessaria per l'organizzazione dell'esocitosi (Zhen, 2004).



**Fig. 1.3** Rappresentazione schematica del ciclo vitale delle vescicole

Una volta che, le vescicole sinaptiche vengono sintetizzate, riempite del neurotrasmettitore e trasportate nella zona attiva (**Fig. 1.3**), raggiungono la membrana plasmatica e vanno incontro al *priming*, processo catalizzato da proteine citosoliche, inclusi i fattori NSF, le SNAP e l'idrolisi dell'ATP. Durante il *priming* inoltre, Munc13 e Munc18 si legano alla syntaxina contribuendo alla formazione dello SNARE complex. La formazione del complesso fra le v-SNARE e le t-SNARE in configurazione trans (come descritto dettagliatamente in seguito), determina il *docking* delle vescicole. Ora le vescicole sono in grado di rispondere prontamente ai successivi incrementi di Ca<sup>2+</sup>. Infatti all'arrivo di un potenziale si

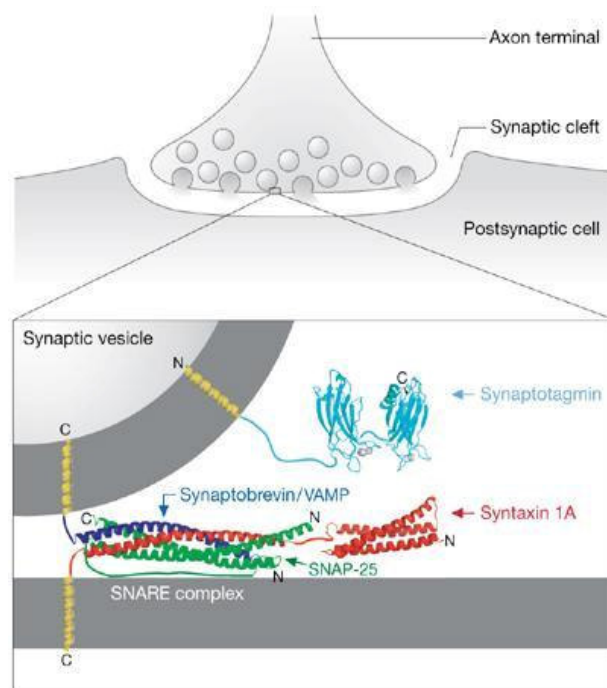
aprono i canali per il calcio, il calcio entrando nella cellula, innesca un cambiamento conformazionale della sinaptotagmina-1; permettendo un legame più stretto del complesso delle SNARE, il quale porta ad un'immediata  *fusione*  delle membrane: la membrana della vescicola si integra con quella plasmatica, permettendo il rilascio del proprio contenuto. Il tempo che intercorre fra l'arrivo di un potenziale e la fusione delle vescicole a livello del terminale presinaptico è all'incirca di 500  $\mu$ s (Sorensen, 2005). Il complesso SNARE viene dissociato dall'azione delle SNAPs (*solubile NSF-attachment protein*) e dal NSF (un ATPasi che lega il complesso SNARE tramite  $\alpha$ -SNAP).

Le proteine della vescicola sono quindi reinternalizzate da un meccanismo mediato dalla clatrina e dalla dinamina o da un'endocitosi non mediata da clatrina. La dinamina permette alla vescicola di staccarsi dalla membrana. Infine, le vescicole perdono il rivestimento di clatrina, la parte luminale viene acidificata dalle pompe protoniche, e tornano verso gli *early endosomes*, con i quali si fondono per eliminare o sostituire le proteine di membrana. Da qui le vescicole vengono rigenerate. Sebbene molte vescicole riciclino tramite l'endosoma, è possibile che alcune vescicole non passino per questa via. Inoltre, le vescicole dopo il rilascio del neurotrasmettitore possono fare endocitosi restando nella zona attiva (*kiss&stay*) o riciclando localmente senza la mediazione della clatrina (*kiss&run*): entrambi sono molto più rapidi rispetto al processo mediato da clatrina (Sudhof, 2004)

### ***1.4 Il complesso SNARE***

La fusione delle membrane è un processo *sine qua non* nella fisiologia cellulare. È infatti un processo critico per la trasmissione neuronale, per la biogenesi delle membrane, per il traffico intracellulare e per la secrezione cellulare. Tale processo è stato investigato per più di 100 anni, ma solo negli ultimi 15 anni, sono stati decifrati il macchinario molecolare ed i meccanismi coinvolti nella fusione delle membrane. Nel 1970 gli studi di D. Papahadjopoulos e collaboratori e

più tardi intorno al 1980 gli studi di vari laboratori tra cui quello di S. Ohki, hanno dimostrato chiaramente che, per la fusione di membrane fosfolipidiche opposte, è in particolar modo necessario il  $\text{Ca}^{2+}$ . Inoltre nel 1990, J. Rothman ed i suoi colleghi hanno dimostrato che, nelle cellule di mammifero, i 3 fattori solubili, (NSF)N-ethylmaleimide-sensitive e le proteine SNAPs legate alla membrana sono coinvolti universalmente nel processo di fusione di membrana. Le proteine SNAP-25 e Sintaxina, dette t-SNAREs e le proteine associate alla vescicola, VAMP, dette v-SNAREs, sono state riconosciute come il macchinario minimo per la fusione (Leabu, 2006). Per “minimo” si intende che il complesso SNARE è il nucleo dell’apparato di neuroesocitosi e che un set addizionale di proteine è richiesto per proprietà specifiche come la regolazione fast-tight, il triggering dipendente dal calcio e l’inibizione degli eventi di fusione spontanei (Montecucco et al, 2005).



**Fig. 1.4** Rappresentazione schematica dello SNARE complex. In blu la Sinaptobrevina, in rosso la sintaxina ed in verde la SNAP-25.

Le proteine dello SNARE complex, mostrano un motivo comune di circa 60 aminoacidi detto *SNARE motif*, responsabile dell’interazione tra le proteine. È

infatti la regione dove VAMP (v-SNARE) lega saldamente la regione corrispondente della syntaxina e quella della SNAP-25 (t-SNARE) per formare lo SNARE complex (**Fig. 1.4**) caratterizzato da una eccezionale stabilità (Kavalali, 2002). Prima di analizzare nel dettaglio l'associazione delle tre proteine per la formazione del complesso SNARE, è opportuno considerare le caratteristiche molecolari delle singole proteine.

#### 1.4.1 VAMP/Sinaptobrevina

VAMP è una proteina di membrana di 13 kDa della vescicola sinaptica, caratterizzata da 4 domini funzionali. L'N-terminale è ricco di proline e la sua sequenza è isoforma specifica; la regione seguente è ben conservata e contiene una regione *coiled-coil* e siti di fosforilazione per una proteina chinasi di tipo II  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina dipendente e per una caseina chinasi di tipo II. La proteina è ancorata alla membrana della vescicola sinaptica tramite un singolo dominio transmembrana (TM) seguito da una coda intraluminale poco conservata e di lunghezza variabile, dovuta a *splicing* alternativo. Sono state identificate, sulla base della similitudine della sequenza strutturale 10 diverse isoforme, solo 3 delle quali sono state caratterizzate per intero, VAMP-1, VAMP-2 (espressa prevalentemente nei neuroni) e cellubrevin. Le isoforme di VAMP sono presenti in tutti i tessuti dei vertebrati, con livelli di espressione e distribuzione diversi (Schiavo et al, 2000).

#### 1.4.2 Syntaxina

La Syntaxina è una proteina di membrana di 35kDa, localizzata prevalentemente nel plasmalemma neuronale. Sono legate alla membrana presinaptica tramite un segmento transmembrana (TM) connesso ad un corto dominio C-terminale extracellulare e posseggono una grossa porzione citosolica che include due domini con caratteristiche strutturali differenti. Il dominio N-terminale (residui 1-120) è formato da tre lunghe  $\alpha$ -eliche che sembra siano coinvolte nell'interazione proteina-proteina, mentre la porzione centrale (180-262) contribuisce a formare una struttura a 4 eliche superavvolta quando interagisce con le altre proteine dello SNARE complex. Nel tessuto nervoso esistono moltissime isoforme della syntaxina costituendo pertanto, una grande famiglia proteica con più

di 20 isoforme nei mammiferi e con omologhi nel lievito e nelle piante (Schiavo et al, 2000).

#### 1.4.3 Snap25

SNAP-25 è una proteina di membrana di 25kDa, che non presenta il tipico dominio transmembrana (TM) infatti la sua localizzazione in membrana avviene tramite cisteine palmitolate, situate nel mezzo della catena polipeptidica. SNAP-25 è conservata dal lievito all'uomo, con una piccola variazione in lunghezza e dimensione. Inoltre è in grado di autoassemblarsi in un dimero legato da un ponte disolfuro sia *in vivo* che *in vitro*. Esistono due isoforme, a- e b-, generate per *splicing* alternativo, dove la forma b- è predominante nel tessuto nervoso adulto. Le due isoforme infatti sono differenzialmente regolate nello sviluppo del cervello, l'mRNA della SNAP-25a è predominante nei primi stadi di sviluppo mentre l'espressione dell'isoforma -b aumenta durante lo sviluppo postnatale, quando la localizzazione della proteina passa dal corpo cellulare al neurite e al terminale presinaptico. Si conoscono inoltre una forma breve (SNAP-23) e una lunga (SNAP-29), che possono vicariare per SNAP-25. La SNAP-23 è espressa ubiquitariamente, è una t-SNARE che lega con alta affinità sia la VAMP che la syntaxina e sembra sia in grado sostituire funzionalmente la SNAP-25 nella secrezione neuroendocrina (Sadoul et al, 1997). E' stato infatti osservato, mediante esperimenti di immunoprecipitazione, che la SNAP-23 forma un complesso stabile sia con la syntaxina che con la cellubrevina, un analogo di VAMP (Hepp et al, 1999).

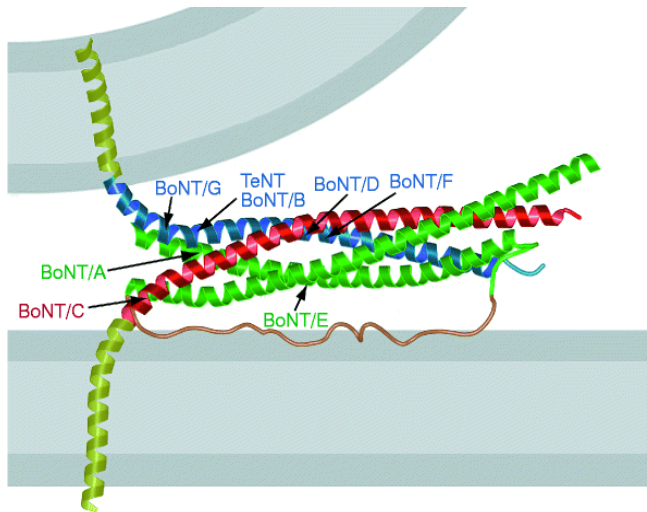
Una volta considerate le caratteristiche strutturali di VAMP SNAP-25 e Syntaxina è opportuno analizzare in che modo esse si associano. Prima della fusione delle membrane, infatti le proteine SNARE appaiano i loro domini *coiled-coil* a partire dalle sequenze N-terminali nello SNARE complex (con un rapporto 1:1:1). L'appaiamento procede sino a creare un legame di quattro eliche di circa 12 nm con un orientamento parallelo, che porta i segmenti transmembrana di VAMP e della syntaxina a stretto contatto fra loro e vicino al segmento C-terminale e

centrale di SNAP-25. Questo complesso SNARE è in configurazione *trans*-rispetto ai due domini transmembrana, uno nella vescicola e l'altro nella membrana cellulare. In questa conformazione la superficie del complesso ha il maggior numero di solchi e cariche esposte, permettendo l'interazione con altre proteine. Questo complesso porta le due membrane in contatto, permettendo la fusione. Dopo la fusione, il complesso passa in modalità *cis*-, con entrambi i domini transmembrana nella stessa membrana. A causa dell'estrema stabilità del complesso eterotrimerico che si viene a formare è necessario l'intervento di altre proteine (NSF, SNAPs e altre) per svolgere il legame che si forma fra le quattro eliche e recuperare la vescicola sinaptica dalla membrana. Negli ultimi anni si è andata sviluppando l'idea che diversi complessi SNARE vengono connessi tramite legami di SNAP-25 a formare una struttura a rosetta attorno al poro di fusione, e che questo anello di complessi SNARE è necessario per l'esocitosi regolata rapida (Montecucco, 2005).

### ***1.5 Analisi del complesso SNARE mediante le tossine botuliniche***

Le neurotossine esistenti sono specifiche per il proprio bersaglio molecolare, sono infatti il risultato di una lunga co-evoluzione tra le specie che le producono e le specie target. Per questo, lo studio del loro meccanismo d'azione può rivelare alcuni aspetti fondamentali della fisiologia nervosa. Le neurotossine botuliniche (BoNT) prodotte dal batterio *Clostridium Botulinum* bloccano la trasmissione sinaptica interferendo direttamente e selettivamente sul rilascio del neurotrasmettitore (Schiavo et al., 2000). Sono stati identificati sette sierotipi diversi di BoNT, denominati con le lettere da A a G ognuno dei quali specifico per un determinato target. La specificità dell'attività proteolitica delle neurotossine botuliniche è stata cruciale per elucidare le interazioni delle SNARE come mediatori essenziali nella fusione vescicolare sinaptica. BoNT di tipo B, D, F e G tagliano VAMP, mentre BoNT/A e BoNT/E tagliano SNAP-25 e BoNT/C la

syntaxina (Osen-Sand, 1996) (**Fig. 1.5**). Sembra che questa specificità delle BoNT verso le tre proteine sia dovuta alla presenza di un motivo di riconoscimento detto appunto motivo SNARE. In VAMP ne sono presenti 2 copie (V1 e V2), così come nella syntaxina (x1 e x2) mentre nella SNAP-25 ne sono presenti 4 copie (S1, S2, S3 e S4).



**Fig. 1.5** Specificità dell'attività proteolitica delle neurotossine botuliniche. BoNT di tipo B, D, F e G tagliano VAMP (in blu), mentre BoNT/A e BoNT/E tagliano SNAP-25 (in verde) e BoNT/C la syntaxina (in rosso)

La VAMP viene tagliata in un solo punto, che è però diverso per ciascuna delle quattro neurotossine botuliniche VAMP specifiche. In ogni caso viene rimossa una gran parte della porzione citosolica della proteina e questo previene la formazione del complesso trimerico. Lo stesso avviene nel caso della syntaxina. Diverso è il caso di SNAP-25, da cui la neurotossina botulinica A rimuove un piccolo segmento carbossi-terminale di nove amminoacidi. Quindi, l'eliminazione di meno del cinque per cento della massa totale di SNAP-25 è sufficiente a bloccarne la funzione, indicando che questa porzione della molecola gioca un ruolo fondamentale nel funzionamento dell'apparato di neuroesocitosi.

Inizialmente, le tossine botuliniche sono state utilizzate per lo studio del rilascio del neurotrasmettitore a livello delle sinapsi degli invertebrati, portando alla conclusione che le proteine SNARE non mediano il “docking” delle vescicole

alla zona attiva sebbene l'esocitosi in risposta a stimolazione indotta da potenziali d'azione richieda le proteine SNARE. E' stata inoltre, osservata una persistenza del rilascio spontaneo del neurotrasmettitore, interpretando tale risultato con la presenza di pathway alternativi che richiedono presumibilmente un set di SNARE in grado di mediare questa forma di rilascio non regolata (Hua et al, 1998). Analogamente, sono stati effettuati studi nelle sinapsi di mammiferi per analizzare la funzione delle SNARE. Anche in questo caso, in seguito al trattamento con le tossine botuliniche e tetaniche, il rilascio indotto da stimolazione viene bloccato mentre quello spontaneo viene ridotto in maniera significativa indicando una SNARE alternativa per questa forma di rilascio. Inoltre a seguito del trattamento con esteri del forbole (agente che promuove l'esocitosi mediante meccanismi che non necessitano aumenti nella concentrazione del  $Ca^{2+}$ ), è stata osservata l'assenza degli effetti stimolatori sul rilascio del neurotrasmettitore. Questo risultato è stato interpretato assumendo il coinvolgimento di poche proteine SNARE non danneggiate (Capogna et al, 1997). Se così fosse, il taglio delle SNARE, con le tossine comprometterebbe in modo sostanziale la sensibilità al  $Ca^{2+}$  del rilascio del neurotrasmettitore piuttosto che abolire di per se la fusione. Recenti analisi strutturali e funzionali, in cellule cromaffine e in topi knockout delle complessine (molecole che legano il "core" complex e la sinaptobrevina) hanno supportato tali conclusioni (Sorensen et al 2002; Reim et al., 2001).

Tutti questi risultati, pertanto, supportano un ruolo delle SNARE e/o dei suoi interattori molecolari nella regolazione della dipendenza del  $Ca^{2+}$  alla fusione.

L'analisi e lo studio delle proteine del complesso SNARE mediante l'utilizzo delle tossine botuliniche sono stati fondamentali per la dimostrazione della loro funzione, tuttavia tali approcci, sebbene basati su trattamenti a breve termine, presentano delle limitazioni dovute al fatto che tali tossine non possono tagliare le proteine che formano complessi rigidi con le altre SNARE (Hayashi et al, 1994). Tale considerazione può spiegare perché persiste il rilascio spontaneo del neurotrasmettitorie anche in seguito al trattamento con la tossina.

