

## **Mechanisms of presynaptic modulation in the dopaminergic neurons of the *Substantia Nigra pars compacta*.**

Presynaptic inhibition is a mechanism of synaptic modulation normally observed in the synapses of the nervous system. This process starts upon activation of a large number of presynaptic receptors and leads to the decreased probability of vesicles to fuse to the cell membrane. One of the most common mechanism consists in the inhibition of the voltage dependent calcium channels (VDCC) located on the active zone of the presynaptic neuron. However, there is evidence for another form of presynaptic inhibition with a direct impairment of the vesicular release machinery. In my thesis I have investigated the mechanisms of presynaptic inhibition by group III metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and GABA<sub>B</sub> receptors of the GABAergic neurotransmission to dopamine (DA) neurones of the rat substantia nigra *pars compacta* (SNc). The group III mGluRs agonist L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (AP4, 100  $\mu$ M) and the GABA<sub>B</sub> receptor agonist baclofen (10  $\mu$ M) reversibly depressed the frequency of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) to  $48.5 \pm 3.7$  % and  $83.6 \pm 2.3$  % of control, respectively, with no effect in their amplitude. AP4 did not affect miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) recorded in tetrodotoxin (TTX, 1  $\mu$ M) and cadmium (100  $\mu$ M), while in TTX (1  $\mu$ M) and barium (1 mM), mIPSCs frequency was reduced to  $75.3 \pm 2.8$  % of control. In contrast, baclofen reduced mIPSCs frequency either in cadmium ( $70.0 \pm 6.7$  % of control) or barium ( $52.3 \pm 2.9$  % of control). In TTX and ionomycin (2  $\mu$ M), baclofen significantly reduced mIPSCs frequency to  $71.8 \pm 6.9$  % of control, while AP4 had no effect. Similarly, in TTX and  $\alpha$ -latrotoxin ( $\alpha$ -LTX, 0.3 nM), the frequency of mIPSCs was reduced by baclofen to  $64.5 \pm 4.8$  % of control, but was insensitive to AP4. Finally, in the continuous presence of baclofen, AP4 failed to produce any further reduction of sIPSCs frequency. The conclusion of this study is that group III mGluRs depress GABA release to DA neurons of the SNc through inhibition of presynaptic voltage-dependent calcium channels, while presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors also impair transmitter exocytosis, and both mechanisms coexist on the same synapses. This characterization provides new insights about the role of these presynaptic receptors in the physiology of the substantia nigra and their potential involvement in the treatment of neurodegenerative diseases such as Parkinson's Disease.

## **Meccanismi di modulazione presinaptica nei neuroni dopaminergici della *Substantia Nigra pars compacta*.**

L'inibizione presinaptica è un meccanismo di modulazione sinaptica comunemente osservato nelle sinapsi del sistema nervoso centrale e periferico. Questo processo inizia in risposta all'attivazione di un'ampia varietà di recettori presinaptici e porta ad una riduzione della probabilità di fusione delle vescicole con la membrana del terminale sinaptico. Uno dei più comuni meccanismi d'azione consiste nell'inibizione dei canali del calcio voltaggio dipendenti (VDCCs) localizzati nei bottoni presinaptici. Tuttavia, esistono altre forme di inibizione presinaptica con meccanismi che coinvolgono direttamente la machinery di rilascio vescicolare. In questa tesi ho studiato il meccanismo di inibizione presinaptica mediata dal recettore metabotropico del glutammato del tipo III (mGluRs) e dal recettore GABA<sub>B</sub> nella trasmissione GABAergica dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SNc) di ratto. L'AP-4 (100  $\mu$ M), agonista selettivo del recettore metabotropico del glutammato del tipo III, e il baclofen (10  $\mu$ M), agonista selettivo del recettore GABA<sub>B</sub>, riducono reversibilmente la frequenza delle correnti spontanee inibitorie post-sinaptiche (sIPSCs) rispettivamente del  $48.5 \pm 3.7$  % e del  $83.6 \pm 2.3$  % rispetto al controllo, senza avere alcun effetto sull'ampiezza della corrente. L'AP-4, non deprime la frequenza delle correnti inibitorie *miniature* post-sinaptiche (mIPSCs), registrate in tetrodotossina (TTX, 1  $\mu$ M) e cadmio (100  $\mu$ M), mentre è in grado di ridurre la frequenza delle mIPSCs del  $75.3 \pm 2.8$  % rispetto al controllo, in presenza di TTX (1  $\mu$ M) e bario (1 mM). Al contrario, il baclofen riduce la frequenza delle mIPSCs sia in cadmio ( $70.0 \pm 6.7$  % del controllo) sia in bario ( $52.3 \pm 2.9$  % del controllo). In TTX e ionomicina (2  $\mu$ M), il baclofen riduce significativamente la frequenza delle mIPSCs del  $71.8 \pm 6.9$  % del controllo, mentre l'AP-4 non ha effetto. In maniera simile, in presenza di TTX e  $\alpha$ -latrotossina ( $\alpha$ -LTX, 0.3 nM), la frequenza delle mIPSCs è diminuita del  $64.5 \pm 4.8$  % del controllo dal baclofen, mentre mantiene gli stessi valori in presenza di AP-4. Infine, in continua presenza di baclofen, l'AP-4 non causa un'ulteriore riduzione della frequenza delle sIPSCs. La conclusione di questi studi è che i recettori metabotropici del glutammato del tipo III deprimono il rilascio di GABA dai neuroni dopaminergici della SNc, attraverso l'inibizione dei VDCC, mentre i recettori presinaptici GABA<sub>B</sub> coinvolgono direttamente il rilascio vescicolare del neurotrasmettitore. Inoltre questi due diversi

meccanismi di inibizione pre-sinaptica coesistono nello stesso terminale sinaptico. Questa caratterizzazione fornisce nuove conoscenze sul ruolo di questi recettori presinaptici nello studio della fisiologia della *substantia nigra* e nel loro potenziale uso come target nel trattamento farmacologico di malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson.

**Parole chiave: mGluRs; GABAB; inibizione presinaptica; sostanza nera; dopamina.**

**Key words: mGluRs; GABAB; presynaptic inhibition; substantia nigra; dopamine**

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



FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
NEUROSCIENZE

XX° CICLO

**“Meccanismi di modulazione presinaptica nei neuroni  
dopaminergici della *Substantia Nigra*  
*pars compacta*”**

Michela Giustizieri

Docente Guida/Tutor: Dott. Nicola Berretta

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

INTRODUZIONE.....	6
I GANGLI DELLA BASE .....	6
LA SOSTANZA NERA E IL SISTEMA DOPAMINERGICO .....	10
Afferenze alla sostanza nera compatta .....	13
LA TRASMISSIONE SINAPTICA.....	14
L'organizzazione del terminale presinaptico.....	17
Esocitosi .....	23
<i>Le proteine SNAREs</i> .....	23
<i>Il priming delle vescicole</i> .....	26
<i>Il ruolo del calcio nell'esocitosi</i> .....	26
Endocitosi .....	28
LA MODULAZIONE SINAPTICA .....	30
Meccanismi di regolazione presinaptica.....	31
<i>Meccanismi di regolazione VDCC-indipendenti</i> .....	34
RECETTORI PRESINAPTICI DEL GABA E DEL GLUTAMMATO .....	36
Recettori metabotropici del glutammato .....	36
Recettori GABA <sub>B</sub> .....	38
SCOPO DELLA RICERCA .....	39
METODI .....	40
Preparazione di fettine di mesencefalo di ratto .....	40
Registrazioni di patch-clamp .....	41
Proprietà dei neuroni dopaminergici .....	43
Analisi dei dati.....	44
RISULTATI.....	45
Effetto dell'AP4 e del baclofen sulle eIPSCs.....	45
Effetto dell'AP4 e del baclofen sulle sIPSCs .....	48
Effetti dell'AP4 e del baclofen sulle mIPSCs .....	50
Effetti dell'AP4 e del baclofen in presenza di Ionomicina.....	56
Effetti dell'AP4 e del baclofen in presenza di Latrotossina .....	60
Il baclofen occlude l'effetto dell'AP4 sulle sIPSCs .....	64
DISCUSSIONE.....	67
Considerazioni funzionali.....	70
BIBLIOGRAFIA .....	72