## ***1.6 Analisi genetica delle funzioni del complesso SNARE***

Un approccio alternativo per esaminare la funzione del complesso SNARE è l'inattivazione genetica delle proteine che lo costituiscono. In *Drosophila* (con sinaptobrevina mutante), ad esempio, il rilascio spontaneo del neurotrasmettitore non è influenzato considerevolmente sebbene, a frequenze di stimolazione basse, il rilascio indotto da potenziali d'azione è assente. In *C. elegans* (con synaptobrevina inattiva), alcune abilità di movimento sono conservate, indicando una funzione sinaptica danneggiata ma persistente (Nonet et al, 1998). Questi esperimenti ipotizzano che le interazioni che coinvolgono le v-SNARE non risultano essenziali per la fusione delle vescicole sinaptiche, sebbene incrementino l'efficienza e la velocità del processo di esocitosi. Una spiegazione per tale risultato è la possibile sostituzione della sinaptobrevina2 con altri v-SNARE neuronali.

Una delle domande di maggior interesse riguarda la possibile esistenza di differenti meccanismi molecolari alla base del rilascio spontaneo ed evocato o se gli eventi di rilascio spontaneo sono dovuti ad una probabilità di fusione molto bassa delle vescicole che vengono rilasciate in assenza di stimolazione. Alcune evidenze mostrano che gli eventi di rilascio spontaneo nelle sinapsi emergono da un traffico vescicolare costitutivo e che la synaptobrevina-2 viene impiegata solamente nella fusione guidata da potenziali d'azione. Altre evidenze dimostrano come tale possibilità non sia veritiera. Innanzitutto, con l'analisi del riciclo vescicolare mediante metodi ottici è stato dimostrato che le vescicole rilasciate spontaneamente possono essere prontamente combinate con il pool di riciclo dipendente dall'attività (Murty et al, 1999). Inoltre nei knockout della sinaptobrevina-2, è stata rilevata una riduzione paragonabile, evocata da stimolazione ipertonica, nell'ampiezza del rilascio del neurotrasmettitore e nella frequenza degli eventi spontanei. Le vescicole che possono essere rilasciate mediante stimolazione ipertonica corrispondono al pool che viene prontamente rilasciato. Quindi, nel rispetto delle precedenti ipotesi, una riduzione in tale pool ridurrebbe la propensione alla fusione spontanea.

D'altro canto, nella *Drosophila*, l'eliminazione della syntaxina (t-SNARE), ha rivelato un fenotipo maggiormente rigoroso (Schulze et al, 1995). In questi mutanti è stata infatti rilevata una perdita completa della neurotrasmissione spontanea ed evocata in aggiunta a diverse anomalie nello sviluppo. Tali osservazioni possono essere parzialmente spiegate dall'interazione della syntaxina con molecole diverse dalle SNARE, come ad esempio munc-18. Tale premessa è supportata da recenti esperimenti effettuati su topi knockout per l'analisi della SNAP25 che hanno mostrato un fenotipo reminiscente delle delezioni v-SNARE. Le registrazioni sinaptiche nelle giunzioni neuro-muscolari fetali di ratti mancanti di SNAP25 hanno mostrato un aumento nell'ampiezza e nella frequenza dei potenziali di placca spontanei, sebbene la neurotrasmissione evocata fosse completamente abolita (Washbourne et al, 2002). Nelle registrazioni ottenute dalle sinapsi centrali, è stata osservata una diminuzione nella frequenza delle miniature delle correnti sinaptiche in assenza del rilascio evocato dei neurotrasmettitori  $Ca^{2+}$ -dipendenti. È importante notare come SNAP-25 contribuisca con due 'motivi' SNARE nel complesso sinaptico centrale e, tuttavia, se il fenotipo forte dei ko della syntaxina è dovuto solamente alle interazioni delle SNARE, ci si aspetta che questo venga imitato dalla perdita di SNAP-25.

Nel complesso, tali risultati supportano l'idea che il complesso SNARE sia un substrato sopra il quale agiscano altre molecole di regolazione. SNARE potrebbe semplicemente avere una funzione catalitica in grado di incrementare l'efficienza e la stabilità dei processi di esocitosi regolata. Tuttavia il suo danno diminuisce in maniera sostanziale il rilascio di neurotrasmettitori senza abolirlo completamente.

Una possibile alternativa a tale interpretazione è quella che altre SNARE possano sostituire la perdita di una particolare SNARE all'interno dei neuroni mutanti. Tale ipotesi è coerente con la capacità di SNARE non affini (che non hanno funzione nella fusione delle vescicole sinaptiche) di formare complessi centrali rigidi (Scale set al, 2001; Fasshauer et al, 1999; Yang et al, 1999). Tuttavia il reclutamento di v-SNARE non affini, all'interno del percorso di riciclo delle vescicole sinaptiche violerebbe la specificità funzionale per le SNARE rilevate in altre preparazioni. In aggiunta, il fatto che la restante fusione in tali mutanti non sia

una semplice versione scaled-down della normale fusione in rispetto alla sua dipendenza dal  $\text{Ca}^{2+}$  suggerisce una inadeguatezza degli SNARE di compensazione. Tale inadeguatezza implica che le proteine SNARE sono caratterizzate da due funzioni separate nel processo di fusione della membrana: una funzione esecutiva nel quale diverse SNARE risultano intercambiabili, ed una funzione regolatoria per la quale una particolare SNARE risulta invece specifica (Schoch et al, 2001).

## *Capitolo 2*

# Scopo del lavoro

Nell'ambito del sistema nervoso, le sinapsi sono elementi chiave nella trasduzione dei segnali elettrici e nei meccanismi di plasticità. Schematicamente, esse sono strutture bi-modulari costituite da un elemento presinaptico, da cui parte lo stimolo nervoso, ed un elemento postsinaptico, a cui il segnale arriva e da cui viene trasdotto.

La specificità funzionale delle sinapsi dipende dalla presenza al loro interno di molecole caratterizzanti e dalla loro diversa combinazione nonché dal microcircuito nel quale sono immerse.

Recenti studi hanno messo in evidenza che nelle sinapsi glutamatergiche (sinapsi eccitatorie), la presenza nel compartimento presinaptico di specifiche isoforme molecolari dei trasportatori vescicolari del glutammato (VGluTs) sia correlata alle diverse proprietà fisiologiche di tali sinapsi. Infatti, è stato osservato che sinapsi eccitatorie ad alta probabilità di rilascio esprimono preferenzialmente il VGluT2 mentre sinapsi a bassa probabilità di rilascio esprimono VGluT1. La motivazione di tale differenza non è stata ancora chiarita del tutto. Un esempio tipico di tale correlazione è presente nel cervelletto in cui esistono due principali

afferenze eccitatorie che contattano il medesimo bersaglio postsinaptico (cellule del Purkinje), ma hanno proprietà funzionali profondamente diverse: le fibre parallele che esprimono preferenzialmente il VGluT1 e le fibre rampicanti che esprimono il VGluT2.

Ancora più di recente è stato osservato che diverse isoforme delle proteine appartenenti al complesso SNARE sono preferenzialmente espresse in specifiche sinapsi piuttosto che in altre. Ad esempio in neuroni ippocampali GABAergici sembra che la SNAP-25 sia assente mentre sia presente la sua isoforma SNAP-23. In tal caso sono state riscontrate differenze nella risposta al calcio. Infatti, in presenza di SNAP-25 la risposta al calcio viene ridotta rispetto alla SNAP-23. Da queste studi è emerso un fatto molto interessante, che la SNAP-25 oltre ad essere coinvolta meccanicamente nel rilascio vescicolare ha anche un ruolo regolatorio a livello delle sinapsi. Inoltre, è stato osservato che in corteccia, nell'ambito delle sinapsi glutamatergiche, la SNAP-25 è preferenzialmente presente nelle sinapsi VGluT1 positive.

Ad oggi, nel cervelletto non è stata condotta un'analisi approfondita riguardo la distribuzione dello SNARE complex ed in particolare delle isoforme SNAP. Scopo della tesi pertanto è stato quello di caratterizzare la distribuzione della SNAP-25 e della SNAP-23 nelle sinapsi glutamatergiche e GABAergiche della corteccia cerebellare tramite tecniche di immunofluorescenza e microscopia elettronica. In conclusione, trovare una correlazione tra le proprietà fisiologiche di una sinapsi e la presenza della SNAP-25 potrebbe aiutare a capire i meccanismi molecolari alla base della trasmissione sinaptica e della plasticità neuronale.

## *Capitolo 3*

# Materiali e Metodi

Nel seguente studio vengono utilizzati ratti Wistar di età adulta (di circa 2 mesi di età) e ratti di età compresa tra P8 e P14. Tutti gli animali vengono sottoposti a perfusione transcardiaca. Gli esperimenti sono in accordo con le linee guida della legge italiana per l'utilizzo di animali da laboratorio (DL 116/92) ed approvati dal Ministero Italiano della Salute.

### ***3.1 Iniezione in vivo***

Tutte le procedure chirurgiche vengono realizzate sotto anestesia generale su ratti adulti utilizzando chloral Hydrate al 33% (0,033 gr x 100 gr di peso del ratto per via i.p). I ratti vengono quindi posizionati sullo stereotassico e sottoposti ad un'operazione chirurgica per esporre il cervelletto. In particolare viene effettuata un'iniezione di BoNT-A, tramite un capillare di vetro ( O.D. 1 mm, I.D. 0.5 mm, 10 cm lunghezza; Sutter INs) collegato ad un picospritzer, (2µl, 30nM, List Biological lab) in un unico punto del parenchima cerebellare all'altezza del

verme. Tale concentrazione risulta la dose massima non letale per poter osservare l'effetto del taglio proteolitico. A concentrazioni più basse, 5 e 15 nM la marcatura con l'anticorpo non risulta invece evidente così come a 30nM. Inoltre poiché la BoNT-A è nota per avere effetti a lungo termine sul blocco del rilascio vescicolare, viene effettuata un'unica iniezione. A completamento della chirurgia e dopo successiva fase di recupero, l'animale viene reintrodotta nella gabbia.

Un sottogruppo di ratti viene ulteriormente sottoposto ad impianto con una minipompa osmotica per infondere nel parenchima cerebellare la TTX (Tocris, 70 µm).

Tutti gli animali, sia quelli trattati solamente con la BoNTA che quelli trattati con la BoNTA e la TTX, vengono sacrificati dopo una settimana. Dopo essere stati perfusi (come descritto nel paragrafo 3.2) le sezioni vengono processate con l'anticorpo anti-calbidina D-28K e l'anticorpo anti-Snap25 tagliato da BoNTA (per ulteriori dettagli vedi **Tabella 3.1**).

### ***3.2 Istologia ed Immunofluorescenza***

Gli animali, vengono anestetizzati e fissati per perfusione transcardiaca. La procedura standard di perfusione consiste nell'inviare in circolo, attraverso l'aorta, una soluzione contenente il fissativo (500 ml di paraformaldeide al 4%). Dopo la perfusione i cervelli vengono prelevati e post-fissati nuovamente in paraformaldeide al 4% per 2 ore. Vengono quindi immersi in una soluzione di saccarosio al 30%, e conservati ad una temperatura di 4°C.

Il cervelletto viene separato dalla restante parte del cervello e congelato per poi essere successivamente sezionato al microtomo congelatore per ottenere sezioni sagittali di 30 µm di spessore che vengono processate in seguito. Il sezionamento con il microtomo, richiede un rapido congelamento del campione ed è proprio per questo motivo che è necessaria un'immersione del cervello in una soluzione crio-protettiva, quale il saccarosio. Le sezioni ottenute vengono infine processate negli esperimenti di immunofluorescenza.

Le sezioni, una volta selezionate, vengono poste in camere di incubazione; quindi pre-incubate per circa 1 ora con NDS (Normal Donkey Serum) al 10% in PBS (0, 02M) e Triton-X100 allo 0, 25% (TPBS), e processate con i seguenti anticorpi primari: anti-SNAP-25, anti-SNAP-25 Tagliata, anti-SNAP-23, anti-VGAT, anti-VGluT1, anti-VGluT2, anti-VAMP2 anti-Calbindin D28K (per una comprensiva lista degli anticorpi utilizzati vedere la **Tabella 3.1**).

L'incubazione dell'anticorpo primario è fatta in TPBS. Successivamente quando l'incubazione con gli anticorpi primari è terminata, le fettine vengono sottoposte a 3 lavaggi in TPBS, ognuno di 10 minuti circa, e poi incubate con l'anticorpo secondario fluorescente per 2 ore a temperatura ambiente. Precisamente vengono utilizzati anticorpi secondari coniugati ai fluorocromi Cy2 e Cy3 e Cy5 (Jackson ImmunoResearch, diluiti 1:200) opportunamente accoppiati.

- Cy2 assorbe luce blu (492 nm) ed emette una fluorescenza intensa verde (510 nm);
- Cy3 assorbe luce giallo-verde (550 nm) ed emette una fluorescenza rossa (570 nm);
- Cy5 assorbe luce giallo-rosso (650 nm) ed emette una fluorescenza blu (670 nm).

L'incubazione viene eseguita in TPBS. Per testare la specificità dell'anticorpo secondario, le sezioni vengono trattate in modo identico a quelle sperimentali omettendo l'incubazione con l'anticorpo primario. Nessuna marcatura viene osservata in tali condizioni. Trascorse le 2 ore, le fettine vengono sottoposte a 3 lavaggi in TPBS, ognuno di 10 minuti circa, montate su vetrini polilisinati, fatte asciugare al buio, ed infine coperte utilizzando GEL/MOUNT (Biomedica) ed un vetrino coprioggetto. Le immagini ottenute vengono acquisite utilizzando un microscopio confocale (Zeiss, LSM 510) con obiettivi 63x ad immersione (con un eventuale zoom elettronico) e 20x. Per ottenere una buona qualità dell'immagine (2048x2048 pixel), le condizioni di acquisizioni vengono standardizzate in modo da non raggiungere la saturazione del segnale per ciascun canale. Vengono inoltre acquisite delle immagini seriali ogni 0,5 micron.

<b>Anticorpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Specie</b>	<b>Dil.e</b>	<b>O.N. a 4 °C</b>	<b>Struttura riconosciuta</b>
Anti-SNAP-25	Sysy SMI81	Mouse	1:5000	1	La proteina di membrana , SNAP-25, del complesso SNARE
Anti-SNAP-25Tg	Gentilmente concesso da C. Montecucco	Rabbit	1:500	1	La SNAP-25 tagliata dalla BoNTA
Anti-SNAP-23	Covalab	Rabbit	1:100	3	La proteina di membrana SNAP-23, isoforma di SNAP-25
Anti-VGluT1 (Trasportatore vescicolare del Glutammato 1)	Chemicon	Pig	1:5000	1	Nel cervelletto marca le terminazioni delle f.parallele nel MI, e nel Gr una sottopopolazione di muscoidi
Anti-VGluT2 (Trasportatore vescicolare del Glutammato 2)	Chemicon (ms) Sysy (Rb)	Mouse Rabbit	1:3000 1:500	3 1	Nel cervelletto marca le terminazioni delle f.rampicanti nel MI, e nel Gr una sottopopolazione di muscoidi
Anti-VGAT (Trasportatore vescicolare del GABA)	Sysy	Mouse Rabbit	1:500	1	Nel cervelletto marca le terminazioni delle stellate e delle basket nel MI, e nel Gr le terminazioni delle Golgi
Anti-sintaxin1	SySy	Mouse	1:200	1	La proteina di membrana , Sintaxin1, del complesso SNARE
Anti-VAMP2	SySy	Mouse	1:500	1	La proteina vescicolare , VAMP2, del complesso SNARE
Anti-Calbindin D28K	Swant	Mouse	1:2000	1	Le cellule di Purkinje

**Tabella 3.1** Abbreviazioni: **Dil.e** Sta per diluizione dell'anticorpo utilizzata; **O.N.** notti di incubazione; MI strato molecolare; Gr strato granulare

### 3.3 Analisi di colocalizzazione

La colocalizzazione viene definita come la presenza di due o più tipi di molecole fluorescenti localizzate nella stessa regione. Fisicamente, questo significa che i fluorocromi emessi occupano lo stesso pixel nell'immagine; biologicamente, significa che due o più molecole sono attaccate sulla stessa struttura cellulare.

Pertanto, tramite un software di analisi di immagini (Image J) viene calcolato, per ciascuna regione di interesse, il *coefficiente di overlap* (  $r$  ) in accordo con Manders, (Manders et al. 1993), che rappresenta un indice del reale grado di colocalizzazione tra due segnali che va da 0 ad 1. Il valore 0 indica non colocalizzazione, 1 completa colocalizzazione.

$$r = \frac{\left( \sum_i (A_i \times B_i) \right)}{\left( \sum_i (A_i)^2 \times \sum_i (B_i)^2 \right)}$$

Nella formula,  $r$  sta per coefficiente di overlap mentre  $A_i$  &  $B_i$  indicano rispettivamente i valori di grigio dei voxel del canale A e del canale B.

I dati ottenuti si basano su osservazioni effettuate su diversi animali. In particolare per l'analisi quantitativa sono stati utilizzati 3 animali per ognuno dei quali sono state acquisite almeno 5 immagini valide dal punto di vista dell'acquisizione, per ogni regione del cervelletto analizzata (strato molecolare, strato granulare). Di ogni immagine seriale è stato scelto il piano focale ottimale in modo da avere ciascun marcatore con la massima intensità di fluorescenza non saturante.

E' stata scelta la doppia marcatura VGAT/VGluT1 nei glomeruli cerebellari come controllo negativo. In tali strutture infatti le terminazioni sinaptiche e quindi i rispettivi marcatori sono a stretto contatto tra di loro ma non risultano colocalizzanti (come dimostrato dal valore estremamente basso del

coefficiente  $r$ ). Come controllo positivo è stata scelta la doppia marcatura VGluT2/VGluT1 nei glomeruli cerebellari. In tali strutture infatti alcune muscoidi sono caratterizzate dalla presenza di entrambi i trasportatori, pertanto il coefficiente  $r$ , rappresentando il coefficiente tra antigeni correlati, è molto elevato.

In sequenza le operazioni effettuate per l'analisi delle immagini è la seguente:

- acquisizione, al microscopio confocale utilizzando gli stessi parametri per ogni caso;
- analisi delle immagini, utilizzando ImageJ;
- calcolo del coefficiente  $r$  per ogni area di interesse
- analisi statistica dei dati, mediante test One way ANOVA.

### ***3.4 Preparazione del campione per la microscopia elettronica e marcatura in postembedding immunogold per SNAP-25 e SNAP-23***

La procedura che comporta il congelamento del tessuto e l'inclusione a basse temperature nella resina Lowicryl HM20 consente la conservazione dei siti antigenici che con i classici metodi di inclusione potrebbero essere danneggiati. Con tale metodica sono quindi state effettuate le marcature la SNAP-25 e la SNAP-23.

Pertanto, dopo la perfusione dell'animale, il cervelletto viene tagliato al vibratomo in sezioni sagittali di 500  $\mu\text{m}$  di spessore. Le sezioni vengono quindi congelate in un cilindro contenente isopropano raffreddato con azoto liquido (MM80 E cryofixation apparatus, Reichert, Wien, Austria) e trasferite in un apparato di criosostituzione (CS Auto, Leica) in contenitori metallici contenenti acetato di uranile (0.5%) preparato in metanolo anidro (-90°C). La temperatura viene portata fino a -50°C in modo graduale. Infine i campioni vengono infiltrati

con la resina Lowicryl HM20 (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Germany) che polimerizza con l'esposizione a radiazioni ultraviolette (UV).

Sezioni fini di 90-110 nm sono raccolte su retini in nichel e sottoposte alla marcatura con le particelle di oro colloidale coniugate ad anticorpi. Le sezioni vengono trattate con una soluzione satura di NaOH in etanolo assoluto per 2-3 secondi, lavate con acqua bidistillata e incubate in sequenza nelle seguenti soluzioni (a temperatura ambiente): (1) 0.1% sodioboroidruro e glicina (50 mM) in tampone fosfato (TBST, 10 min); (2) albumina sierica umana (HSA) al 2% in TBST (10 min); (3) anticorpi primari (mouse anti-SNAP-25, rabbit anti-SNAP-23 o SNAP-25/SNAP-23) diluiti 1:500 in TBST contenente HSA al 2% (overnight); (4) lavaggi in TBST e HSA al 2% (10 min); (5) anticorpo secondario accoppiato a particelle di oro colloidale di 10 nm per le singole marcature (SNAP-25 o SNAP-23), di 10nm e 20nm per le doppie marcature (SNAP-25, 20nm/SNAP23, 10nm) diluiti 1:20 in TBST con HSA al 2% e polietilenglicole allo 0.05% (1 ora).

I retini vengono lavati in acqua bidistillata e le sezioni contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo. Infine le sezioni vengono esaminate al microscopio elettronico.

Nello strato molecolare della corteccia cerebellare, la densità media della SNAP-25 e della SNAP-23 viene quindi quantificata sulla base del numero di particelle di oro colloidale/area del terminale presinaptico.

## *Capitolo 4*

# Risultati

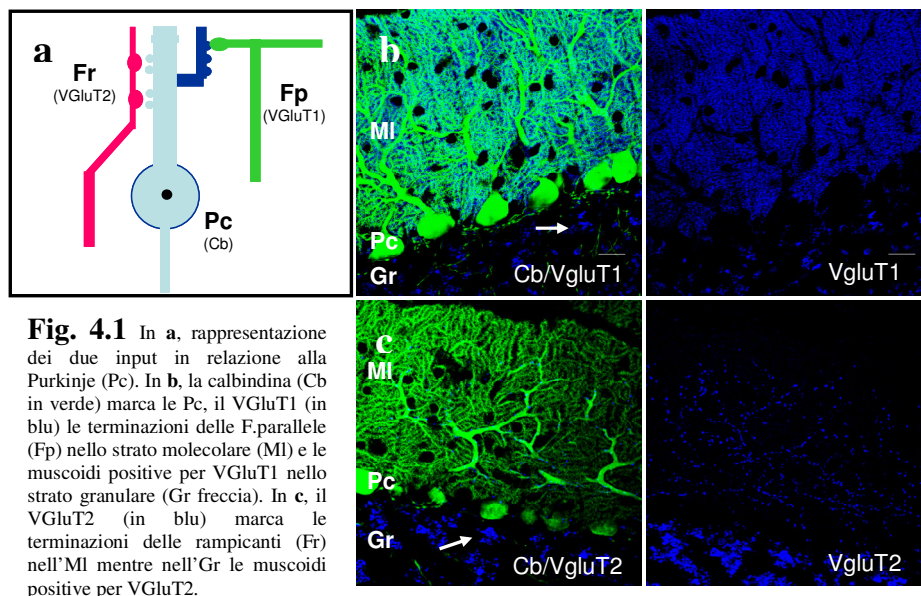
### ***4.1 Caratterizzazione delle sinapsi glutamatergiche e gabaergiche nella corteccia cerebellare***

Prima di analizzare nel dettaglio i risultati ottenuti nel seguente lavoro, è opportuno ricordare brevemente le varie connessioni sinaptiche che caratterizzano lo strato molecolare e lo strato granulare del cervelletto. Nello strato molecolare le terminazioni delle fibre parallele, input glutamatergico del cervelletto, effettuano contatti sinaptici con la porzione distale del dendrite delle cellule di Purkinje, caratterizzato dalla presenza di numerose spine; le terminazioni delle fibre rampicanti (anch'esse glutamatergiche) contattano invece la porzione prossimale del dendrite (**Fig. 4.1a**). Tali terminazioni, possono essere ben distinte tramite la tecnica di immunofluorescenza grazie all'utilizzo di anticorpi diretti contro i trasportatori vescicolari del glutammato (VGluTs).

La marcatura evidenziata dall'anticorpo perVGluT1 appare puntinata ed omogeneamente distribuita in tutto lo strato molecolare poiché marca selettivamente le vescicole sinaptiche delle terminazioni delle fibre parallele (blu,

**Fig. 4.1b)** mentre il segnale dell'anticorpo per VGluT2 identifica le vescicole sinaptiche delle terminazioni delle fibre rampicanti (blu, **Fig. 4.1c**) che nello strato molecolare decorrono lungo l'albero dendritico principale delle cellule del Purkinje marcate con anticorpo anti calbindina (verde **Fig. 4.1b-c**).

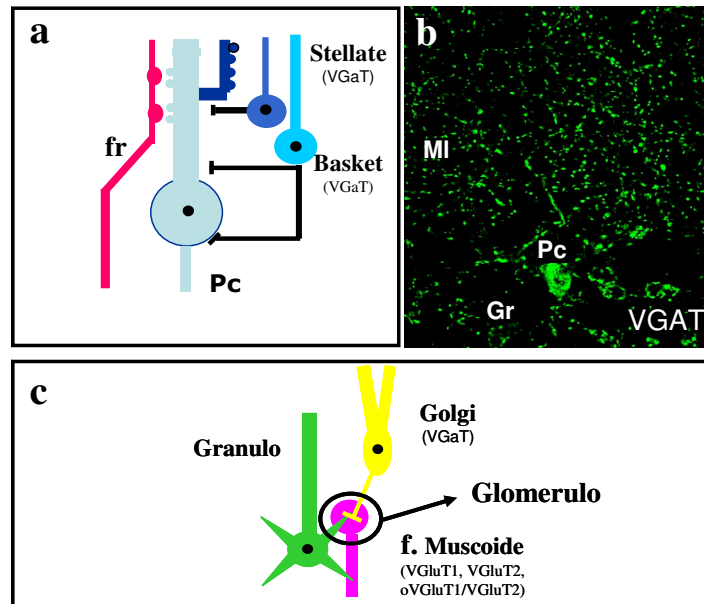
In tale strato inoltre, l'attività delle cellule del Purkinje viene modulata dalle cellule stellate e dalle cellule a canestro, interneuroni inibitori che utilizzano il GABA come neurotrasmettitore. Le cellule stellate possiedono assoni brevi che stabiliscono contatti sinaptici con i dendriti delle cellule del Purkinje, mentre gli assoni delle cellule a canestro decorrono perpendicolarmente alle fibre parallele e stabiliscono contatti sinaptici con i corpi cellulari delle cellule di Purkinje (**Fig. 4.2a**). Per visualizzare le terminazioni di tali interneuroni inibitori, abbiamo utilizzato l'anticorpo contro il trasportatore vescicolare del GABA (VGAT in verde, come mostrato in **Fig. 4.2b**).



**Fig. 4.1** In a, rappresentazione dei due input in relazione alla Purkinje (Pc). In b, la calbindina (Cb in verde) marca le Pc, il VGluT1 (in blu) le terminazioni delle F.parallele (Fp) nello strato molecolare (MI) e le muscoidi positive per VGluT1 nello strato granulare (Gr freccia). In c, il VGluT2 (in blu) marca le terminazioni delle rampicanti (Fr) nell'MI mentre nell'Gr le muscoidi positive per VGluT2.

Lo strato granulare (Gr, come si osserva in **Fig. 4.1b-c** e **Fig. 4.2b**) è invece caratterizzato dai glomeruli a livello dei quali i dendriti delle cellule dei granuli stabiliscono complessi rapporti sinaptici con l'espansione a forma di bulbo di una singola fibra muscoide e con le terminazioni inibitorie delle cellule del Golgi (come mostrato in **Fig. 4.2c**). Le fibre muscoidi esprimono VGluT1 o

VGluT2, ma molte singole muscoidi esprimono entrambi i trasportatori, le terminazioni inibitorie delle Golgi esprimono invece il VGAT

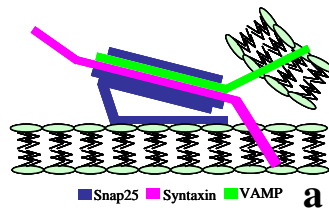


**Fig. 4.2** In a, rappresentazione dei 2 input GABAergici (Stellate e Basket), in relazione alla cellula di Purkinje (Pc). In b, il VGaT (in verde) marca selettivamente le terminazioni inibitorie delle cellule Basket e delle Stellate nello strato molecolare (MI) e le terminazioni delle Golgi nello strato granulare (Gr come indicato dalla freccia). In c, rappresentazione schematica del glomerulo.

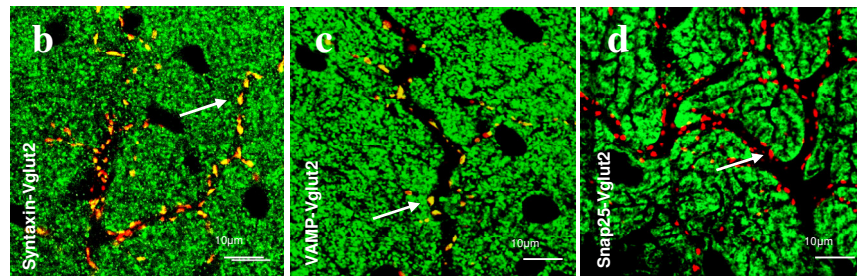
#### 4.2 SNARE complex nelle terminazioni delle fibre rampicanti

Il complesso SNARE (come mostrato in **fig. 4.3a**) è costituito generalmente dalla proteina vescicolare *sinaptobrevina*, detta *VAMP*, e dalle proteine di membrana *syntaxina* e *SNAP-25*. Al fine di determinare se le componenti del complesso SNARE sono presenti nelle terminazioni glutamatergiche della corteccia cerebellare abbiamo effettuato esperimenti di immunofluorescenza utilizzando fettine di cervelletto derivate da ratti adulti. Abbiamo inizialmente effettuato una doppia marcatura per ciascuna proteina del complesso SNARE con il VGluT2: Syntaxina/VGluT2, VAMP/VGluT2 e SNAP-

25/VGluT2. L'anticorpo anti-Syntaxina riconosce la syntaxina 1 (verde in **Fig. 4.3b**), mentre l'anticorpo anti VAMP riconosce la VAMP2 (verde in **Fig. 4.3c**). Da una prima analisi è risultato che la syntaxina e VAMP sono normalmente distribuite sia a livello delle terminazioni delle fibre rampicanti che a livello delle terminazioni delle fibre parallele. In particolare si può osservare in **Fig. 4.3b-c** un'evidente colocalizzazione, indicata dal segnale giallo (indicata con la freccia), sia tra Syntaxina e VGluT2 sia tra VAMP e VGluT2 lungo il dendrite prossimale delle Purkinje. Le due SNARE inoltre, presentano una marcatura puntinata diffusa nello strato molecolare con pattern di espressione tipico del VGluT1.



**Fig. 4.3** In **a**, rappresentazione del complesso SNARE. In **b**, **c** e **d**, le fibre rampicanti marcate selettivamente con il VGluT2; colocalizzano con la syntaxina (**b**) e con VAMP (**c**) come evidenza il segnale giallo dato dalla colocalizzazione dei due segnali (indicato dalle frecce), la snap25 invece, non colocalizza con il VGluT2 (indicato dalla freccia in **d**).

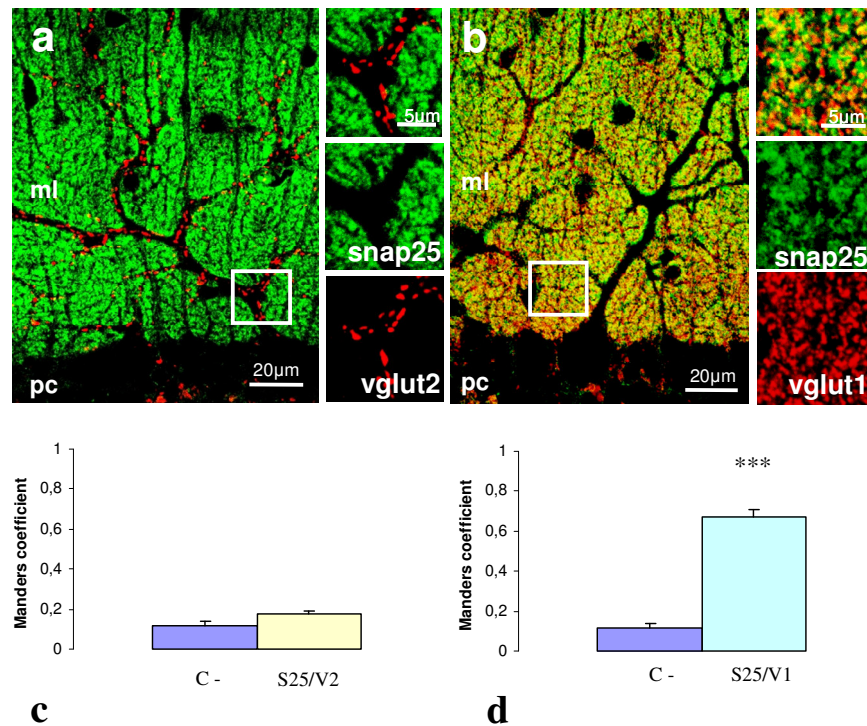


La SNAP-25 invece mostra una localizzazione particolare, ossia una distribuzione omogenea nello strato molecolare e l'assenza nelle terminazioni delle fibre rampicanti (come indicato dalla freccia nella **Fig. 4.3d** il segnale rosso indica le terminazioni VGluT2 positive prive di SNAP-25). Questo risultato ci ha pertanto spinto ad analizzare in maniera più approfondita il pattern di localizzazione della SNAP-25 nella corteccia cerebellare, supportati dall'idea che tali differenze nell'espressione possano essere strettamente correlate ad uno specifico ruolo funzionale nelle varie sinapsi.

### 4.3 Distribuzione della SNAP-25 nelle sinapsi glutamatergiche

#### 4.3.1. SNAP-25 nelle sinapsi glutamatergiche dello strato molecolare

Per poter caratterizzare la distribuzione della SNAP-25 nelle sinapsi glutamatergiche nella corteccia cerebellare, abbiamo inizialmente eseguito un'analisi qualitativa degli esperimenti di immunofluorescenza condotti su più animali. Come menzionato precedentemente, abbiamo riscontrato delle peculiarità nella distribuzione della SNAP-25 nello strato molecolare. Nella **Fig. 4.4a** si riscontra una completa assenza della SNAP-25 (verde) nelle terminazioni della fibra rampicante (rosso). A conferma di tale dato sono inoltre stati utilizzati altri due anticorpi diretti contro epitopi diversi della SNAP-25 (dati non mostrati). Nelle terminazioni delle fibre parallele (**Fig. 4.4b**) si riscontra invece una forte colocalizzazione con il VGluT1 (rosso).



**Fig.4.4** In **a**, è evidente l'assenza della SNAP-25 (in verde) nelle terminazioni delle fibre rampicanti (in rosso) marcate selettivamente con VGluT2; in **b**, le terminazioni delle fibre parallele (in rosso) marcate con VGluT1 sono invece caratterizzata dalla presenza della SNAP-25 (in verde). In **c** e **d**, analisi quantitativa dei livelli di espressione mediante l'analisi del coefficiente di Manders tra S25/V2, S25/V1 ed il C-.

Tuttavia, la marcatura per la SNAP-25 non risulta puntinata come quella per VGluT1 ma molto più omogenea. Pertanto, la presenza di segnale non colocalizzante con il VGluT1 ci ha indotto ad ipotizzare una possibile localizzazione lungo l'intero axolemma delle fibre parallele. Mediante la microspia elettronica (come mostrato in seguito), abbiamo confermato tale ipotesi, rivelando un'alta densità della proteina nei terminali sinaptici e lungo l'axolemma delle fibre parallele.