# INTRODUZIONE

## ***I GANGLI DELLA BASE***

I sistemi motori deputati al controllo della postura e dei movimenti dipendono da complesse interazioni tra le cellule nella corteccia cerebrale, nel cervelletto, nei gangli della base, nel mesencefalo e nel midollo spinale, che producono segnali che convergono sui motoneuroni che controllano la contrazione dei muscoli scheletrici.

I gangli della base sono un gruppo di nuclei sottocorticali coinvolti in una varietà di processi come il movimento e le funzioni cognitive e memoniche. Uno dei maggiori compiti di queste strutture è proprio quella di integrare informazioni sensomotorie, associative e limbiche nella produzione di comportamenti dipendenti dal contesto che ci circonda (Bolam et al., 2000).

I gangli della base comprendono il nucleo caudato e il putamen, che insieme formano il complesso denominato striato, il globo pallido (esterno ed interno) e nuclei mesencefalici: la sostanza nera *pars reticulata* (SNr) e *pars compacta* (SNc) e il nucleo subtalamico (STN), (FIG 1).

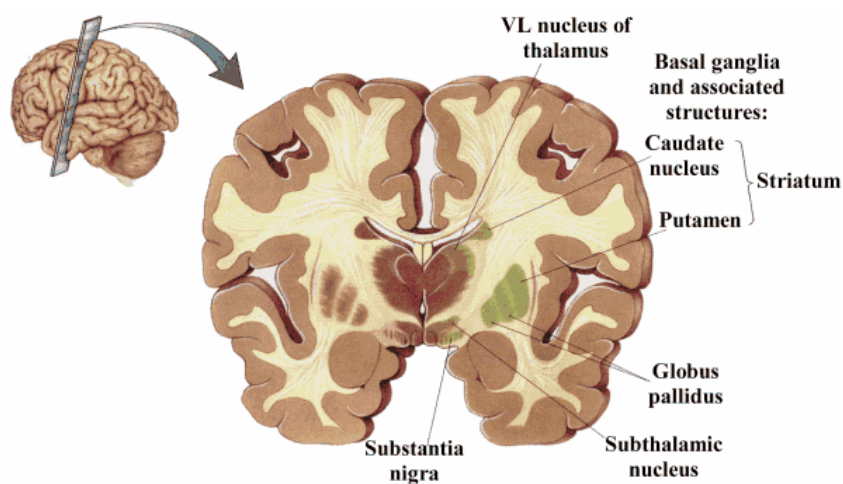


FIG 1: Gangli della base (sezione cerebrale frontale)

Questi nuclei sono ampiamente interconnessi tra loro e sono collegati ad elementi dell'apparato sensoriale, motorio, cognitivo e motivazionale dell'encefalo (Kandel et al., 2004).

Le maggiori afferenze ai gangli della base provengono dalla neocorteccia e dal talamo (principalmente dai nuclei intralaminari). Le principali efferenze dipartono dalla SNr e dal globo pallido interno (GPi) e proiettano alla corteccia prefrontale e motoria, attraverso il talamo ventrale, oltre che al collicolo superiore (SC), alla formazione reticolare (RF), al nucleo peduncolopontino (PPN) e alla abenula laterale (HBN). I neuroni dopaminergici della SNc proiettano al striato, al globo pallido esterno (GPe) e al nucleo subtalamico (STN), che modula il flusso di informazioni dalla corteccia e dal talamo attraverso i nuclei della base (Tepper et al., 2007).

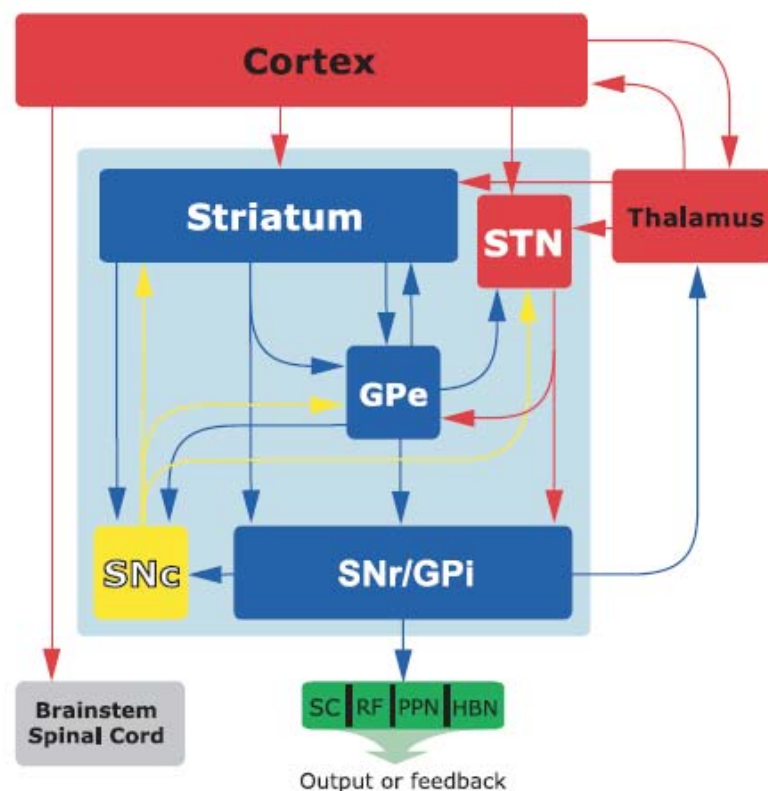


FIG 2: Diagramma semplificato dei macrocircuiti dei componenti dei gangli della base. I nuclei della base sono compresi nel quadrato in azzurro, mentre il blu delle frecce rappresenta le strutture principalmente GABAergiche, il rosso quelle principalmente glutamatergiche, il giallo è usato per le vie dopaminergiche (Tepper et al., 2007).

Negli ultimi vent'anni gli studi condotti hanno permesso di identificare due circuiti di modulazione della corteccia motoria da parte dei gangli della base

(Alexander e Crutcher, 1990; Smith et al., 1998). Nella “via diretta”, lo striato, attraverso le proiezioni al GPi e alla SNr, esercita un’azione disinibitoria sul talamo, che quindi stimola i neuroni corticali. Nella “via indiretta”, le proiezioni striatali sul GPe determinano una disinibizione dei neuroni del STN e quindi una inibizione dei neuroni del talamo attraverso il GPi e la SNr. Questa via, dunque, produce una inibizione dei neuroni motori corticali.

La via diretta dallo striato è composta da neuroni che rilasciano due neurotrasmettitori inibitori, il GABA e la sostanza P, che dunque inibiscono i neuroni del GPi e della SNr, che formano l’uscita dei nuclei della base diretta al talamo. Anche questi neuroni utilizzano il GABA come neurotrasmettitore ed esercitano una azione inibitoria sul talamo. Si ha il movimento quando i neuroni talamici vengono liberati dall’inibizione tonica esercitata dalle efferenze dei nuclei della base. Ciò si verifica quando le afferenze corticostriatali eccitano i neuroni dello striato e quindi determinano una disinibizione fasica dei neuroni talamici, a seguito dell’inibizione delle cellule inibitorie che costituiscono l’uscita dei nuclei della base (Surmeier, 2006). Nella via indiretta l’eccitazione dei neuroni di proiezione corticostriatale determina l’attivazione di vie GABAergiche ed encefalinergiche dalla striato, che inibiscono i neuroni del GPe. Questo determina una inibizione nella proiezione GABAergica inibitoria dal GPe al STN, e dunque una disinibizione dei neuroni del STN stesso; questi neuroni, a loro volta, determinano l’eccitazione, mediata dal glutammato, dei neuroni efferenti dei nuclei della base. Si produce quindi un’inibizione dei neuroni talamici e quindi una riduzione dell’eccitamento dei neuroni dell’area motrice. E’ stato suggerito che la “via indiretta” rappresenti un modo per attenuare o terminare i movimenti associati ai nuclei della base o per sopprimere sequenze di movimenti involontari (Mink e Thach, 1993).

Le proiezioni dopaminergiche provenienti dalla SNc esercitano azioni diverse sui neuroni del neostriato. La dopamina eccita i neuroni striatali GABAergici di proiezione, coinvolti nella via diretta (tramite i recettori D1), mentre inibisce i neuroni striatali GABAergici che proiettano al GPe, dando luogo alla via indiretta (tramite i recettori D2) (Kandel et al., 2004) (FIG 3).



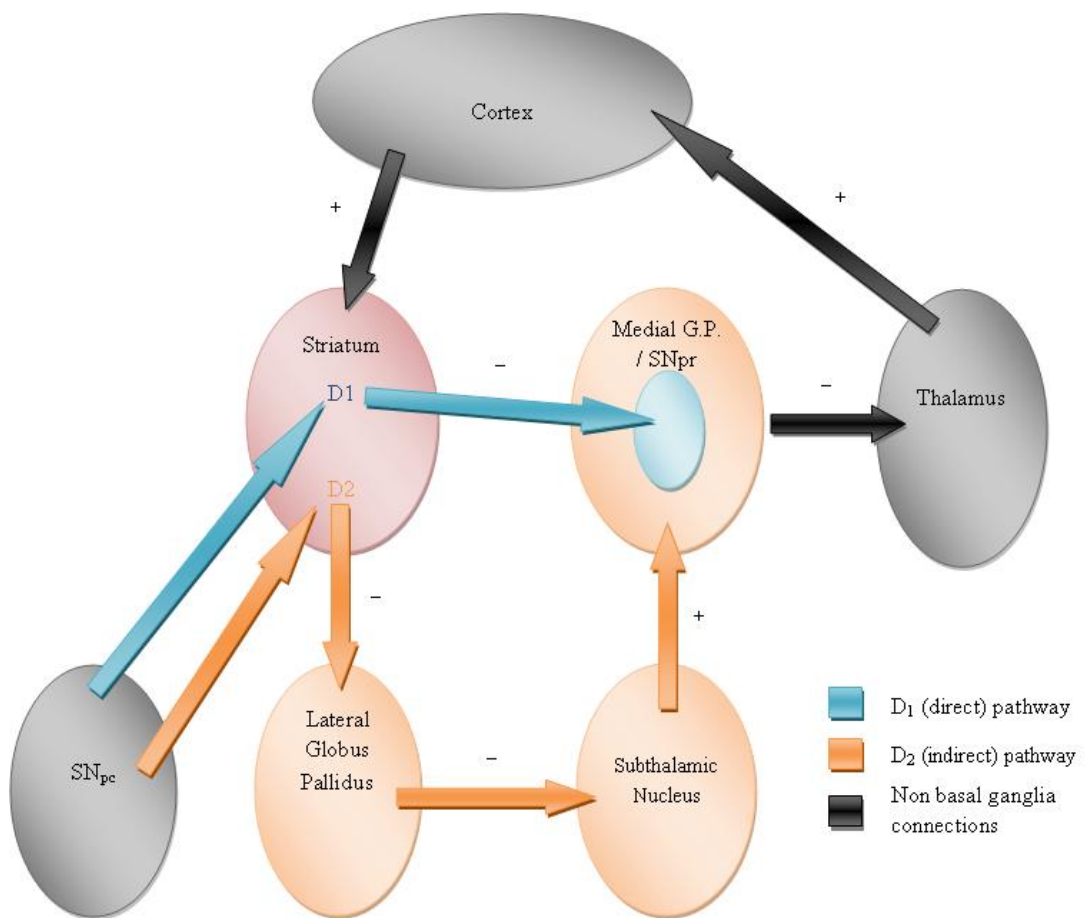


FIG 3: Schema della “via diretta” e della “via indiretta” dei gangli della base.

## LA SOSTANZA NERA E IL SISTEMA DOPAMINERGICO

Situata al livello del mesencefalo, la sostanza nera *pars compacta* (SNc), insieme all'area tegmentale ventrale (VTA), costituisce le sedi di maggiore presenza di neuroni dopaminergici dell'encefalo.

La dopamina fu riconosciuta come neurotrasmettitore negli anni '50 (Carlsson et al., 1958). La descrizione delle popolazioni neuronali contenenti dopamina fu in seguito possibile grazie all'uso della tecnica istochimica a formaldeide fluorescente di Falck (Bjorklund et al., 1968) con la quale i neuroni monoaminergici del cervello potevano essere visualizzati. Questi neuroni sono organizzati in due principali sistemi che prendono il nome dalle loro rispettive aree di proiezione (Lindvall et al., 1984). Il sistema nigrostriatale, che origina nella SNc, e proietta allo striato dorsale (nucleo caudato e putamen) e il sistema mesolimbocorticale che proietta dalla VTA alle aree limbiche dello striato ventrale (nucleus accumbens), all'amigdala e al tubercolo olfattorio, come anche alle corteccia mediale prefrontale, cingolata ed entorinale (Andén et al. 1996) (FIG 4).