Abbiamo quindi approfondito tali risultati effettuando un'analisi quantitativa di colocalizzazione dei marcatori studiati. Tramite un software di analisi di immagini (Image J) è possibile calcolare, per ciascuna regione di interesse, il *coefficiente di overlap* ( $r$ ) in accordo con Manders, (Manders et al. 1993), un indice del reale grado di colocalizzazione tra due segnali che va da zero ad uno. Zero indica non colocalizzazione, uno completa colocalizzazione. Abbiamo scelto la doppia marcatura VGAT/VGluT1 nei glomeruli cerebellari come controllo negativo. In tali strutture infatti le terminazioni sinaptiche e quindi i rispettivi marcatori sono a stretto contatto tra di loro ma non risultano colocalizzanti, come dimostrato dal valore estremamente basso del coefficiente  $r$  ( $0,114 \pm 0,011$  SEM).

Nello strato molecolare, il coefficiente  $r$  tra SNAP-25 e VGluT2 (S25/V2;  $0,173 \pm 0,011$  SEM) non è risultato significativamente diverso (One way ANOVA,  $p > 0,05$ ) da quello del controllo negativo (C-;  $0,114 \pm 0,011$  SEM) (**Fig. 4.4c**). Mentre si osserva un alto indice di colocalizzazione tra SNAP-25 e VGluT1 (S25/V1;  $0,669 \pm 0,019$  SEM) che risulta infatti statisticamente diverso (One way ANOVA,  $p < 0,05$ ) dal controllo (**Fig. 4.4d**). Tutti questi risultati portano pertanto alla conclusione che la SNAP-25, nello strato molecolare del cervelletto è assente nelle terminazioni delle fibre rampicanti ed è invece presente nelle terminazioni sinaptiche e lungo l'axolemma delle fibre parallele.

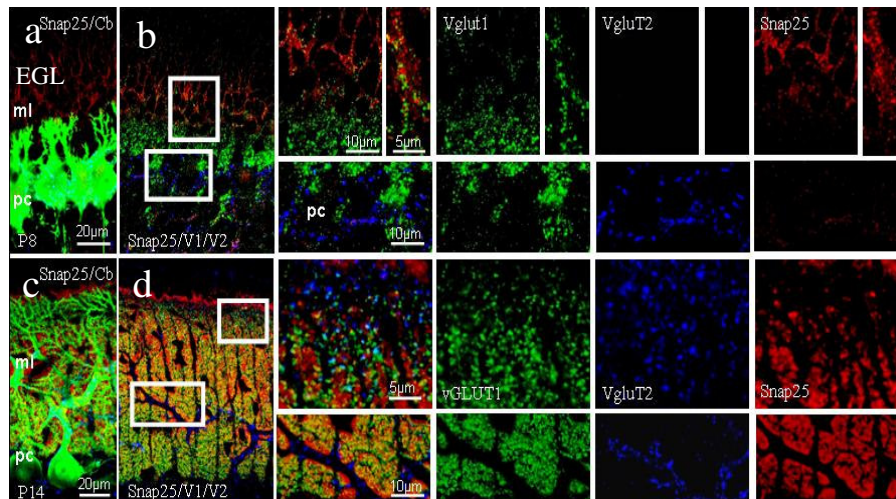
#### 4.3.2 Espressione della SNAP-25 durante lo sviluppo

La SNAP-25 è presente nel cervello nelle due isoforme SNAP-25 a e b. L'isoforma a è espressa prevalentemente durante la fase prenatale e di sviluppo mentre la b prevale nella fase adulta. Ci siamo pertanto chiesti se l' isoforma SNAP-25a fosse transitoriamente espressa nella rampicante durante lo sviluppo. A tale scopo abbiamo effettuato delle triple immunofluorescenze con anticorpi anti VGluT1 e VGluT2 agli stadi P8 (**Fig. 4.5a**) e P14 (**Fig. 4.5c**). Come noto, negli animali a P8 (**Fig. 4.5a**), le Purkinje (marcate con la calbindina in verde) non sono perfettamente allineate in uno strato monocellulare e l'albero dendritico è lievemente sviluppato. Il tronco principale dell'albero è infatti piccolissimo, i rami secondari che si dipartono da questo occupano solo una piccola parte dello strato molecolare già formato, ancora non molto evidente poichè l'EGL (external granular layer) occupa gran parte della regione che costituirà lo strato molecolare futuro. Di conseguenza anche la distribuzione dei trasportatori, non corrisponde a quella nell'adulto (**Fig. 4.5b**). Infatti mentre la marcatura per VGluT1 (in verde) è presente esclusivamente nello strato molecolare già formato, a ridosso della regione apicale delle Purkinje, quella per VGluT2 (in blu) si trova intorno al corpo cellulare di tali cellule. Analizzando la distribuzione della SNAP-25 (in rosso) in relazione ai VGluTs (**Fig. 4.5b**) è invece evidente come questa non colocalizzi né con le terminazioni delle fibre parallele VGluT1, né con le terminazione delle fibre rampicanti, VGluT2. E' invece evidente la marcatura della SNAP-25 nella regione dell'EGL. Tale osservazione ci porta pertanto a supporre la possibile presenza della SNAP-25 lungo l'axolemma delle fibre parallele che discendono dall'EGL.

Negli animali a P14 (**Fig. 4.5c**), le Purkinje (in verde) hanno quasi raggiunto la completa maturazione quindi oltre ad essere allineate in un unico strato monocellulare presentano un albero dendritico ben sviluppato che si estende nello strato molecolare ormai anch'esso quasi del tutto formato. A questo stadio, i due trasportatori risultano entrambi presenti nelle terminazioni delle fibre parallele, come dimostrato dagli studi di Miyazaki (Miyazaki et al., 2002 ). Solo successivamente, una volta conclusa la fase di sinaptogenesi i due trasportatori risultano segregati nei due input eccitatori dello strato molecolare. Come mostrato

in **Fig. 4.5d** la porzione dello strato molecolare lungo la regione apicale dello strato delle Purkinje risulta infatti VGluT1 positiva (in verde), la zona intermedia è VGluT1/VGluT2 positiva e la porzione più esterna, sempre relativa alle terminazioni delle fibre parallele, è VGluT2 positiva (in blu). Nella porzione dello strato molecolare, a ridosso delle Purkinje, si ha inoltre una marcatura VGluT2 positiva (in blu), che si localizza solamente lungo l'albero dendritico delle Purkinje e precisamente lungo il tronco principale. Confrontando la marcatura per VGluT2 per gli animali a P8 ed a P14, si osserva una traslocazione del segnale, specifico della fibra rampicante, dal soma al tronco principale dell'albero dendritico delle Purkinje, anche se in tale stadio una marcatura lieve intorno al corpo delle Purkinje è ancora visibile. Analizzando la distribuzione della SNAP-25 (in rosso) in relazione ai VGluTs (**Fig. 4.5d**) è invece evidente come questa non colocalizzi con il VGluT2 a ridosso del tronco principale delle Purkinje e con il VGluT2 positivo della porzione più esterna dello strato molecolare, mentre una chiara colocalizzazione tra VGluT1 e SNAP-25 è invece evidente.

In conclusione, durante le fasi iniziali dello sviluppo (P8) la SNAP-25 è assente sia nelle terminazioni delle fibre parallele che nelle terminazioni delle fibre



**Fig.4.5.** Espressione della SNAP25 durante lo sviluppo. In **a e c**, espressione a P8 e P14 della SNAP25 (in rosso) in relazione alle cellule di Purkinje (in verde). In **b e d**, espressione a P8 e P14 della SNAP25 (in rosso) in relazione ai trasportatori vescicolari del glutammato, VGluT1 (in verde) e VGluT2 (in blu)

rampicanti, mentre sembra sia presente lungo l'axolemma delle fibre parallele che discendono dall'EGL. Procedendo con lo sviluppo (P14) la SNAP25 è espressa dalle terminazioni delle fibre parallele (così come si osserva nell'adulto) mentre risulta ancora non espressa dalle terminazioni delle fibre rampicanti VGluT2 positive (così come si osserva nell'adulto) e dalle terminazioni delle fibre parallele VGluT2 positive presenti nella regione più esterna dello strato molecolare.

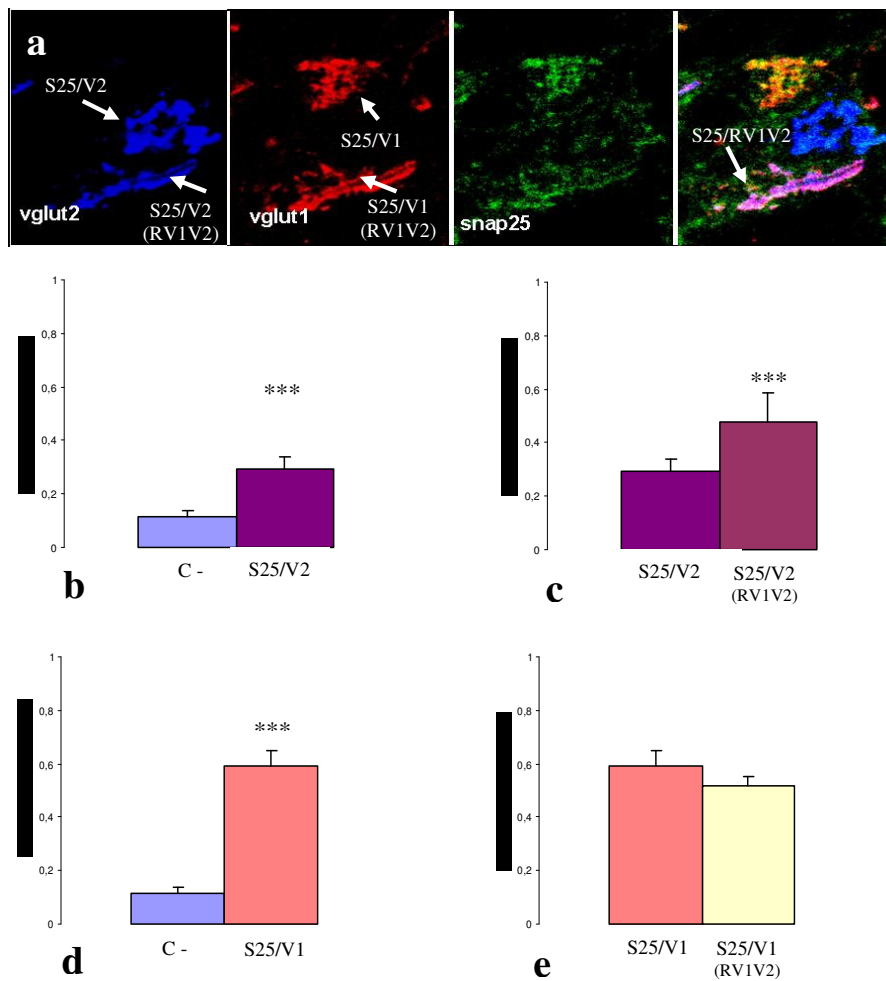
#### 4.3.3 SNAP-25 nelle sinapsi glutamatergiche dello strato granulare

Il passo successivo è stato quello di verificare se anche nello strato granulare, dove coesistono distinte sottopopolazioni glutamatergiche (identificate dai VGluTs), la SNAP-25 viene espressa in maniera differenziale. Da una prima analisi qualitativa abbiamo osservato che tutte le fibre muscoidi, positive per VGluT1 (in rosso), VGluT2 (in blu) o per entrambi (in fucsia), presentano SNAP-25 (in verde) anche se i livelli di espressione sembrano variabili. Inoltre è presente un segnale diffuso non colocalizzante con i trasportatori, presumibilmente dovuto alla presenza della SNAP-25 non solo nelle terminazioni ma anche lungo gli assoni (**Fig. 4.6a**).

Anche in questo caso, i risultati ottenuti con l'immunofluorescenza sono stati confermati dall'analisi quantitativa. Per valutare i livelli di espressione della SNAP-25 nei glomeruli, abbiamo valutato il coefficiente  $r$  tra SNAP-25 e VGluT2, nelle muscoidi positive esclusivamente per VGluT2 ( $S25/V2$ ;  $0,29 \pm 0,019$  SEM) ed il coefficiente  $r$  tra SNAP-25 e VGluT1 nelle terminazioni muscoidi positive esclusivamente per VGluT1 ( $S25/V1$ ;  $0,59 \pm 0,024$  SEM). Tali coefficienti risultano entrambi significativamente diversi da quello del controllo negativo (C-;  $0,114 \pm 0,011$  SEM) come mostrato in **Fig. 4.6b-d** (One way ANOVA,  $p < 0,05$ ). Tuttavia, i livelli di SNAP25 presenti nelle muscoidi VGluT1 positive sono molto più alti di quelli presenti nelle muscoidi VGluT2 positive infatti tra i due coefficienti  $r$  (di  $S25/V1$  e di  $S25/V2$ ) risulta una differenza statisticamente rilevante (One way ANOVA,  $p > 0,05$ ). Nelle muscoidi positive per entrambi i trasportatori ( $S25/RV1V2$ ) il coefficiente  $r$  per V1: ( $S25/V1(RV1V2)$ ;  $0,52 \pm 0,013$  SEM) non è significativamente diverso dall' $r$  di  $S25/V1$  (One way ANOVA,

$p > 0,05$ ). Tuttavia nelle muscoidi S25/RV1V2 il coefficiente  $r$  per V2: (S25/V2(RV1V2);  $0,47 \pm 0,046$  SEM) è invece statisticamente diverso dall' $r$  di S25/V2 (Fig. 4.6c-e).

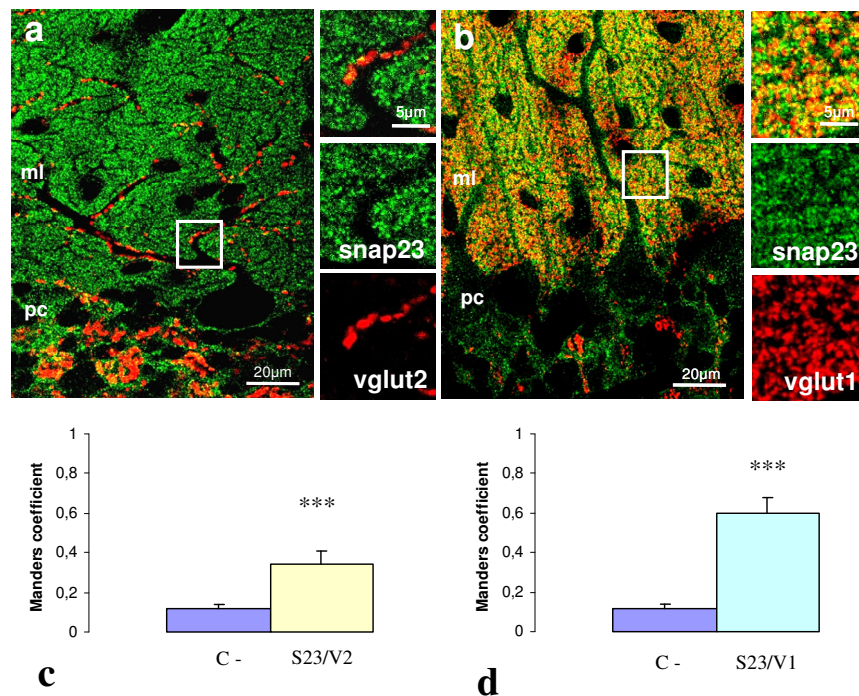
Tutti questi risultati portano alla conclusione che le fibre muscoidi positive per VGluT1, VGluT2 o per VGluT1/VGluT2 risultano positive per SNAP-25 anche se i livelli di espressione sono risultati più alti nelle muscoidi positive per il VGluT1.



#### 4.4 Distribuzione della SNAP-23 nelle sinapsi glutamatergiche

##### 4.4.1. SNAP-23 nelle sinapsi glutamatergiche dello strato molecolare

Il livello di espressione estremamente basso della SNAP-25 nelle fibre rampicanti, ci ha indotto a ricercare il possibile sostituto di tale proteina. Poichè l'isoforma SNAP-23, che ha un'espressione ubiquitaria nel cervello, è una t-SNARE che lega sia VAMP che syntaxina e sembra sia in grado sostituire funzionalmente la SNAP-25 nella secrezione neuroendocrina (Sadoul et al,1997), abbiamo deciso di analizzare la sua distribuzione nella corteccia cerebellare ed in particolare nello strato molecolare. Come mostrato in **Fig. 4.7a**, le terminazioni delle fibre rampicanti, selettivamente marcate con il VGluT2 (rosso), presentano una leggera marcatura per SNAP-23 (verde). Nelle terminazioni glutamatergiche identificate con il VGluT1 (**Fig. 4.7b**) i livelli di espressione della SNAP-23 sono più elevati e anche in questo caso (come osservato per SNAP-25) è probabile una



**Fig. 4.7** In **a**, la SNAP-23 (in verde) è lievemente presente nelle terminazioni delle fibre rampicanti marcate selettivamente con VGluT2 (in rosso); in **b**, le terminazioni delle fibre parallele marcate con VGluT1 (in rosso) mostrano alti livelli di SNAP-23. In **c** e **d**, analisi del coefficiente di Manders tra S23/V2, S23/V1 rispetto al C-.

---

localizzazione della SNAP-23 non solo nelle terminazioni ma anche lungo l'intero axolemma delle fibre parallele, come dimostrato dalla microscopia elettronica (come mostrato in seguito).

Tali risultati sono stati confermati dall'analisi quantitativa. Per valutare i livelli di espressione della SNAP-23 nei due input eccitatori cerebellari, abbiamo calcolato il coefficiente  $r$  tra SNAP-23 e VGluT2, (S23/V2;  $0,346 \pm 0,032$  SEM) ed il coefficiente  $r$  tra SNAP-23 e VGluT1 (S23/V1;  $0,601 \pm 0,039$  SEM) ed è risultato che sono entrambi significativamente diversi da quello del controllo (C-;  $0,114 \pm 0,011$  SEM) (**Fig. 4.7c-d**) (One way ANOVA,  $p < 0,05$ ).