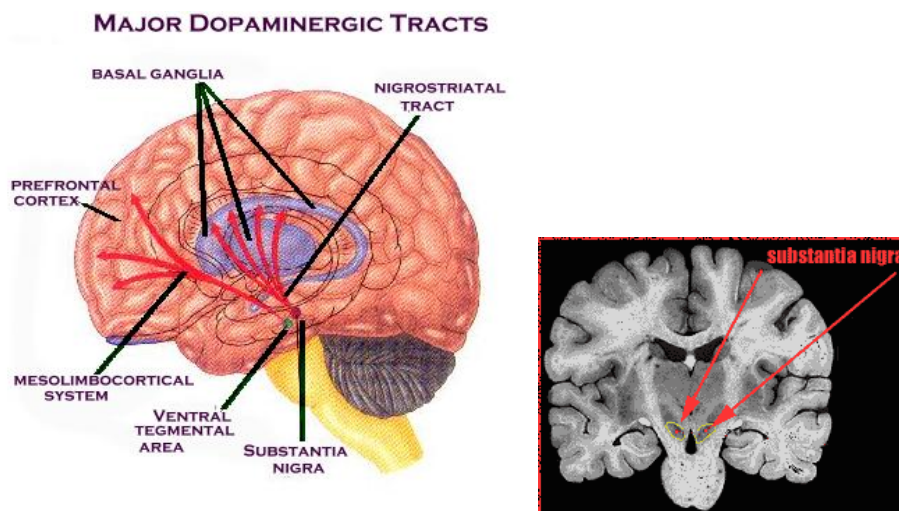


FIG 4: Localizzazione della sostanza nera e dell'area tegmentale ventrale nel mesencefalo e principali vie dopaminergiche. A sinistra SN in sezione sagittale; a destra SN in sezione frontale.

I neuroni dopaminergici della SNc sono stati caratterizzati con l'uso di metodi elettrofisiologici abbinati a tecniche immunoistochimiche sia *in vivo* che *in vitro*. I neuroni dopaminergici descritti *in vivo*, in ratti anestetizzati, da registrazioni intra- ed extracellulari, mostrano una modalità di firing irregolare e solitamente consistente in *bursts* (Bunney e Aghajanian, 1976). Invece i neuroni dopaminergici *in vitro* sono caratterizzati da una attività di firing spontanea relativamente lenta ma altamente regolare di 0.5-4 Hz. Hanno potenziali d'azione di lunga durata (>2ms) e una pronunciata *afterhyperpolarisation* (AHP) (FIG 5A). Inoltre sono caratterizzati dalla presenza di una lenta corrente inward voltaggio dipendente ( $I_h$ ) che si sviluppa in risposta ad impulsi iperpolarizzanti e dallo sviluppo di una corrente outward in risposta alla perfusione con dopamina (Bonci et al., 2003) (FIG 5B).

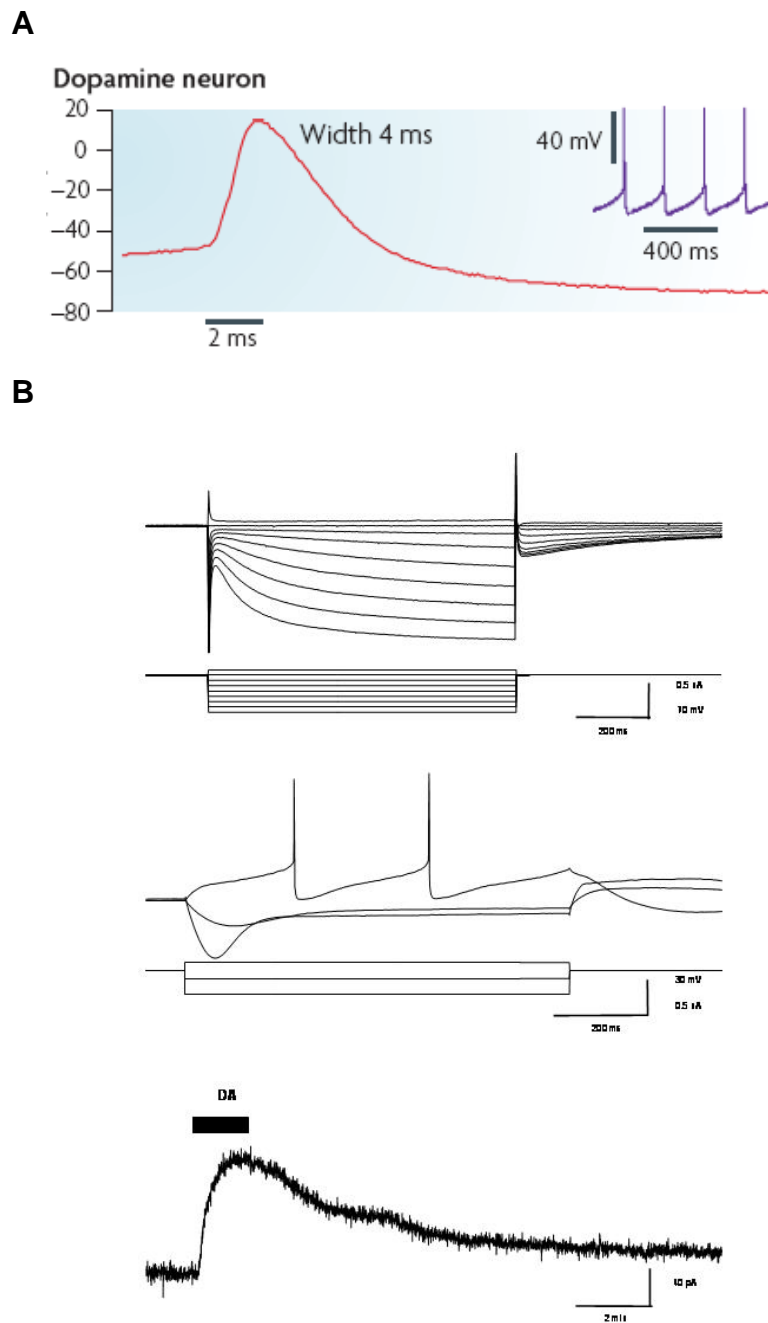


FIG 5: caratteristiche elettrofisiologiche di un neurone dopaminergico mesencefalico (Bean, 2007 ; Berretta et al., 2000).

## **Afferenze alla sostanza nera compatta**

I neuroni della SNc ricevono afferenze glutamatergiche che derivano essenzialmente dalla corteccia prefrontale, dal nucleo subtalamico (STN), dal nucleo tegmentale latero-dorsale (LDTg) e dal nucleo tegmentale peduncolo-pontino (PPN). Il rilascio di glutammato può regolare l'attività dei neuroni dopaminergici attraverso l'attivazione di recettori ionotropici di tipo NMDA o AMPA/Kainato oppure attraverso recettori metabotropici distinti in gruppo I, II e III, come descritto in seguito (Grenhoff et al., 1988; Mercuri et al., 1993).

Afferenze GABAergiche derivano, invece, principalmente dallo striato e dal globo pallido (Bolam e Smith, 1990) oltre che dagli interneuroni GABAergici della stessa SNc e SNr (Stanford e Lacey, 1996). Il rilascio di GABA attiva recettori ionotropici (GABA<sub>A</sub>), che aprono conduttanze cloro, e recettori metabotropici (GABA<sub>B</sub>) che modulano una classe di canali del potassio accoppiati alla proteina Gi/o (GIRK).

Afferenze colinergiche (i neuroni dopaminergici possiedono recettori sia nicotinici che muscarinici) derivano dal PPN, il quale proietta anche fibre glutamatergiche (Beninato e Spencer, 1987; Bolam et al., 2000).

Le afferenze serotoninergiche alla SNc derivano dal nucleo dorsale del Rafe che proietta anche alla corteccia frontale ( van Bockstaele et al., 1993) e allo striato mentre quelle noradrenergiche provengono dal locus coeruleus (Grenhoff et al., 1995).

## **LA TRASMISSIONE SINAPTICA**

Charles Sherrington introdusse il termine di sinapsi agli inizi del XX° secolo, per indicare le zone specializzate, descritte istologicamente da Ramon y Cajal, a livello delle quali le cellule nervose entrano in comunicazione le une con le altre. Questa osservazione fece nascere un acceso dibattito, intorno agli anni '30, sui meccanismi della trasmissione nervosa, sia a livello delle sinapsi neuro-muscolari che in tutto il sistema nervoso. I fisiologi capeggiati da John Eccles, sostenevano che la trasmissione sinaptica dovesse essere elettrica e che la conduzione del potenziale d'azione, dipendeva dai flussi passivi di corrente che si diffondono direttamente dal neurone presinaptico alla cellula postsinaptica. I farmacologi, alla testa dei quali stavano Otto Loewi ed Henry Dale, sostenevano invece che la trasmissione fosse dovuta ad un mediatore chimico liberato dal neurone presinaptico, che determinava la comparsa di un flusso di corrente nella cellula postsinaptica. I lavori di Paul Fatt e Bernard Katz, di Eccles e coll. e quelli di Furshpan e Potter dimostrarono che entrambe le modalità di trasmissione sono presenti nel sistema nervoso. I principali meccanismi che determinano la liberazione di neurotrasmettitori furono messi in evidenza da Katz e Miledi nei loro studi sulla sinapsi gigante del Calamaro, in quanto questa sinapsi è abbastanza grande per poter inserire due elettrodi nella terminazione presinaptica (uno di stimolazione e uno di registrazione) e un elettrodo nella cellula post sinaptica per registrare il potenziale sinaptico come indice di liberazione del neurotrasmettitore. Questi autori osservarono che quando i canali del sodio e del potassio venivano bloccati dal TTX e dal TEA, restava ancora una corrente trasportata dagli ioni calcio. In queste condizioni l'ingresso dei  $Ca^{2+}$  era ancora in grado di produrre un potenziale d'azione rigenerativo nelle terminazioni. Queste osservazioni suggerirono a Katz e a Miledi l'ipotesi che la depolarizzazione indotta dal potenziale d'azione nella terminazione nervosa apra canali voltaggio-dipendenti per i  $Ca^{2+}$  in modo che questo catione, seguendo il proprio gradiente di concentrazione, entri nella cellula, promuovendo la liberazione dei neurotrasmettitori. La liberazione dei neurotrasmettitori avviene in forma quantale. Ogni pacchetto o *quanto* di neurotrasmettitore determina la comparsa di un potenziale post sinaptico di ampiezza costante. Paul Fatt e Katz scoprirono la natura quantale

della trasmissione registrando da sinapsi neuromuscolari di rana senza stimolare la terminazione presinaptica. In queste condizioni gli autori, osservarono la presenza, nei tracciati, di piccole oscillazioni spontanee dell'ampiezza di circa 0.5-1 mV; risultati analoghi sono stati ottenuti in seguito anche nei muscoli di mammifero e nel sistema nervoso centrale. Fatt e Katz chiamarono questi piccoli potenziali spontanei potenziali di placca in miniatura, in quanto i potenziali delle sinapsi neuromuscolari dei vertebrati sono detti potenziali di placca. Le giunzioni neuromuscolari della rana utilizzano l'acetilcolina come neurotrasmettitore e i potenziali di placca in miniatura, come i potenziali di placca normali, vengono esaltati e prolungati dalla prostigmina, che inibisce l'idrolisi dell'Ach da parte dell'acetilcolinesterasi. In assenza di stimolazione, i potenziali di placca in miniatura si presentano ad intervalli casuali e la loro frequenza può essere aumentata depolarizzando la terminazione presinaptica. Katz e Miledi determinarono in seguito l'entità della conduttanza ionica elementare, dovuta cioè all'apertura di un solo canale sinaptico, in seguito all'interazione dell'Ach con un singolo recettore. Questi AA. stimarono, mediante una serie di analisi del rumore, che il potenziale elementare prodotto dall'apertura di un singolo complesso canale-recettore per l'Ach sia ampio all'incirca 0.3  $\mu$ V e cioè abbia all'incirca un'ampiezza pari a 1/2000 di quella di un potenziale spontaneo in miniatura. Di conseguenza, ogni potenziale sinaptico in miniatura è determinato non da una singola molecola di acetilcolina ma da un pacchetto contenente un elevatissimo numero di molecole di questo neurotrasmettitore. Ulteriori studi di Del Castillo e Katz sul ruolo del calcio nella trasmissione sinaptica, hanno permesso di affermare che le variazioni della concentrazione di questo ione non hanno effetto sulle dimensioni del quanto ma piuttosto sulla probabilità che questo venga rilasciato. Inoltre la probabilità di liberazione di un quanto in un terminale in una condizione di riposo è molto bassa. Gli ioni calcio che entrano nella terminazione nel corso di un potenziale d'azione aumentano transitoriamente la probabilità di liberazione di un quanto di circa 100.000 volte. Perciò i neurotrasmettitori vengono liberati sotto forma di quanti ciascuno dei quali produce una risposta di ampiezza pressoché costante. Ogni potenziale sinaptico è determinato dalla liberazione da un certo numero di quanti di neurotrasmettitore e la sua ampiezza è pari all'ampiezza della risposta

unitaria moltiplicata per il numero dei quanti di neurotrasmettitore che sono stati liberati. Nel lavoro di Boyd e Martin del 1956, è stata misurata l'ampiezza di tutti i potenziali ottenuti dalle registrazioni dal muscolo di gatto, evocati a seguito di stimolazione del nervo motorio. Questi AA hanno contato tutti i potenziali della stessa ampiezza e il loro numero è stato riportato nell'istogramma riportato in FIG 6 (Boyd e Martin, 1956). La distribuzione delle risposte mette in evidenza un certo numero di picchi. Il primo picco a 0 mV, rappresenta il numero delle mancate risposte. Il primo picco di risposte, in corrispondenza di 0.4 mV, rappresenta il numero di potenziali unitari, o delle più piccole risposte evocabili. Le risposte unitarie hanno la medesima ampiezza dei potenziali spontanei in miniatura. I picchi successivi sono in corrispondenza di ampiezze che sono multipli interi dell'ampiezza dei potenziali unitari. La linea continua mostra la distribuzione teorica interpolata sui dati degli istogrammi. Ogni picco si espande in distribuzioni gaussiane che sono l'espressione del fatto che le quantità di neurotrasmettitore liberate in ogni quanto variano leggermente in maniera casuale. La distribuzione delle ampiezze dei potenziali spontanei in miniatura, illustrata nell'insero della FIG 6, è in ottimo accordo con la curva gaussiana teorica (linea continua).