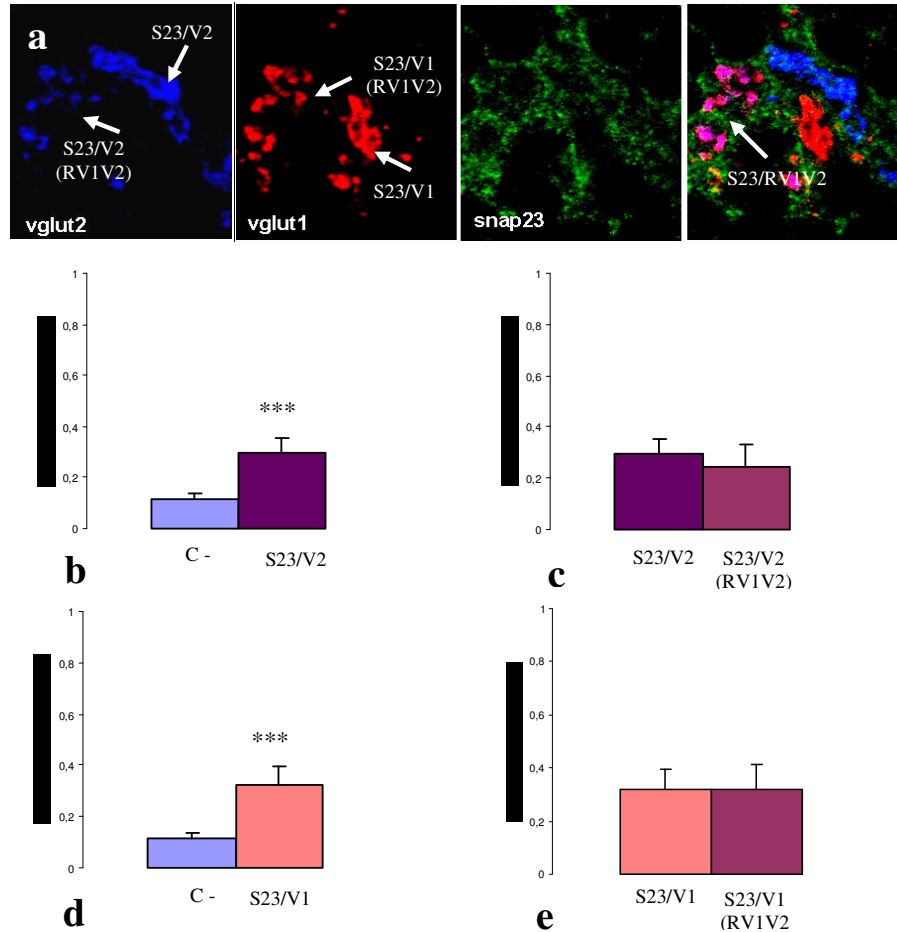
Tutti questi risultati portano pertanto alla conclusione che la SNAP-23, nello strato molecolare del cervelletto è presente con bassi livelli sia nelle terminazioni delle fibre rampicanti che nelle terminazioni delle fibre parallele.

#### 4.4.2. SNAP-23 nelle sinapsi glutamatergiche dello strato granulare

Abbiamo quindi valutato l'espressione della SNAP-23 nello strato granulare. La marcatura SNAP-23/VGluT1/VGluT2 ci ha infatti permesso di distinguere le varie sottopopolazioni di fibre muscoidi (caratterizzate dal VGluTs specifico). Si osserva la presenza della SNAP-23 (in verde) nella struttura del glomerulo e una parziale colocalizzazione con i marcatori delle fibre muscoidi (positive per VGluT1 (in rosso), VGluT2 (in blu) o per entrambi (in fucsia), come mostrato in **Fig. 4.8a**. Inoltre, (come per SNAP-25) è presente un segnale non colocalizzante con i trasportatori, all'esterno del glomerulo, presumibilmente dovuto alla presenza della SNAP-23 non solo nelle terminazioni ma anche lungo gli assoni.

Dall'analisi quantitativa è risultato che i coefficiente  $r$  tra SNAP-23 e VGluT2, nelle muscoidi positive esclusivamente per VGluT2 (S23/V2,  $0,290 \pm 0,034$  SEM) ed il coefficiente  $r$  tra SNAP-23 e VGluT1 nelle muscoidi positive esclusivamente per VGluT1 (S23/V1,  $0,322 \pm 0,032$  SEM) sono significativamente diversi dal coefficiente del controllo negativo (C-;  $0,114 \pm 0,011$  SEM) (One way ANOVA,  $p < 0,05$ ) (**Fig. 4.8b-d**). Nelle muscoidi positive per entrambi i trasportatori (S23/RV1V2) il coefficienti  $r$  (per V2: S23/V2(RV1V2)  $0,248 \pm 0,038$

SEM; per V1: S23/V1(RV1V2);  $0,32 \pm 0,042$  SEM) non è risultato significativamente diverso né da quello S23/V2 né da quello S23/V1 (One way ANOVA,  $p > 0,05$ ) rispettivamente (**Fig. 4.8c-e**).



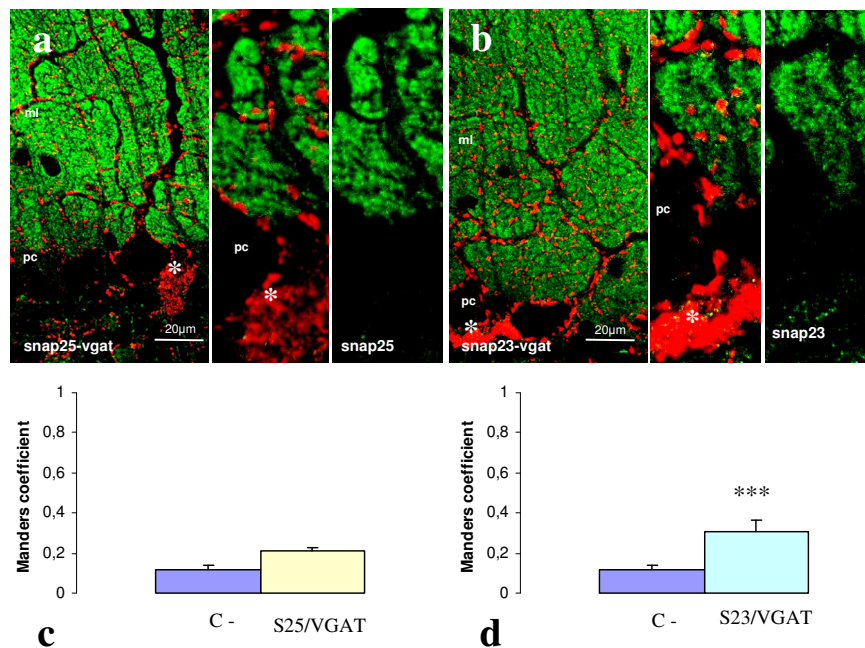
**Fig. 4.8** In a, SNAP23 (in verde) nelle fibre muscolari marcate con VGLuT2 (in blu, S23/V2) con VGLuT1 (in rosso, S23/V1) o con entrambi i marcatori (in fucsia, S23/V1V2). In b-d è mostrata l'analisi del coefficiente di Manders tra S23/V2, S23/V1 ed il C-. In c-e, l'analisi del coefficiente di Manders tra S23/V1 e S23/V1rV1V2 e tra S23/V2 e S23/V2V1V2.

Tutti questi risultati portano alla conclusione che nelle fibre muscolari positive per VGLuT1, VGLuT2 o per entrambi la SNAP-23 è presente, ma a bassi livelli. Inoltre, non è stata riscontrata una localizzazione preferenziale di SNAP-23 per una particolare sottopopolazione glutamatergica.

## 4.5 Distribuzione della SNAP-25 e della SNAP-23 nelle sinapsi GABAergiche

### 4.5.1. SNAP-23 e SNAP-25 nelle sinapsi GABAergiche dello strato molecolare

Nello strato molecolare, l'attività delle cellule del Purkinje viene principalmente modulata dalle cellule stellate e dalle cellule a canestro. Per visualizzare le terminazioni di tali interneuroni inibitori, abbiamo utilizzato l'anticorpo contro il trasportatore vescicolare del GABA (VGAT) (Fig. 4.9a-b in rosso).



**Fig. 4.9** In a e b, la SNAP-25 e la SNAP23 (in verde) nelle terminazioni GABAergiche marcate selettivamente con VGAT (in rosso). In c e d, l'analisi del coefficiente di Manders tra S25/VGAT, S23/VGAT ed il C-

La doppia marcatura SNAP-25/VGAT e SNAP-23/VGAT (Fig. 4.9a-b) è pertanto, importante per comprendere la distribuzione ed i livelli di espressione della SNAP-25 (a, in verde) e della SNAP-23 (b, in verde) nelle terminazioni degli

---

interneuroni inibitori. In tali terminazioni, abbiamo riscontrato livelli di espressione di SNAP-25 e di SNAP-23 molto bassi. Tuttavia nel pinceau delle basket (asterisco **Fig. 4.9a-b**) si può osservare del segnale positivo per la SNAP-23 (**Fig. 4.9b**, verde) mentre la SNAP-25 (**Fig. 4.9a**, verde) risulta assente.

In base ai risultati dell'analisi quantitativa è risultato che mentre il coefficiente di overlap ( $r$ ) tra SNAP-25/VGAT, (S25/VGAT;  $0,214 \pm 0,005$  SEM) non è significativamente diverso dal coefficiente del controllo negativo (C-;  $0,114 \pm 0,011$  SEM) (**Fig. 4.9c**), il coefficiente SNAP-23/VGAT (S23/VGAT;  $0,306 \pm 0,029$  SEM) risulta invece significativamente diverso (One way ANOVA,  $p < 0,05$ ) (**Fig. 4.9d**) (One way ANOVA,  $p > 0,05$ ).

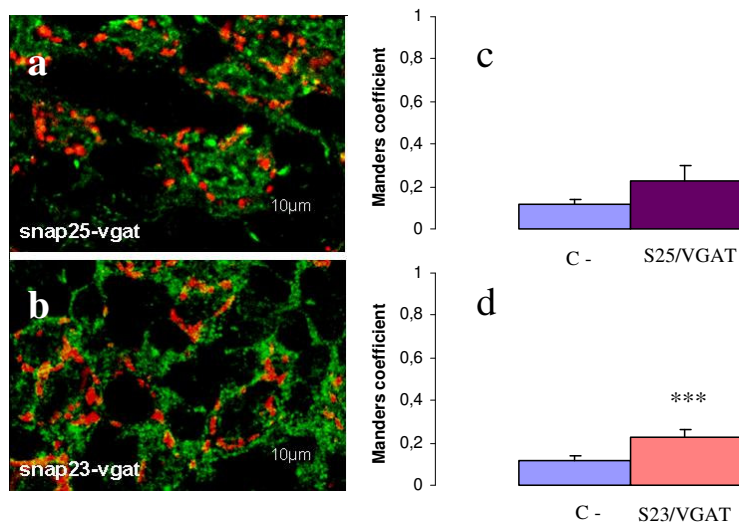
Da tali studi è quindi emerso che la SNAP-23 è espressa a bassi livelli nelle terminazioni inibitorie dello strato molecolare del cervelletto mentre la SNAP-25 risulta assente.

#### 4.5.2. SNAP-23 e SNAP-25 nelle sinapsi GABAergiche dello strato granulare

Nello strato granulare, le terminazioni delle Golgi stabiliscono sinapsi all'interno dei glomeruli, tali terminazioni sono GABAergiche ed esprimono i trasportatori vescicolare del GABA (VGAT). Ci siamo pertanto chiesti se nello strato granulare, tali terminazioni esprimono SNAP-23 o SNAP-25. Abbiamo quindi analizzato la distribuzione immunocitochimica delle due proteine mediante le doppie marcature SNAP-25/VGAT e SNAP-23/VGAT (**Fig. 4.10a-b**). Le terminazioni VGAT positive esprimono bassi livelli di SNAP-23 e SNAP-25.

Anche in questo caso, i risultati che abbiamo ottenuto con l'immunofluorescenza sono stati approfonditi con l'analisi quantitativa. Il coefficiente di overlap ( $r$ ) tra SNAP-25 e VGAT (S25/VGAT;  $0,207 \pm 0,031$  SEM, **Fig. 4.10c**) non risulta significativamente diverso dal coefficiente del controllo negativo (C-;  $0,114 \pm 0,011$  SEM) (one way ANOVA,  $p > 0,05$ ), mentre il coefficiente  $r$  tra SNAP-23 e VGAT (S23/VGAT;  $0,224 \pm 0,017$  SEM, **Fig. 4.10d**) risulta significativamente diverso dal C- (one way ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Da tali risultati si evince che le terminazioni GABAergiche dello strato granulare esprimono bassi livelli di SNAP-23 mentre la SNAP-25 non risulta presente. Tali risultati sono in accordo con i dati ottenuti da Garbelli e collaboratori



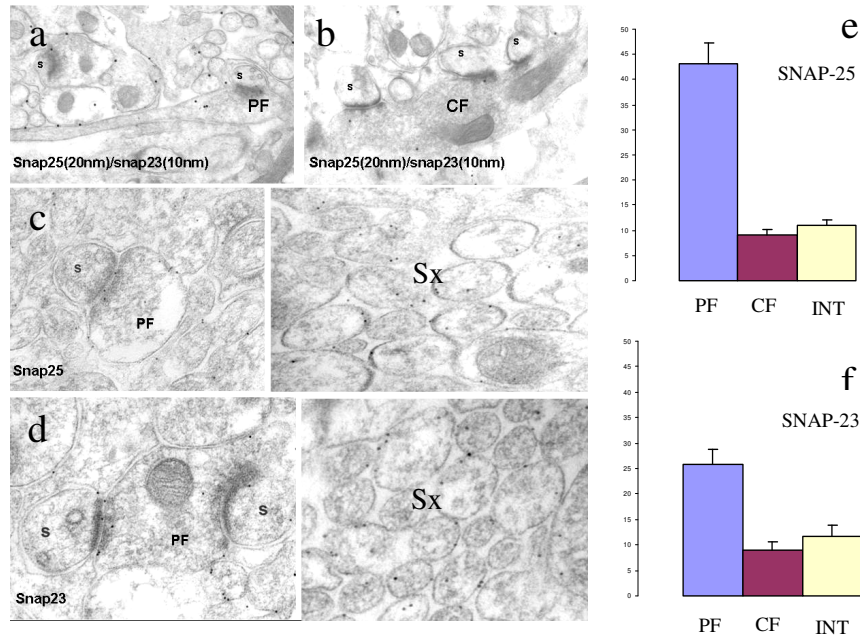
**Fig. 4.10** In a e in b, espressione della SNAP-25 e della SNAP-23 (in verde) nelle terminazioni GABAergiche marcate selettivamente con il VGAT (in rosso). In c e d, analisi del coefficiente di Manders tra S25/VGAT, S23/VGAT ed il C-

(Garbelli et al, 2008) che dimostrano l'assenza di SNAP-25 nei terminali GABAergici glomeruli del cervelletto.

#### ***4.6 Analisi della SNAP-25 e della SNAP-23 mediante la microscopia elettronica nello strato molecolare***

Una delle tecniche più diffuse in microscopia elettronica per la localizzazione di determinati costituenti cellulari riconosciuti da specifici anticorpi è l'*immunogold*. Tale tecnica utilizza particelle sferoidali di oro colloidale, disponibili in diversi diametri (da 5 a 30 nanometri), che vengono coniugate con anticorpi specifici, in modo da andare a legarsi, nella sezione di tessuto, nella posizione occupata dagli antigeni. La posizione delle particelle è direttamente rilevabile al microscopio elettronico, poiché l'oro è opaco agli elettroni e forma, quindi, un'ombra scura

sull'immagine del campione. Per confermare a livello ultrastrutturale la localizzazione della SNAP-25 e della SNAP-23 nello strato molecolare della corteccia cerebellare abbiamo deciso di avvalerci di tale tecnica (in collaborazione con la Dr.ssa R. Cesa,



**Fig. 4.11** In a e in b, doppia immunogold della SNAP-25 (20nm) e della SNAP-23 (10nm) nelle fibre parallele (PF) e nelle fibre rampicanti (CF). In c e d, singola immunogold della SNAP-25 (10nm) e della SNAP-23 (10nm) nelle terminazioni delle fibre parallele e in sezioni di tali fibre (Sx). In e e f, densità delle gold particles/area del terminale presinaptico nelle singole immunogold.

del dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Torino).

Nello specifico abbiamo effettuato delle singole marcatura per SNAP-25 o SNAP-23 per le quali abbiamo utilizzato immunogold di 10nm di diametro (**Fig. 4.11c-d**). Invece nelle doppie marcature SNAP-25/SNAP-23 (che consentono la localizzazione simultaneamente delle due proteine) abbiamo utilizzato per SNAP-25 delle particelle di 20nm di diametro mentre per SNAP-23 di 10nm. Come mostrato in **Fig. 4.11a, 4.11c e 4.11d** abbiamo rilevato un'alta densità di SNAP-25 e SNAP-23 nei terminali sinaptici delle fibre parallele (PF) che contattano le spine (s) dendritiche della regione distale delle Purkinje. Le due proteine non sono presenti esclusivamente nelle terminazioni delle fibre parallele (come mostrato in **fig. 4.11** "sx" indica le PF in sezione) ma anche lungo l'intero axolemma di tali fibre. Come mostrato in **Fig. 4.11e-f**, la SNAP-25 e la SNAP23 sono espresse dalla CFs seppure con una densità inferiore

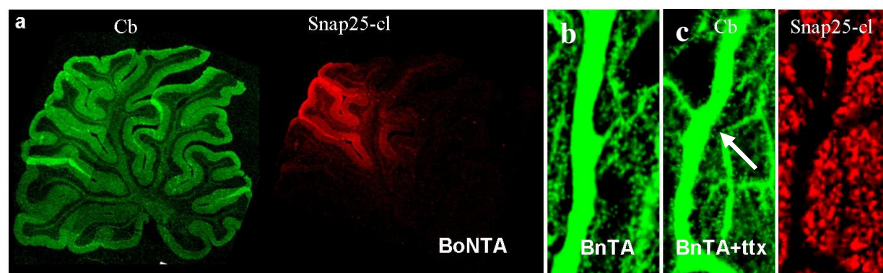
rispetto a quella presente nelle PFs. Tale differenza di espressione è soprattutto marcata per la SNAP-25, infatti come si può vedere dal grafico, nelle PFs ( $43,2 \pm 4$  SE) la densità delle gold particle è di circa 5 volte maggiore rispetto quella presente nelle varicosità CF ( $9,2 \pm 1,1$  SE). Sono stati inoltre analizzati i livelli di espressione della SNAP-25 e della SNAP-23 nelle terminazioni degli interneuroni inibitori e come riportato dall'analisi della densità delle gold particles/ area del terminale presinaptico i livelli di entrambe le proteine sono molto bassi.