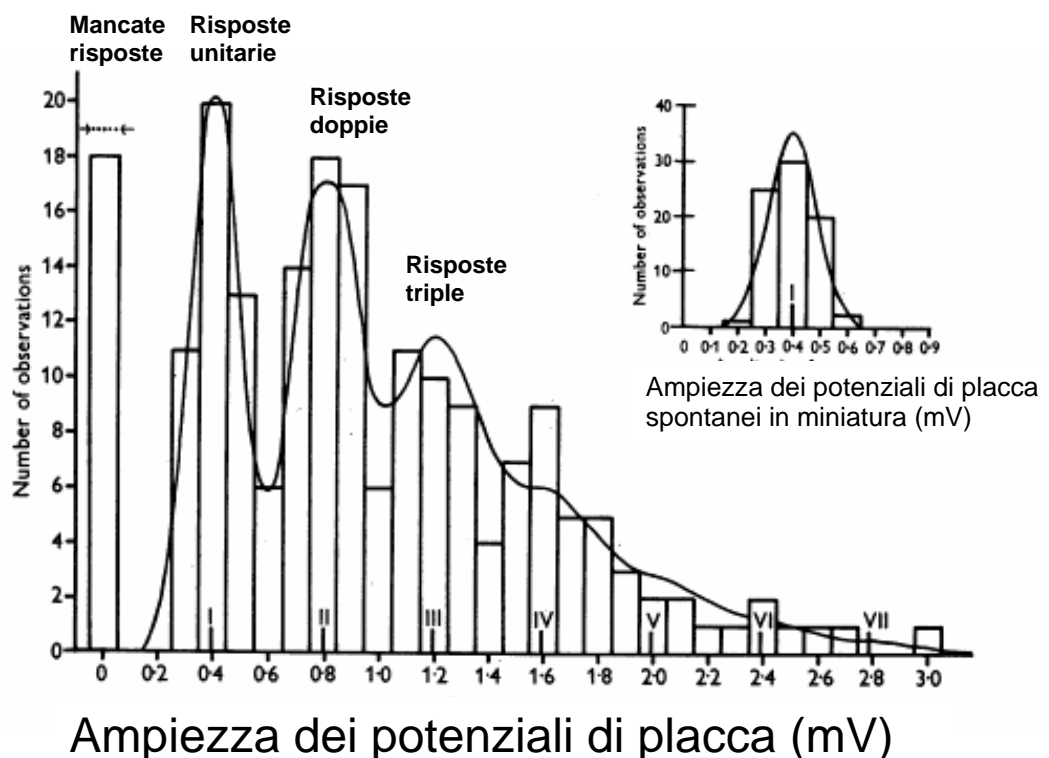


FIG 6



## ***L'organizzazione del terminale presinaptico***

Il legame tra evento bioelettrico (mEPSC) e l'esistenza di vescicole sinaptiche è stato oggetto di intense controversie. L'ipotesi vescicolare del rilascio quantale di neurotrasmettitore nasce agli inizi degli anni '50 con l'introduzione di due tecniche sperimentali. La prima, prevedeva l'uso di micropipette in grado di registrare potenziali elettrici intracellulari ed extracellulari. Questo permise di dimostrare che, nella giunzione neuromuscolare di rana, "pacchetti" di acetilcolina erano rilasciati spontaneamente da regioni altamente specializzate delle terminazioni nervose. Oltre a ciò, furono perfezionate le tecniche che permettevano di preparare sezioni cellulari così sottili da permettere lo studio dell'ultrastruttura delle sinapsi al microscopio elettronico (Ceccarelli e Hurlbut, 1980). Nel 1956 del Castillo e Katz proposero che i quanta di Ach fossero immagazzinati in vescicole sinaptiche, e rilasciati direttamente dalle vescicole nello spazio intrasinaptico, grazie alla fusione di quest'ultime con la membrana cellulare del terminale sinaptico.

Il rilascio di neurotrasmettitore è mediato dall'esocitosi delle vescicole sinaptiche nella zona attiva presinaptica del terminale nervoso. Per sostenere rapidi e ripetuti cicli di rilascio, le vescicole sono sottoposte a dei meccanismi che regolano una corretta trasmissione sinaptica. Innanzitutto, il neurotrasmettitore è attivamente trasportato nelle vescicole sinaptiche, che si raggruppano nella zona attiva (*docking*). Successivamente le vescicole acquisiscono l'abilità di fusione (*priming*) e diventano così competenti per il rilascio di neurotrasmettitore guidato dall'entrata di calcio nel terminale. Dopo la fusione con la membrana cellulare e il susseguente rilascio di neurotrasmettitore, le vescicole vanno incontro al processo di endocitosi e al successivo ricircolo (*trafficking cycle*) (Sudhof, 2004; FIG 7)

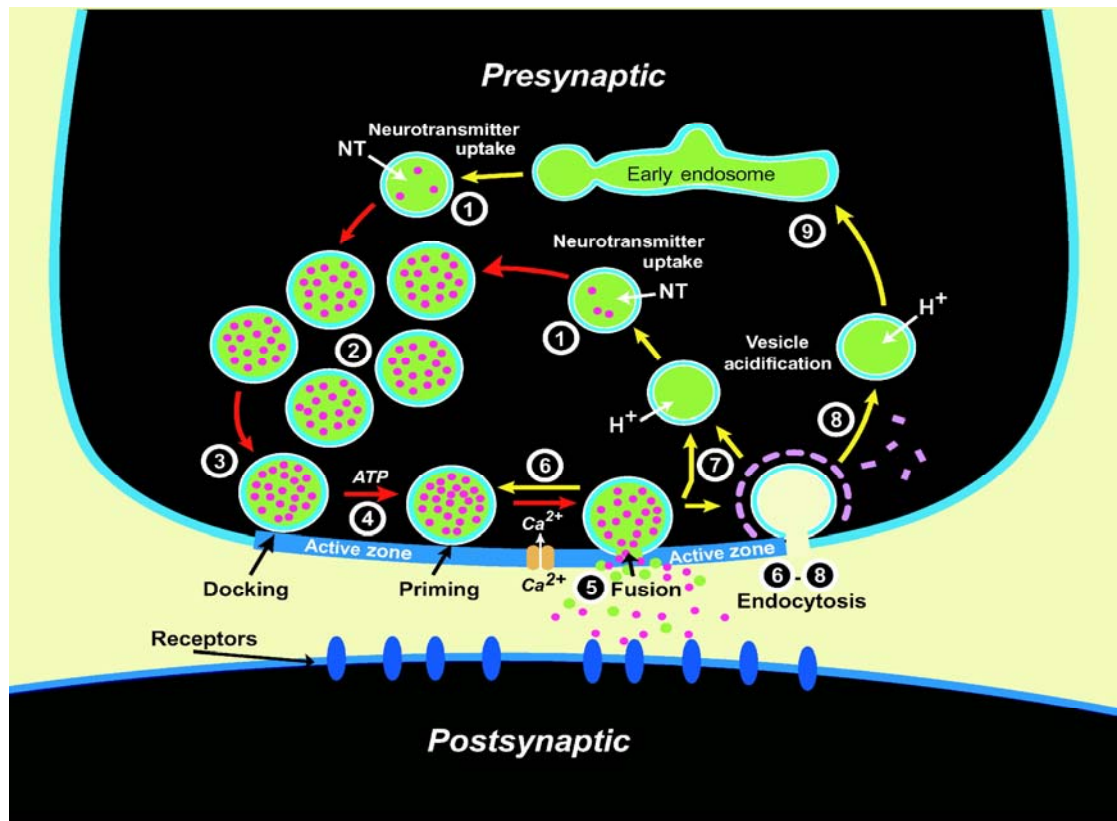


FIG 7: schema riassuntivo del *trafficking cycle*.

Un tipico bottone presinaptico è una porzione altamente specializzata dell'assone, caratterizzata da una zona attiva, ricca di vescicole di neurotrasmettitore, dove la membrana presinaptica entra in stretto contatto con la membrana postsinaptica (Murthy and De Camilli, 2003.). L'esocitosi delle vescicole avviene nella zona attiva, mentre il susseguente recupero dei componenti vescicolari può avvenire sia a livello della zona attiva sia di quella peri-attiva (Roos and Kelly, 1999). Almeno una frazione di questo uptake endocitotico è costituito da vescicole che maturano direttamente in nuove vescicole sinaptiche. La maturazione delle vescicole necessita di alcune tappe fondamentali come l'acidificazione del lume, il riempimento da parte di neurotrasmettitore, l'associazione con le proteine di membrana necessarie per l'esocitosi e il raggruppamento con le altre vescicole. Tale raggruppamento avviene in un'area ricca di actina ed è generalmente localizzato in prossimità di mitocondri che provvedono all'energia necessaria per il ciclo vescicolare. Inoltre le sinapsi sono tipicamente circondate da cellule gliali, che giocano un ruolo ausiliario nella secrezione di sostanze neuromodulatrici, nella regolazione

della concentrazione degli ioni extracellulari e nell'uptake dei neurotrasmettitori (Haydon, 2001).

Recentemente la struttura della zona attiva è stata esaminata in dettaglio con l'uso della *electron microscopy tomography* nella giunzione neuromuscolare della rana (Harlow et al., 2001.) e le caratteristiche organizzative riscontrate vengono ritrovate anche nelle sinapsi del sistema nervoso centrale (Dresbach et al., 2001.). Nel corso degli anni, sono state identificate e caratterizzate un notevole numero di proteine coinvolte nel rilascio sinaptico. Tali proteine vengono definite "cytomatrix assembled at active zone" o CAZ (Garner et al., 2000).

Importanti classi dei componenti proteici della zona attiva comprendono *rab3-interacting molecule* o RIM (Wang et al., 1997.), *piccolo/aczonin* (Fenster et al., 2000, Wang et al., 1999.), e la famiglia di proteine *bassoon* (tom Dieck et al., 1998.). *Piccolo* e *bassoon* sono due proteine ad alto peso molecolare impegnate nell'interazione proteina-proteina così anche come nel *signalling*. Rab3 è una piccola GTPasi presente nelle vescicole sinaptiche. RIM, come *piccolo*, ha molteplici domini C2 che provvedono alla diretta interazione con le proteine di membrana (Wang et al., 1997.). L'interazione GTP-dipendente di RIM con rab3 fa di RIM uno dei più importanti mediatori dell'ancoraggio delle vescicole sinaptiche ai siti di rilascio (Schoch et al., 2002.). Le vescicole sinaptiche, che si trovano nel pool di riserva, sono ancorate a dei microfilamenti per mezzo di proteine della famiglia delle *sinapsine*. La fosforilazione di quest'ultime mediata da CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II) regola questa stretta interazione. Il *docking* e la fusione delle vescicole sinaptiche, dal pool di riserva alla zona attiva, è mediata, tra i vari fattori, dai componenti del complesso SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors o recettori SNAP) e dalla *sinaptotagmina*, proteina-sensore dello ione Ca<sup>2+</sup> (Garcia et al., 1995) (FIG 8).

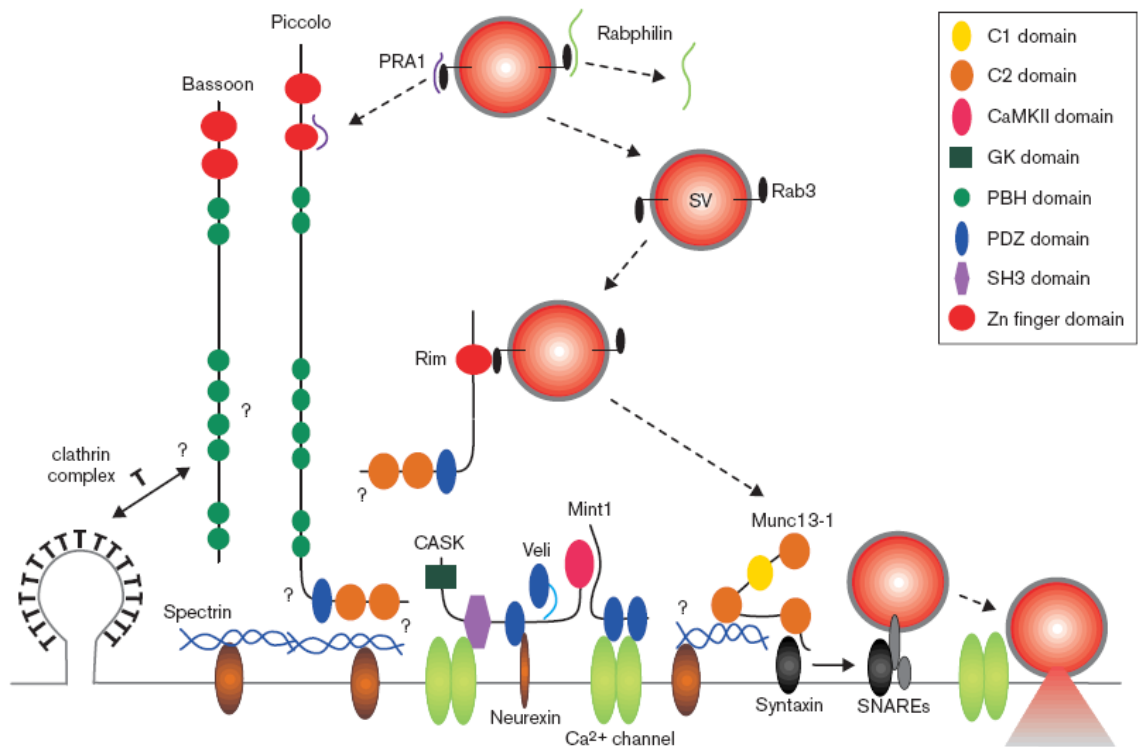


FIG 8: Modello molecolare e interazioni delle proteine CAZ (Garner et al., 2000).

Oltre alle molecole di adesione e a quelle attivamente coinvolte nel ciclo vescicolare appena descritte, la membrana della zona attiva comprende i canali del calcio voltaggio dipendenti (VDCC) (Robitaille et al., 1993.).L'entrata di calcio nel terminale presinaptico attraverso canali voltaggio-dipendenti è un passo essenziale nella cascata di eventi che portano al rilascio di neurotrasmettitore (Wheeler et al., 1994). Di conseguenza la modulazione dei canali del calcio da parte di messaggeri intracellulari è un meccanismo cellulare fondamentale per la regolazione della trasmissione sinaptica (Jarvis and Zamponi, 2001). Il sistema nervoso esprime una molteplicità di canali del calcio voltaggio dipendenti (N-, P/Q-, R-, L- and T-types) che hanno funzioni cellulari specializzate e una diversa distribuzione subcellulare (Catterall, 2000). Studi farmacologici e caratterizzazioni immunocitochimiche suggeriscono che gli N-type e i P/Q-type sono le specie predominanti coinvolte nella trasmissione sinaptica (FIG 9). Data la notevole capacità di buffering dei neuroni, si pensa che gli ioni calcio liberi diffondano solo per brevi distanze prima di essere catturati dalle proteine binding (Augustine, 2001). Questo comporta una rapida salita della concentrazione intracellulare di calcio dal poro

di entrata del canale attraverso il citoplasma. Inoltre i probabili sensori del calcio, come la *sinaptotagmina*, hanno una bassa affinità per questo ione. Perciò per percepire l'entrata di calcio, la machinery di rilascio sinaptico deve essere localizzata in stretta vicinanza ai VDCC. Infatti questi canali del calcio presinaptici mostrano una distribuzione subcellulare ristretta alla zona attiva e co-localizzano con la machinery del rilascio vescicolare (Westenbroek et al, 1998).