#### ***4.7 Iniezione in vivo della BoNT-A nel parenchima cerebellare***

Mediante gli esperimenti di immunofluorescenza e l'analisi quantitativa, abbiamo osservato alti livelli di espressione della SNAP-25 nelle terminazioni delle fibre parallele e livelli non rilevabili nelle terminazioni delle fibre rampicanti. Con la microscopia elettronica abbiamo inoltre confermato quanto osservato con l'immunofluorescenza ed abbiamo supposto che i livelli molto bassi di SNAP-25 nelle terminazioni delle fibre rampicanti non possano supportare il rilascio del neurotrasmettitore. Per verificare se effettivamente SNAP-25 sia coinvolta nella trasmissione sinaptica a livello della rampicante abbiamo deciso di utilizzare la Botulina A (BoNT-A), che come noto, effettua un taglio proteolitico specifico della SNAP-25, determinando il blocco del rilascio vescicolare sinaptico. Tali esperimenti sono stati condotti in ratti adulti in vivo. In particolare abbiamo effettuato un'unica iniezione di BoNT-A ( $2\mu\text{l}$ , 30nM) in un unico punto del parenchima cerebellare all'altezza del verme. Tale concentrazione è risultata la dose massima non letale per poter osservare l'effetto del taglio proteolitico. Inoltre poiché la BoNT-A è nota per avere effetti a lungo termine sul blocco del rilascio vescicolare, abbiamo effettuato un'unica iniezione e abbiamo sacrificato gli animali dopo una settimana. Tramite esperimenti di immunofluorescenza, utilizzando un anticorpo che riconosce specificamente la SNAP-25 tagliata dalla BoNT-A (in rosso, **Fig. 4.12**), gentilmente fornito dal Prof. Montecucco, abbiamo individuato la regione del cervelletto in cui è avvenuto il taglio proteolitico della

SNAP-25 e siamo andati a verificare la presenza o meno di un fenomeno morfologico caratteristico del cervelletto che è dipendente dall'attività elettrica. Nel nostro laboratorio è stato infatti osservato che in ratti adulti, in seguito a perfusione nel parenchima cerebellare di TTX, farmaco in grado di bloccare i canali voltaggio dipendenti e quindi la trasmissione sinapsi evocata, le Purkinje vanno incontro ad un processo di spinogenesi a livello dell'albero dendritico prossimale, cioè nella regione contatta dalla fibra rampicante. L'ipotesi è che in condizioni normali la fibra rampicante, che contatta pochi gruppi di spine lungo l'albero dendritico prossimale, eserciti un'inibizione laterale attività dipendente che impedisce alle spine dendritiche delle Purkinje di protrudere. In assenza di attività elettrica, la fibra rampicante non è più in grado di esercitare tale inibizione laterale e quindi si osserva il fenomeno di spinogenesi. Tale risultato è stato confermato anche in seguito a blocco con NBQX, un bloccante dei recettori AMPA presenti nelle sinapsi PC-rampicante (Bravin et al, 1999; Cesa et al 2007).

Fatta questa premessa ci siamo chiesti se in seguito a trattamento con BoNT-A era possibile ottenere un risultato analogo a quello osservato con TTX. Abbiamo osservato che dopo una settimana dalla iniezione non si verifica alcun fenomeno di spinogenesi, come mostrato in **Fig. 4.12b**. Come ulteriore controllo, abbiamo effettuato nello stesso animale contemporaneamente sia il trattamento con TTX sia quello con BoNT-A (**Fig. 4.12c**) ed è risultata evidente la formazione di nuove spine. Tali risultati quindi confermano che la SNAP-25 anche se presente a livelli estremamente bassi nelle terminazioni delle fibre rampicanti non è coinvolta nel rilascio vescicolare del neurotrasmettitore a livello di tali sinapsi.



**Fig. 4.12** In **a** sezione del cervelletto iniettato con BoNT-A, la calbindina (Cb, in verde) permette l'identificazione delle cellule del Purkinje mentre la SNAP-25 cl (in rosso) permette di visualizzare il sito d'iniezione quindi il taglio proteolitico della BoNTA sulla SNAP-25. In **b**, particolare del dendrite prossimale della Purkinje privo di spine in seguito al trattamento con BoNTA. In **c**, particolare del dendrite prossimale della Purkinje caratterizzato dalla presenza di nuove spine (come indicato dalla freccia) formate in seguito al trattamento con BoNTA+TTX.

## *Capitolo 5*

# Discussione

L'obiettivo della tesi è quello di studiare tramite tecniche di immunofluorescenza e microscopia confocale l'espressione del complesso SNARE, in particolare della SNAP-25, nel cervelletto di ratto. L'analisi quantitativa dei dati, supportati dalla microscopia elettronica, hanno rilevato un'espressione variabile della proteina nei diversi terminali sinaptici. La correlazione tra l'espressione della SNAP-25 e il tipo di terminazione suggerisce che tale proteina possa avere anche un ruolo determinante nella fisiologia della sinapsi stessa. I livelli di espressione estremamente bassi della SNAP-25 in una sottopopolazione glutamatergica, ci ha indotto inoltre a ricercare il possibile sostituto di tale proteina. Poichè l'isoforma SNAP-23, che ha un'espressione ubiquitaria, sembra sia in grado sostituire funzionalmente la SNAP-25 nella secrezione neuroendocrina ne abbiamo analizzato la distribuzione nella corteccia cerebellare. Tuttavia, dai risultati ottenuti non possiamo però escludere la possibilità che sia la potenziale sostituta della SNAP-25.

### **5.1 Espressione della SNAP-25 e della SNAP- 23**

Nonostante sia evidente il coinvolgimento della SNAP-25 nel rilascio evocato del neurotrasmettitore, precedenti lavori hanno suggerito che tale proteina possa essere espressa in maniera non uniforme in tutte le popolazioni neuronali sia nel sistema nervoso centrale che periferico (Oyler et al, 1989; Catsicas et al, 1992; Bark et al, 1995; Hellstrom et al, 1999; Morris et al, 2000, 2005; Gibbins et al, 2003; Tafoya et al, 2006). Duc e Catsicas (1995) in particolare hanno osservato con la microscopia elettronica che tutte le terminazioni del sistema nervoso periferico sono virtualmente SNAP-25 positive, mentre solo una sottopopolazione di sinapsi del sistema nervoso centrale mostra la SNAP-25. Un evidente distinzione nei livelli di espressione di SNAP-25 è stata inoltre riscontrata confrontando neuroni GABAergici e neuroni Glutamatergici. Verderio e collaboratori (2004) hanno infatti dimostrato l'assenza della SNAP-25 nelle sinapsi inibitorie sia in coltura che in fettine ippocampali di ratto adulto. Tale osservazione è stata estesa nell'ippocampo di topo adulto (Frassoni et al, 2005) e in varie regioni del cervello nell'uomo (Garbelli et al, 2008). D'altro canto, negli stadi prenatali di sviluppo nell'ippocampo di topo e nei primi stadi di sviluppo di neuroni in coltura (Frassoni et al, 2005), è stata osservata una parziale colocalizzazione tra SNAP-25 ed i marker GABAergici indicando un'espressione della SNAP-25 progressivamente "downregolata" durante il differenziamento degli interneuroni. La riduzione nei livelli di espressione di SNAP-25 avviene più precocemente negli interneuroni in coltura derivati da ratti rispetto a quella osservata negli interneuroni derivati da topo (Frassoni et al, 2005).

L'assenza della SNAP-25 nelle sinapsi GABAergiche (nell'adulto), è stata recentemente confermata da Bragina (Bragina et al, 2007) estendendo l'analisi alla corteccia cerebrale, e da Garbelli (Garbelli et al, 2008) mediante studi di microscopia elettronica (combinando pre-embedding immunolabeling per la SNAP-25 con la localizzazione per post-embedding immunogold del GABA).

Tuttavia, tali risultati sono in disaccordo con il lavoro condotto da Tafoya (Tafoya et al, 2006) il quale ha dimostrato, la presenza della SNAP-25 durante lo sviluppo

di neuroni di topo in coltura e, alti livelli di SNAP-25 nel topo (adulto) sia nelle terminazioni delle cellule basket che contattano le cellule piramidali della regione CA1 dell'ippocampo sia nel talamo. Tali risultati sono stati ottenuti utilizzando lo stesso anticorpo commerciale (SMI 81, Tafoya et al., 2006; Garbelli et al., 2008), pertanto il motivo di tale discrepanza non è chiaro, sebbene possa essere dovuta a differenze nella metodologia sperimentale (Bragina et al, 2007) o nella preservazione del tessuto (Garbelli et al, 2008). La differenza, tra le sinapsi inibitorie e quelle eccitatorie, nei livelli di espressione della SNAP-25 potrebbe essere una conseguenza di meccanismi che operano a livello post-trascrizionale. Infatti, in coltura, negli interneuroni maturi la SNAP-25 viene osservata solo occasionalmente a livello del Golgi (Frassoni et al, 2005) e nei neuroni ippocampali inibitori l'mRNA della SNAP-25 risulta presente (Boschert et al, 1996; Tafoya et al, 2006) confermando la capacità dei neuroni GABAergici di sintetizzare la proteina. La differenza nell'accumulo della SNAP-25 in specifiche terminazioni piuttosto che in altre, potrebbe essere dovuta ad una differenza nella traduzione dell'mRNA, ad un rapido "turnover" della proteina nelle specifiche terminazioni o può riflettersi in un diverso trasporto o processamento assonale (Oyler et al, 1989) ristretto agli interneuroni maturi. Di notevole interesse inoltre, è che la forte riduzione dell'espressione della SNAP-25 negli interneuroni fastspiking GABAergici (Berghuis et al, 2004) è associata con la loro progressiva morfogenesi e funzionalità, e avviene solo in presenza del BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) fattore di differenziamento di tale tipo cellulare. Tutti nell'insieme questi risultati supportano l'idea che la riduzione post-traduzionale dell'espressione della SNAP-25 avviene in parallelo con il corretto differenziamento fenotipico dei neuroni GABAergici.

Pertanto la virtuale mancanza di SNAP-25 nei neuroni inibitori ha indotto molti ricercatori ad analizzare se la trasmissione sinaptica fosse assente. Diversi studi sono stati condotti utilizzando topi KO SNAP-25 (Bronk et al, 2007; Delgado-Martinez et al, 2007; Tafoya et al, 2006). Poiché i topi muoiono alla nascita tutti gli studi sono stati condotti su cellule primarie o su fettine prelevate da feti di topi KO SNAP-25. I risultati ottenuti hanno portato alla conclusione unanime che la SNAP-25 è funzionalmente presente, in uno stadio precoce dello sviluppo, in quasi tutti i

neuroni GABAergici in accordo con il pattern di espressione della SNAP-25 durante il differenziamento neuronale (Frassoni, 2005). Tuttavia non si può escludere che nell'adulto sia direttamente coinvolta nel rilascio vescicolare. Inoltre studi effettuati mediante le neurotossine botuliniche indicano una maggiore resistenza al trattamento con la BoNTA delle sinapsi inibitorie adulte rispetto a quelle eccitatorie. Se si induce nei neuroni GABAergici l'espressione della SNAP-25 esogena, la sensibilità alla tossina viene recuperata, tuttavia i meccanismi che coinvolgono tale fenomeno sono da definire.

I nostri esperimenti relativi alla presenza della SNAP-25 nei neuroni GABAergici del cervelletto, indicano che in età adulta i livelli della SNAP-25 sono molto bassi. In particolare, nello strato granulare i dati di immunofluorescenza confermano l'assenza della proteina nelle terminazioni GABAergiche come riportato da Garbelli e colleghi (Garbelli et al, 2008), mentre nello strato molecolare, fino ad ora mai analizzato, osserviamo livelli molto bassi di tale proteina (risultato inoltre confermato con la microscopia elettronica). Sorge quindi spontanea la domanda di quale sia la SNARE che possa sostituire la SNAP-25 in tali neuroni. La SNAP-23 rappresenta una isoforma SNAP non neuronale potenzialmente interessante. E' infatti, una t-SNARE che lega con alta affinità sia la VAMP che la syntaxina. Nell'ippocampo viene espressa sia dai neuroni eccitatori che inibitori tuttavia, sebbene la SNAP-23 possa sostituire funzionalmente la SNAP-25 nella secrezione neuroendocrina, non è stato ancora chiarito se sia in grado di svolgere un ruolo diretto nel rilascio vescicolare dei neuroni inibitori. I nostri dati riguardo la presenza della SNAP-23 nelle terminazioni GABAergiche indicano livelli bassi sia nelle terminazioni assonali delle Golgi nei glomeruli dello strato granulare, che nelle terminazioni delle cellule a canestro e delle stellate a livello dello strato molecolare. È pertanto, plausibile la presenza di altre SNAP in grado di vicariare per SNAP-25, ad esempio, la SNAP-29, nuovo membro della famiglia delle SNARE. Tuttavia sembra che tale isoforma sia in grado di regolare il disassemblaggio dello SNARE complex piuttosto che supportare l'esocitosi regolata (Su et al, 2001). Altre proteine come D53 (Proux-Gillardeaux et al, 2003) o SNAP47, o proteine omologhe, non ancora identificate, devono comunque essere prese in considerazione.

Per quanto riguarda l'espressione della SNAP-25 nei terminali glutamatergici, solo di recente sono state effettuate delle analisi più approfondite riguardo la sua localizzazione nei diversi sottotipi neuronali. In particolare nella corteccia cerebrale, Bragina e colleghi (2007) hanno osservato, tramite immunofluorescenza, un'espressione preferenziale della SNAP-25 nei neuroni glutamatergici VGluT1 positivi piuttosto che nei neuroni VGluT2 positivi.

I nostri risultati mostrano per la prima volta i livelli di espressione della SNAP-25 nelle terminazioni glutamatergiche della corteccia cerebellare, concludendo (in accordo con Bragina) che le terminazioni VGluT2 positive hanno livelli molto inferiori di SNAP-25 rispetto ai terminali VGluT1 positivi. Nelle terminazioni delle fibre muscoidi nello strato granulare, la SNAP-25 risulta presente in tutte le rosette ma i livelli sono inferiori in quelle positive per VGluT2. Nello strato molecolare la fibra rampicante presenta livelli molto bassi di SNAP-25, al limite della rilevabilità tramite immunofluorescenza. Abbiamo inoltre verificato se analogamente al differenziamento dei neuroni inibitori la presenza della SNAP-25 fosse correlata con le fasi di sviluppo del cervelletto. Studi di immunocitochimica infatti, hanno evidenziato che l'immunoreattività per la SNAP-25 aumenta durante lo sviluppo e che la sua localizzazione si sposta dal corpo cellulare e gli assoni alle terminazioni presinaptiche (Oyler, 1991). Abbiamo osservato che nel cervelletto a P8 infatti la SNAP-25 non è espressa nelle terminazioni delle fibre parallele ma solo lungo l'assolemma di tali fibre che discendono dall'EGL. Solo successivamente (come mostrato a P14), la SNAP-25 si localizza anche a livello delle terminazioni delle fibre parallele sia VGluT1 positive che VGluT2 positive (in tale stadio infatti le parallele esprimono entrambi i trasportatori, VGluT1 nella regione prossimale dello strato molecolare VGluT2 nella regione più esterna di tale strato). Le terminazioni delle fibre rampicanti VGluT2 positive non esprimono mai SNAP-25. Da tali considerazioni si evince che l'espressione di SNAP-25 risulta segregata alle terminazioni delle fibre parallele sin dalle prime fasi di sviluppo.

Le osservazioni riguardanti la localizzazione della SNAP-25 (mediante microscopia elettronica e immunofluorescenza) ci hanno suggerito che i livelli molto bassi della SNAP-25, in particolare nella fibra rampicante, non possono

essere responsabili del rilascio vescicolare che avviene in tali sinapsi. A conferma di tale ipotesi abbiamo eseguito degli esperimenti con la BoNT-A per testare *in vivo* il rilascio vescicolare a livello della rampicante. Abbiamo utilizzato come modello sperimentale la spinogenesi attività dipendente che si osserva nel cervelletto in seguito a blocco dell'attività elettrica. In assenza di attività elettrica numerose spine si formano sul ramo dendritico prossimale delle Purkinje poiché l'input presinaptico, rappresentato dalla fibra rampicante, non è più in grado di esercitare un effetto di inibizione laterale indotta da attività (Cesa et al, ). I meccanismi molecolari alla base di tale fenomeno sono complessi ed ancora non noti. Analogamente alla TTX, il trattamento di una settimana con BoNT-A somministrata in dosi massime non letali, bloccando il rilascio vescicolare da parte di tutte le sinapsi, incluse le fibre rampicanti, avrebbe dovuto indurre la formazione di nuove spine. Poiché non abbiamo osservato tale fenomeno nelle zone intensamente marcate con l'anticorpo anti-SNAP-25 tagliata, possiamo dedurre che il rilascio vescicolare a livello delle sinapsi rampicanti sia avvenuto regolarmente. Infatti, dati elettrofisiologici preliminari condotti su fettine di cervelletto derivate da ratti trattati con BoNT-A hanno confermato la presenza della risposta delle fibre rampicanti e una considerevole riduzione se non assenza della risposta delle fibre parallele.

Per quanto riguarda la SNAP-23, i risultati da noi ottenuti, sia con l'immunofluorescenza che con la microscopia elettronica, ne indicano livelli rilevabili in tutti i terminali glutamatergici senza nessuna localizzazione preferenziale. L'anticorpo utilizzato nei nostri esperimenti è un anticorpo commerciale utilizzato anche da Bragina e la cui specificità è stata confermata tramite Western Blot. Nel lavoro di Bragina i livelli di SNAP23 in corteccia cerebrale sono più alti nelle terminazioni VGluT2 rispetto alle VGluT1 positive, indicando una localizzazione preferenziale nel sottotipo neuronale identificato dal VGluT2. D'altro canto, nel cervelletto, i livelli molto bassi nella fibra rampicante (identificata dal VGluT2) inducono a pensare che anche questa isoforma non possa essere coinvolta nel rilascio vescicolare a livello della terminazione della rampicante.

Un'altra osservazione degna di nota riguarda la presenza della SNAP-25 e della SNAP-23 non solo a livello delle terminazioni sinaptiche ma anche lungo le fibre assonali. Per quanto riguarda la SNAP-25 anche altri gruppi ne hanno osservato la presenza lungo axolemma e i dendriti (Galli et al, 1995), risultando di conseguenza, una delle proteine più abbondanti del sistema nervoso rappresentando circa l'1% di tutte le proteine del cervello (Walch-Solimena et al, 1995). La presenza della SNAP-25 in zone extra sinaptiche induce a pensare che tale proteina possa avere ruoli diversi in compartimenti cellulari diversi.

## ***5.2 Ruolo Regolatorio della SNAP-25***

La SNAP-25 è una proteina multifunzionale coinvolta nella secrezione del neurotrasmettitore, attraverso varie interazioni. Infatti, interagendo con le altre componenti del complesso SNARE è coinvolta nel rilascio evocato dipendente dal calcio come dimostrato da studi su topi KO e dal trattamento con le tossine botuliniche (Washbourne et al, 2002; Sorensen et al, 2003).

La SNAP-25, interagisce anche con la sinaptotagmina, (Schiavo et al, 1997), per innescare la fusione di membrana  $Ca^{2+}$ -dipendente (Zhang et al, 2002) e per controllare la dinamica di fusione del poro durante la fase finale dell'esocitosi (Bai et al, 2004), e sembra inoltre possa modulare i canali del calcio voltaggio dipendenti (VGCCs) (Catterall, 1999; Zamponi, 2003). In particolare, è stato dimostrato che in cellule non neuronali, interagisce con diversi tipi di VGCCs inclusi gli N-type (Sheng et al., 1996) P/Q-type (Martin-Moutot et al, 1996; Rettig et al, 1996) ed L-type (Wiser et al, 1999). Nello specifico, è stato dimostrato che la SNAP-25 interagisce fisicamente con i canali mediante una regione detta synprint (presente nel canale) definita come il sito d'interazione della proteina sinaptica. Questa interazione altera la funzione del canale riducendo la corrente negli N-Type (Wiser et al., 1996), inibendo la corrente degli L-Type (Ji et al., 2002), o riducendo l'attività dei P/Q Type spostandolo la dipendenza del voltaggio dell'inattivazione verso potenziale di membrana più negativi (Zhong et al., 1999).

Registrazioni elettrofisiologiche effettuate su fettine di ippocampo derivate da topi SNAP-25<sup>+/-</sup> nei quali i livelli di espressione della proteina sono più bassi rispetto ai topi wild-type, hanno mostrato un aumento della paired-pulse facilitation (PPF) in particolare a brevi intervalli tra due impulsi. Inoltre, la depolarizzazione nei neuroni SNAP-25<sup>+/-</sup> e SNAP-25<sup>-/-</sup> in coltura, determina un aumento significativo nella concentrazione del calcio se confrontati con wild-type (Pozzi et al, 2008). È stato osservato che la SNAP-25 modula la dinamica del calcio inibendo i canali del calcio voltaggio-dipendenti mediante la fosforilazione della ser187 attraverso la via dipendente dalla Protein Kinasi C (Pozzi et al, 2008). L'esatto meccanismo attraverso il quale la fosforilazione della SNAP-25 controlla la dinamica del calcio non è tuttavia ancora ben definito.

Oltre alla SNAP-25 altre proteine che formano il complesso SNARE legano i VGCCs in seguito a fosforilazione dipendente da attività. Nel complesso si ipotizza che l'entrata del calcio attraverso i canali venga favorita lì dove le vescicole sono pronte per il rilascio e non in quelle regioni della membrana plasmatica in cui non può avvenire poiché il complesso SNARE non è assemblato. È possibile che tale fosforilazione non influenzi direttamente l'interazione tra la SNAP-25 ed il canale, ma controlli la distribuzione intracellulare della proteina favorendone la localizzazione a livello del plasmalemma, dove le SNARE protein ed i canali del calcio sono clasterizzati in microdomini lipidici. Inoltre la SNAP-25a che sembra non riesca a modulare la dinamica del calcio, differisce dall'isoforma -b solo per 9 residui, che includono cisteine palmitolate necessarie per la localizzazione in membrana. Tutti questi dati suggeriscono pertanto che la modulazione dei canali del calcio da parte della SNAP-25 è regolata a livelli multipli dalla fosforilazione, che interviene sia nella localizzazione delle SNARE nel compartimento cellulare adatto che modulando direttamente l'interazione tra la SNAP-25 e la regione synprint del canale (Pozzi et al, 2008).

Come dimostrato da numerosi lavori, i livelli di espressione della SNAP-25 incidono sulla dinamica intracellulare del calcio e sulla plasticità sinaptica. Dato che nei neuroni eccitatori e in quelli inibitori sono espressi livelli diversi di SNAP-25, ci si potrebbe domandare come viene diversamente controllato l'influsso del calcio in popolazioni neuronali fenotipicamente diverse. I neuroni ippocampali

GABAergici sono infatti caratterizzati da una risposta al calcio più alta rispetto a quelli glutamatergici. Se si induce, l'espressione esogena di SNAP-25 negli interneuroni GABAergici si osserva una riduzione significativa della risposta al calcio in seguito a stimolazione (Verderio et al, 2004). Tutti questi dati suggeriscono che i livelli diversi di SNAP-25 nei neuroni inibitori e in quelli eccitatori, possono modulare (con un meccanismo dipendente dalla concentrazione) la risposta neuronale allo stimolo.

Analogamente, sorge spontanea l'ipotesi che tale effetto modulatore possa essere responsabile delle diverse proprietà elettrofisiologiche caratteristiche dei sottotipi neuronali glutamatergici studiati. Tali proprietà elettrofisiologiche riguardano ad esempio la probabilità di rilascio vescicolare che può essere classificata come alta o bassa, e forme di plasticità sinaptica a breve termine che in genere sono associate al tipo di rilascio vescicolare che caratterizza la sinapsi. I fenomeni di plasticità sinaptica a breve termine riflettono tipicamente cambiamenti presinaptici nel rilascio di neurotrasmettitore che si verificano in un arco temporale che va dai millisecondi ai minuti. Ne esistono diverse forme che si manifestano o come un aumento della trasmissione sinaptica (facilitation, etc,) o come una riduzione (depression). Sebbene i meccanismi molecolari alla base delle diverse forme di plasticità non siano note, è comunque assodato che sono tutte forme dipendenti dal calcio. Come descritto precedentemente nel cervelletto le due afferenze eccitatori principali che contattano la cellula del Purkinje presentano caratteristiche funzionali molto diverse. Le fibre rampicanti, che inducono un'ampia risposta tutta o nulla nella cellula del Purkinje, sono infatti sinapsi ad alta probabilità di rilascio e presentano paired-pulse depression (PPD). Le fibre parallele invece hanno caratteristiche opposte cioè sono sinapsi a bassa probabilità di rilascio e presentano paired pulse facilitation (PPF). I meccanismi responsabili di tali differenze elettrofisiologiche potrebbero essere di diversa natura. Le diverse isoforme che costituiscono il macchinario responsabile del rilascio vescicolare, oppure le differenze a livello di entrata di calcio, buffering o distanza di diffusione al pool di vescicole pronto per il rilascio sono tutti fattori direttamente coinvolti in tali fenomeni. Come citato precedentemente la SNAP-25 è in grado di regolare la dinamica del calcio intracellulare tramite l'inibizione dei canali calcio voltaggio

dipendenti. Il diverso controllo nella dinamica del calcio potrebbe aver ad esempio alcune conseguenze funzionali, come il controllo del riciclo eso-endocitotico delle vescicole. In accordo i neuroni inibitori che mancano di SNAP-25 hanno una maggiore risposta al calcio che riflette una maggiore velocità del rilascio rispetto a quella sostenuta dai neuroni glutamatergici (Burke and Rudomin, 1977; Bacci et al, 2001). Inoltre, l'espressione esogena della SNAP-25 nei neuroni inibitori, regola negativamente il riciclo delle vescicole, probabilmente a causa di una riduzione della risposta al calcio. Tutti i processi legati alla regolazione della probabilità di rilascio, dello svuotamento delle vescicole del grado di rifornimento e riciclo vescicolare sono comunque legati direttamente o indirettamente alla SNAP-25. Tali fenomeni determinano direttamente le cinetiche e l'ampiezza della plasticità sinaptica a breve termine. La presenza della SNAP-25 nei terminali delle fibre parallele potrebbe quindi contribuire a definire le proprietà funzionali di tali sinapsi oltre ad essere coinvolte nel rilascio vescicolare. Analogamente l'assenza della SNAP-25 nella fibra rampicante ne potrebbe spiegare le sue proprietà elettrofisiologiche. La PPD tipica della terminazione rampicante sembra dipendere dall'esaurimento rapido del pool vescicolare pronto al rilascio (Zucker and Regehr 2002), la presenza della SNAP-25 potrebbe alterare tale processo.

Tali risultati hanno aperto nuove linee di ricerca che potrebbero aiutare a capire i meccanismi molecolari alla base della trasmissione sinaptica e della plasticità neuronale. Un obiettivo sarà quello di identificare l'isoforma o la proteina non nota che sostituisce la SNAP-25 nel rilascio vescicolare evocato in questi particolari terminazioni. Un altro progetto indagherà in maniera più approfondita il nuovo ruolo regolatorio della SNAP-25. In particolare l'obiettivo sarà quello di over-esprimere in vivo, la SNAP-25 nella fibra rampicante per studiarne gli effetti a livello elettrofisiologico sia andando a misurare la trasmissione sinaptica che la PPD. Lo stesso esperimento verrà effettuato per la SNAP-23. Questi studi verranno effettuati *in vivo* grazie all'utilizzo di particelle lentivirali che possono veicolare l'espressione del gene di interesse in neuroni specifici, nel tal caso nei neuroni del nucleo olivare. L'utilizzo della proteina di fusione tra SNAP25 e GFP o SNAP-23 e GFP (i cui costrutti sono stati forniti dalla

prof. Matteoli) consentirà la visualizzazione della fibra rampicante marcata in fettina.

Lo studio di proteine del complesso SNARE, come SNAP-25, che possono influenzare la dinamica del calcio e la plasticità sinaptica è di cruciale importanza per poter capire il funzionamento del cervello sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

## Bibliografia

Albus J.S., (1971), *A theory of cerebellar function*. Math Biosci 10:25-61

Antonucci F., Rossi C., Gianfranceschi L., Rossetto O., Caleo M., (2008) *Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A*. J Neurosci, 28(14):3689-3696

Augustine G.J., (2001), *How does calcium trigger neurotransmitter release?* Curr Opin Neurobiol 11(3): p. 320-6.

Bacci A., Coco S., Pravettoni E., Schenk U., Armano S., Frassoni C., Verderio C., De Camilli P., Matteoli M., (2001), *Chronic blockade of glutamate receptors enhances presynaptic release and down-regulates the interaction between synaptophysin-synaptobrevin-vesicles-associated membrane protein 2*. J Neurosci 21:6588-6596

Bai J., Wang C.T., Richards D.A., Jackson M.B., Chapman E.R., (2004), *Fusion pore dynamics are regulated by synaptotagmin-t-SNARE interactions*. Neuron 41:929-942

Banerjee A., Kowalchuk J.A., DasGupta B.R., Martin T.F.J., (1996), *SNAP-25 is required for a late postdocking step in  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis*. J Biological Chemistry, 271;34:20227-20230

Bark I.C., Hahn K.M., Ryabinin A.E., Wilson M.C., (1995), *Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neuronal development*. Proc Natl Acad Sci USA 92:1510-1514

Bennett M.K., Scheller R.H., (1993), *The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A 90(7): p. 2559-63.

Berghuis P., Dobszay M.B., Sousa K.M. Schulte G., Mager P.P., Hartig W., Gorcs T.J., Zilberter Y., Ernfors P., Harkany T., (2004), *Brain-derived neurotrophic factor controls functional differentiation and microcircuit formation of selectively isolated fast-spiking GABAergic interneurons*. Eur J Neurosci 20:1290-1306

Boschert U., O'Shaughnessy C., Dickinson R., Tessari M., Bendotti C., Catsicas S., Pich E.M., (1996), *Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain*. J Comp Neurol 367:177-193

Bragina L., Candiracci C., Barbaresi P., Giovedì S., Benfenati F., Conti F., (2007), *Heterogeneity of glutamatergic and GABAergic release machineries in cerebral cortex*. Neuroscience 146:1829-1840

Bronk P., Deak F., Wilson M.C., Liu X., Sudhof T.C., Kavalali E.T., (2007), *Differential effects of SNAP-25 deletion on  $Ca^{2+}$ -dependent and  $Ca^{2+}$ -independent neurotransmission*. J Neurophysiol 98:794-801

Burke R.E., Rudomin P., (1977), *The nervous system*. In Handbook of Physiology, Section 1, pp 877-944

Capogna M., McKinney R.A., O'Connor V., Gähwiler B.H., Thompson S.M., (1997), *Ca<sup>2+</sup> or Sr<sup>2+</sup> partially rescues synaptic transmission in hippocampal cultures treated with botulinum toxin A and C, but not tetanus toxin.* J. Neurosci 17:7190-7202

Catsicas S., Catsicas M., Keyers K.T., Karten H.J., Wilson M.C., Milner R.J., (1992), *Differential expression of the presynaptic protein SNAP-25 in mammalian retina.* J Neurosci Res 33:1-9

Catterall W.A., (1999), *Interactions of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels and snare proteins in neurotransmitter release.* Ann N Y Acad Sci 868:144-159

Catterall W.A., Few A.P., (2008), *Calcium channel regulation and presynaptic plasticity.* Neuron 59:882-901

Cesa R., Morando L., Strata, P., (2003), *Glutamate receptor delta2 subunit in activity-dependent heterologous synaptic competition.* J Neurosci. 23, 2363-2370.

Cesa R., Morando L., Strata, P., (2005), *Purkinje cell spinogenesis during architectural rewiring in the mature cerebellum.* EJ Neurosci. 22, 579-586

Cesa R., Strata P., (2007), *Activity-dependent axonal and synaptic plasticity in the cerebellum.* Psychoneuroendocrinology. 32 Suppl 1, S31-35.

Chapman E.R., Hanson P.I., Jahn R., (1995), *The neuronal exocytotic fusion machine: some new developments.* Neuropharmacology, 34:1343-1349

Chen D., Minger S.L., Honer W.G., Whiteheart S.W., (1999), *Organization of the secretory machinery in the rodent brain: distribution of the t-SNARE, SNAP-25 and SNAP-23.* Brain Research, 831:11-24

Chieriegatti E., Chika M. C., Chapman E.R., Baldini G., (2004), *SNAP-23 functions in docking/fusion of granules at low Ca<sup>2+</sup>*. *Molecular Biology of the cell*, 15: p.1918-1930

Coemans M., Weber J.T., De Zeeuw C.I., Hansel C., (2004), *Bidirectional parallel fiber plasticity in the cerebellum under climbing fiber control*. *Neuron*, 44:691-700

Damasio A.R., Grabowski T.J., Bechara A., Damasio H., Ponto L.L., Parvizi J., Hichwa R.D. (2000), *Subcortical and cortical brain activity during the feeling of self-generated emotions*. *Nat Neurosci* 3:1049-1056

David D., Sundarababu S., Gerst J.E., (1998), *Involvement of long chain fatty acid elongation in the trafficking of secretory vesicles in yeast*. *J Cell Biol* 143:1167-1182

Delgado-Martinez I., Nehring R.B., Sorensen J.B., (2007), *Differential abilities of SNAP-25 homologs to support neuronal function*. *J Neurosci* 27:9380-9391

Duc C., Catsicas S., (1995), *Ultrastructural localization of SNAP-25 within the rat spinal cord and peripheral nervous system*. *J Comp Neurol* 356:152-163

Elferink L.A., Trimble W.S., Scheller R.H., (1989), *Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system*. *J Biol Chem*, 264(19): p. 11061-4.

Fasshauer D., Antonin W., Margittai M., Pabst S., Jahn R., (1999), *Mixed and noncognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties*. *J Biol Chem*; 274:15440-15446

Frasconi C., Inverardi F., Coco S., Ortino B., Grumelli C., Pozzi D., Verderio C., Matteoli M., (2005), *Analysis of synaptosomal-associated protein of 25 kDa*

(SNAP25) immunoreactivity in hippocampal inhibitory neurons during development in culture and in situ. *Neuroscience*, 131 p:813-823

Freneau R.T.J., Troyer M.D., Pahner I., Nygaard G.O., Tran C.H., Reimer R.J., Bellocchio E.E., Fortin D., Storm-Mathisen J., Edwards R.H., (2001), *The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse*. *Neuron*, 31:247-260

Freneau R.T.J., Voglmaier S., Seal R.P., Edwards R.H., (2004), *VGLUTs define subset of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate*. *Trends in Neurosciences*, 27:98-103

Galli T., Garcia E.P., Mundigi O., Chilcote T. J. and De Cavilli P., (1995), *v- and t-SNAREs in neuronal exocytosis: A need for additional components to define site of release*. *Neuropharmacology*,. 34(11): p. 1351-1360

Galli T., Haucke V., (2004), *Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast!* *Sci STKE*, 2004(264): p. re19

Garbelli R., Inverardi F., Medici V., Amadeo A., Verderio C., Matteoli M., and Frassoni C., ( 2008), *Heterogeneous expression of SNAP-25 in rat and human brain*. *The journal of comparative neurology*, 506 p:373-386

Gerst J. E., (1999), *SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis*. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 55: p. 707-734

Gibbins I.L., Jobling P., Teo E.H., Matthew S.E., Morris J.L., (2003), *Heterogeneous expression of SNAP-25 and synaptic vesicle proteins by central and peripheral inputs to sympathetic neurons*. *J Comp Neurol* 459:25-43

Hasler G., Fromm S., Alvarez R.P., Luckenbaugh D.A., Drevets W.C., Grillon C. (2007), *Cerebral blood flow in immediate and sustained anxiety*. J Neurosci 27:6313-6319

Hayashi T., McMahon H., Yamasaki S., Binz T., Hata Y., Sudhof T.C., Niemann H., (1994), *Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly*. EMBO J;13:5051-5061

Hellstrom J., Arvidsson U., Elde R., Cullheim S., Meister B., (1999), *Differential expression of nerve terminal protein isoforms in VAcHT-containing varicosities of the spinal cord ventral horn*. J Comp Neurol 411:578-590

Hepp R., Perraut M., Chasserot-Golaz S., Galli T., Aunis D., Langley K., Grant N.J., (1999), *Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23*. GLIA, 27:181-187

Hioki H., Fujiyama F., Taki K., Tomioka R., Furuta T., Tamamaki N., Kaneko T., (2003), *Differential distribution of vesicular glutamate transporters in the rat cerebellar cortex*. Neuroscience, 117:1-6

Hisano S., Sawada K., Kawano M., Kanemoto M., Xiong G., Mogi K., Sakata-Haga H., Takeda J., Fukui Y., Nogami H., (2002), *Expression of inorganic phosphate/vesicular glutamate transporters (BNPI/VGLUT1 and DNPI/VGLUT2) in the cerebellum and precerebellar nuclei of the rat*. Molecular Brain Research, 107:23-31

Hua S.Y., Raciborska D.A., Trimble W.S., Charlton M.P., (1998), *Different VAMP/synaptobrevin complexed for spontaneous and evoked transmitter release at the crayfish neuromuscular junction*. J Neurophysiol;80:3233-3246

Ito M., (1984), *The cerebellum and neuronal control*. New York: Raven

Ito M., (2001), *Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles*. *Physiol Rev* 81:1143-1195

Jahn R. Sudhof T.C., *Membrane fusion and exocytosis*. *Annu Rev Biochem*, 1999. 68: p. 863-911.

Ji J., Yank S.N., Huang X., Li X., Sheu L., Diamant N., Berggren P.O., Gaisano H.Y., (2002), *Modulation of L-type Ca(2+) channels by distinct domains within SNAP-25*. *Diabetes* 51:1425-1436

Kavalali Ege T., (2002) *Snare interactions in membrane trafficking: a perspective from mammalian central synapses*. *BioEssays*, 24: p. 926-936

Leabu M., (2006), *Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanism*. *J. Cell. Mol. Med.*, 10(2): p423-427

Lin R.C., Scheller R.H., (2000), *Mechanism of synaptic vesicle exocytosis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16: p19-49

Llinas R., Sugimori M., Silver R.B., (1995), *The concept of calcium concentration microdomains in synaptic transmission*. *Neuropharmacology*, 34(11): p.1443-51

Marr D., (1969) *A theory of cerebellar cortex*. *J Physiol*, 202, 437-470.

Martin-Moutot N., Charvin N., Leveque C., Sato K., Nishiki T., Kozaki S., Takahashi M., Seagar M., (1996), *Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes*. *J Biol Chem* 271:6567-6570

Martinez-Arca S., Alberts P., Zahraoui A., Louvard D., Galli T., (2000), *Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth*. *J Cell Biol* 149:889-900

Miyazaki T., Fukaya M., Shimizu H., Watanabe M., (2003), *Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibers-Purkinje cells synapses in developing mouse cerebellum*. Eur J. Neurosci 17:2563-2572

Montecucco C., Schiavo G., (1994), *Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins*. Mol Microbiol, 13(1): p. 1-8.

Montecucco C., Schiavo G., Pantano S., (2005), *SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close?* Trends Biochem Sci, 30(7): p. 367-72.

Morris J.L., Lindberg C.E., Gibbins I.L., (2000), *Different levels of immunoreactivity for synaptosomal-associated protein of 25kDa in vasoconstrictor and vasodilator axons of guinea-pigs*. Neurosci Lett 294:167-170

Murthy V.N., Stevens C.F., (1999), *Reversal of synaptic vesicle docking at central synapses*. Nat Neurosci, 2:503:507

Nishiyama H., Linden D.J., (2007), *Pure spillover transmission between neurons*. Nature Neuroscience 10:675-676

Nonet M.L., Saifee O., Zhao H., Rand J.B., Wei L., (1998), *Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants*. J Neurosci, 18:70-80

Ohki S., (1982), *A mechanism of divalent ion-induced phosphatidylserine membrane fusion*. Biochim Biophys Acta, 689:1-11

Ohki S., (1984), *Effects of divalent cations, temperature, osmotic pressure gradient, and vesicle curvature on phosphatidylserine vesicle fusion*. J Membr Biol, 77:265-275

Osen-Sand A., et al., (1996), *Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release*. J Comp Neurol, 367(2): p. 222-34.

Oyler G.A., Polli J.W., Wilson M.C., Billingsley M.L. (1991), *Development expression of the 25kDa synaptosomal-associated protein (SNAP25) in rat brain*. Neurobiology, 88 p:5247-5251

Oyler G.A., Higgins G.A., Hart R.A., Battenberg E., Billingsley M., Bloom F.E., Wilson M.C., (1989), *The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations*. J Cell Biol 109:3039-3052

Pozzi D., Condliffe S., Bozzi Y., Chikhladze M., Grumelli C., Proux-Gillardeaux V., Takahashi M., Franceschetti S., Verderio C., Matteoli M., (2008), *Activity-dependent phosphorylation of Ser187 is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium channel*. PNAS, 105(1): p.323-328

Ploghaus A., Tracey I., Clare S., Gati J.S., Rawlins J.N., Matthews P.M., (2000), *Learning about pain: the neural substrate of the prediction error to aversive events*. Proc. Natl Acad Sci USA 97:9281-9286

Ploghaus A., Tracey I., Gati J.S., Clare S., Menon R.S., Matthews P.M., Rawlins J.N., (1999), *Dissociating pain from its anticipation in the human brain*. Science 284:1979-1981

Proux-Gillardeaux V., Galli T., Callebaut I., Mikhailik A., Calothy G., Marx M., (2003) *D53 is a novel endosomal SNARE-binding protein that enhances interaction of syntaxin 1 with the synaptobrevin 2 complex in vitro*. Biochem J. 370:213-221

Ramon y Cajal S., (1911), *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Maloine, Paris.

Raptis A., et al., (2005), *Distribution of synaptobrevin/VAMP1 and 2 in rat brain*. J Chem Neuroanat, 30(4): p.201-11

Ravichandran V., Chawlat A., Roche P. A., (1996), *Identification of a novel Syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non neuronal tissue*. The Journal of biological chemistry, 271(23) Issue of June 7. p: 13300-13303.

Reim K., Mansour M., Varoqueaux F., McMahon H.T., Sudhof T.C., Brose N., Rosenmund C., (2001), *Complexins regulate a late step in  $Ca^{2+}$ -dependent neurotransmitter release*. Cell, 104:71-81

Rettig J., Neher E., (2002), *Emerging roles of presynaptic proteins in  $Ca^{++}$ -triggered exocytosis*. Science, 298:781-785

Rettig J., Sheng Z.H., Kim D.K., Hodson C.D., Snutch T.P., Catterall W.A., (1996), *Isoform specific interactions of the alpha1A subunits of brain  $Ca^{2+}$  channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25*. Proc Natl Acad Sci USA 93:7363-7368

Reuter H., (1996), *Diversity and function of presynaptic calcium channel in the brain*. Curr Opin Neurobiol, 6(3): p331-7

Sacchetti B., Baldi E., Lorenzini C.A., Bucherelli C., (2000), *Cerebellar role in fear-conditioning consolidation*. Proc Natl Acad Sci USA 99:8406-8411

Sacchetti B., Scelfo B., Strata P., (2005), *The cerebellum: synaptic changes and fear-conditioning*. Neuroscientist 11:217-227

Sacchetti B., Scelfo B., Tempia F., Strata P., (2004), *Long term synaptic changes induced in the cerebellar cortex by fear conditioning*. Neuron 42:973-982

Sadoul K., Berger A., Niemann H., Weller U., Roche P.A., Klip A., Trimble W.S., Regazzi R., Catsicas S., Halban P.A., (1997), *Snap23 is not cleaved by botulinum neurotoxin e and can replace SNAP-25 in the process of insulin secretion*. J. Biol. Chem., 272, p:33023-33027

Salin P., Malenka R.C., Nicoll R.A., (1996), *Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses*. Neuron 16:797-803

Sakaba T., Stein A., Jahn R., Neher E., (2005), *Distinct kinetic changes in neurotransmitter release after SNARE protein cleavage*. Science, 309:491-494

Scales S.J., Finley M.F., Scheller R.H., (2001), *Cell biology.Fusion without SNAREs?* Science, 294:1015-1016

Scelfo B., Sacchetti B., Strata P., (2008), *Learning related long term potentiation of inhibitory synapsis in the cerebellar cortex*. Proc Natl Acad Sci USA 105:769-774

Scelfo B., Strata P., (2005), *Correlation between multiple clamping fibers regression and parallel fibers response development in the postnatal mouse cerebellum*. Eur J Neurosci, 21:971-978

Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C., (2000), *Neurotoxins affecting neuroexocytosis*. Physiol Rev, 80 p:717-766

Schiavo G., Stenbeck G, Rothman J.E., Sollner T.H., (1997), *Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicle at neurotoxin-treated synapses*. Proc Natl Acad Sci USA 94:997-1001

Schoch S., Deak F., Konigstorfer A., Mozhayeva M., Sara Y., Sdhof T.C., Kavalali E.T., (2001), *Snare function analyzed in synaptobrevin /VAMP knockout mice*. Science, 294:1117-1122

Schulze K.L., Broadie K., Perin P.S., Bellen H.J., (1995), *Genetic and electrophysiological studies of Drosophila syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission*. Cell, 80:311-320

Scott E. Jarvis, Gerald W. Zamponi, (2005), *Master or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channel*. Cell C., 37:483-488

Sheng Z.H., Rettig J., Cook T., Catterall W.A., (1996), *Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex*. Nature 379:451-454

Sorensen J.B., (2005), *SNARE complexes prepare for membrane fusion*. Trends Neurosci, 28(9): p. 453-5.

Sorensen J.B., Matti U., Wei S.H., Nehring R.B., Voets T., Ashery U., Binz T., Neher E., Retting J., (2002), *The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis*. Proc Natl Acad Sci SA, 99:1627-1632.

Sorensen J.B., Nagy G., Varoqueaux F., Nehring R.B., Brose N., Wilson M.C., Neher E., (2003), *Differential control of the releaseable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23*. Cell 114:75-86

Stojilkovic S.S., (2005), *Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis and SNARE function*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 16(3): p.81-83.

Strata P., Rossi F., (1998), *Plasticity of the olivocerebellar pathway*. Trends Neurosci 21:407-413

Su Q., Mochida S., Tian J.H., Mehta R., Sheng Z.H., (2001), *SNAP-29: a general SNARE protein that inhibits SNARE disassembly and is implicated in synaptic transmission*. Proc Natl Acad Sci USA 98:14038-14043

Sudhof T.C., (1995), *The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions*. Nature, 375(6533): p. 645-53.

Sudhof, T.C., (2004), *The synaptic vesicle cycle*. Annu Rev Neurosci, 27: p. 509-47.

Tafuya L.C., Mameli M., Miyashita T., Guzowsky, Valenzuela C.F., Wilson M.C., (2006), *Expression and function of SNAP-25 as a universal SNARE component in GABAergic neurons*. J Neurosci 26:7826-7838

Takamori S., (2006), *VGLUTs: 'Exciting' times for glutamatergic research?* Neuroscience Research, 55:343-351

Tao-Cheng J.H., Du J., McBain C.J., (2000), *SNAP-25 is polarized to axons and abundant along the axolemma: an immunogold study of intact neurons*. J of Neurocytology, 29:67-77

Verderio C., Rossetto O., Grumelli C., Frassoni C., Montecucco C., Mattioli M., (2006), *Entering neurons: botulin toxins and synaptic vesicle recycling*. EMBO 7:995-999

Verderio C., Pozzi D., Pravettoni E., Inverardi F., Schenk U., Coco S., Proux-Gillardeaux V., Galli T., Rossetto O., Frassoni C., Matteoli M., (2004), *SNAP-25 modulation of calcium dynamics underlies difference in GABAergic and Glutamatergic responsiveness to depolarization*. Neuron, 41(19): p. 599-610

Verderio C., Grumelli C., Raiteri L., Coco S., Paluzzi S., Caccin P., Rossetto O., Bonanno G., Montecucco C., Matteoli M., (2007), *Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons*. Traffic, 8:142-153

Wadiche J.I., Jahr C.E., (2001), *Multivesicular release at climbing fiber-purkinje cell synapses*. Neuron 32:301-313

Walch-Solimena C., Blasi J., Edelmann L., Chapman E.R., Von Mollard G.F., Jahn R., (1995), *The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling*. J Cell Biol 128:637-645

Washbourne P., Thompson P.M., Carta M., Costa E.T., Mathews J.R., Lopez Bendito G., Molnar Z., Bacher M.W., Valenzuela C.F., Partridge L.D., et al., (2002), *Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis*. Nat Neurosci, 5:19-26

Weber T., et al., (1998), *SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion*. Cell, 92(6): p. 759-72.

Wiser O., Bennett M.K., Atlas D., (1996), *Functional interaction of syntaxin and SNAP-25 with voltage-sensitive L- and N-type Ca<sup>2+</sup> channels*. EMBO J 15:4100-4110

Wiser O., Trus M., Hernandez A., Renstrom E., Barg S., Rorsman P., Atlas D., (1999), *The voltage sensitive Lc-type Ca<sup>2+</sup> channel is functionally coupled to the exocytotic machinery*. Proc Natl Acad Sci USA 96:248-253

Wu M.N., Fergestad T., Lloyd T.E., He Y., Broadie K., Bellen H.J., (1999), *Syntaxin 1A interacts with multiple exocytotic proteins to regulate neurotransmitter release in vivo*. Neuron, 23: p.593-605.

Xu-Friedman M.A., Harris K.M., Regher W.G., (2001), *Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto Cerebellar Purkinje cells*. J Neurosci 21(17):6666-6672

Yang B., Gonzalez L.Jr., Prekeris R., Steegmaier M., Advani R.J., Scheller R.H., (1999), *SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity*. J Biol Chem; 274:5649-5653

Yang Y., Xia Z., Liu Y., (2000), *SNAP-25 functional domains in SNARE core complex assembly and glutamate release of cerebellar granule cells*. J Biological Chemistry, 275;38:29482-29487

Zamponi G.W., (2003), *Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins*. J Pharmacol Sci 92:79-83

Zhang X., Kim-Miller M.J., Fakuda M., Kowalchuk J.A., Martin T.F., (2002), *Ca<sup>2+</sup>-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis*. Neuron 34:599-611

Zhen M., Jin Y., (2004), *Presynaptic terminal differentiation: transport and assembly*. Curr Opin Neurobiol, 14(3): p280-7

Zhong H., Yokoyama C.T., Scheuer T., Catterall W.A., (1999), *Reciprocal regulation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin*. Nat Neurosci 2:939-941

Zhu L., Scelfo B., Tempia F., Sacchetti B., Strata P., (2006), *Membrane excitability and fear conditioning in cerebellar purkinje cell*. Neurosci 140:801-810

Zucker R.S., Regher W.G., (2002), *Short term synaptic plasticity*. Annual Review of Physiology, 64:355-405

## Ringraziamenti

Ringrazio,

il Prof. Piergiorgio Strata, esempio di grande professionalità e passione per la Scienza, per avermi dato l'opportunità di concludere serenamente questo percorso di crescita professionale e scientifica.

Un ringraziamento particolare alla Dott.ssa Georgia Mandolesi per avermi seguito in questi anni con serenità, dedizione ed amicizia, trasmettendomi i principi ed i valori della ricerca scientifica.

I colleghi del laboratorio: il Dott. Paolo Cesare per i preziosi consigli, la Dott.ssa Eleonora Autori, con cui ho condiviso degli anni importanti, per la sincera amicizia ed il sostegno, il Dott. Giorgio Grasselli per la disponibilità e la grande professionalità, la Dott.ssa Francesca Pugliesi per aver condiviso questi ultimi mesi di lavoro con grande armonia e la Dott.ssa Roberta Cesa del laboratorio di Torino per l'importante supporto per la realizzazione di questo lavoro.

Marco il mio amore, la mia mamma ed il mio papà, mio fratello, i miei suoceri, i miei zii, Teresa....gli amici di sempre!