Evidenze biochimiche hanno dimostrato che le proteine chiave coinvolte nell'ancoraggio delle vescicole sinaptiche alla zona attiva (syntaxin1, SNAP25 e synaptotagmin 1) si legano a  $\approx 225$  aminoacidi del dominio II-III della subunità  $\alpha_1$  dei canali N-type e P/Q-type. Questo sito di legame viene detto "synprint" (Bennett et al., 1992; Sheng et al., 1997; Zamponi., 2003) (FIG.9). Mochida et al.(1996) furono i primi ad esaminare il significato funzionale del legame tra le vescicole sinaptiche e tale regione nel ganglio cervicale superiore (SCG). Studi successivi evidenziano il fatto che la regione synprint potrebbe non servire principalmente a colocalizzare vescicole sinaptiche alla fonte di entrata di calcio, quanto piuttosto potrebbe fungere da sito di modulazione sinaptica permettendo una precisa regolazione dell'attività dei canali del calcio durante il processo di rilascio vescicolare (Spafford and Zamponi, 2003).

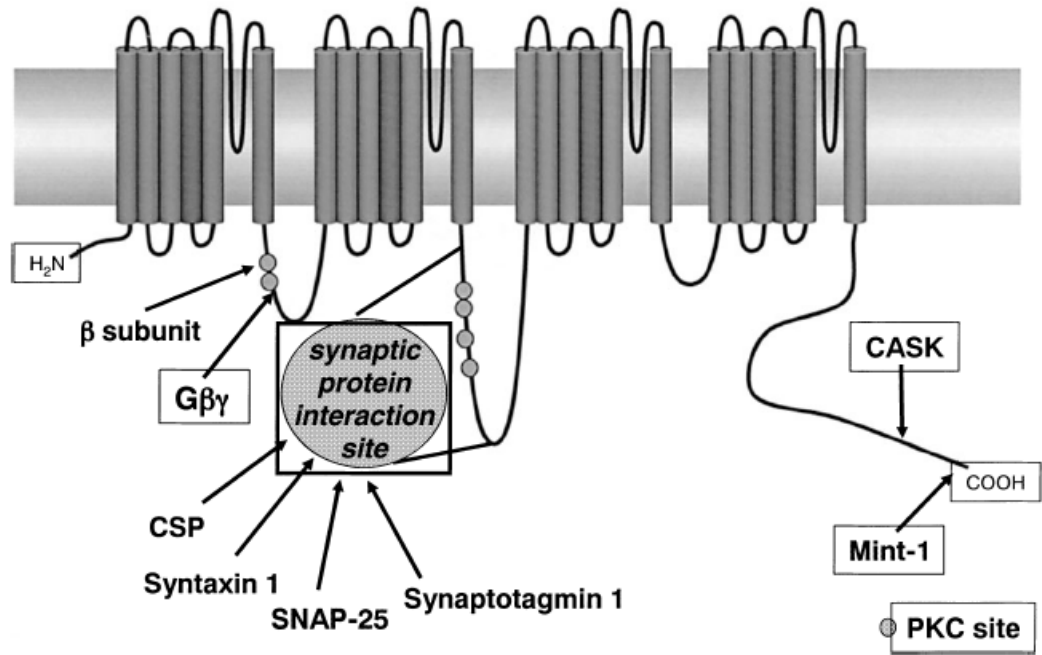


FIG.9: Topologia transmembrana del canale del calcio di tipo N. La figura mostra i principali siti di legame con le proteine. Oltre alla regione synprint, che lega CSP, la sintassina, SNAP-25 e la sinaptotagmina, è indicata la regione C-terminale che interagisce con Mint-1 e CASK, altre proteine della famiglia CAZ. Sono inoltre indicati i siti di fosforilazione che regolano l'attività di canale o l'abilità di regolare proteine che interagiscono col canale (Zamponi., 2003).

## **Esocitosi**

### **Le proteine SNAREs**

Un potenziale d'azione produce per via elettrotonica una depolarizzazione sufficiente per attivare i canali ionici voltaggio dipendenti del  $Ca^{2+}$ . L'ingresso di calcio nella terminazione che ne deriva stimola il processo di *esocitosi*, che porta alla liberazione del neurotrasmettitore dalla membrana sinaptica. Il meccanismo di esocitosi è stato per molti anni soggetto di intense ricerche. È ormai ben stabilito che un'efficiente fusione di membrana *in vivo* richiede l'interazione di piccole proteine chiamate SNAREs (Sollner et al., 1993). Per l'esocitosi di vescicole sinaptiche le SNAREs di fondamentale importanza sono le *sinaptobrevine/VAMP* 1 e 2, la *sintassina* 1 e SNAP-25. Le *sinaptobrevine/VAMPs* sono localizzate principalmente nella vescicola sinaptica, mentre la sintassina e SNAP-25 si trovano sulla membrana plasmatica. La fusione è guidata da un progressivo *zippering* tra le vescicole e le SNAREs di membrana a formare *four helix bundle* (Sutton et al., 1998). Probabilmente SNAREs rappresentano solo la minima parte delle proteine che fanno parte della machinery del rilascio sinaptico (Weber et al., 1998). Una volta assemblato, il complesso proteico SNAREs viene disassemblato da NSF, che funziona con l'ausilio di proteine SNAP (Hanson et al., 1997). L'ipotesi della fusione di membrana mediata da SNAREs fu formulata basandosi su studi di fusione membranale *in vitro* (Sollner et al., 1993) e supportata dai risultati ottenuti da studi genetici sul lievito (Schekman, 2002). Inoltre una conferma a questa ipotesi viene dall'identificazione della *synaptobrevin/VAMP*, della *syntaxin* e di SNAP-25 come i possibili bersagli dell'azione proteolitica delle neurotossine clostridiali, che sono potenti bloccanti del rilascio di neurotrasmettitori. Ognuna di queste tossine agisce selettivamente su una delle proteine SNAREs tagliandola in un sito specifico (Blasi et al., 1993). Per esempio, tetanus toxin e botulinum toxins B, D, F e G scindono la *sinaptobrevina*, mentre botulinum toxins A ed E attaccano selettivamente SNAP-25; infine la botulinum toxin C interagisce con la *syntaxin* (Hayashi et al., 1994) (FIG 10). Al contrario, l' $\alpha$ -latrotossina, estratta dal veleno del ragno del genere *Latrodectus*, causa un massiccio rilascio di neurotrasmettitore attraverso una serie di complicati meccanismi che

coinvolgono l'attivazione di recettori presinaptici o l'inserzione della tossina stessa nella membrana cellulare portando alla formazione di pori transmembranali. Questo peptide promuove il rilascio di vescicole di neurotrasmettitore indipendentemente dall'entrata di calcio ed interagisce direttamente con la machinery di rilascio sinaptico (Capogna et al., 1996; Volynski et al.,2003).



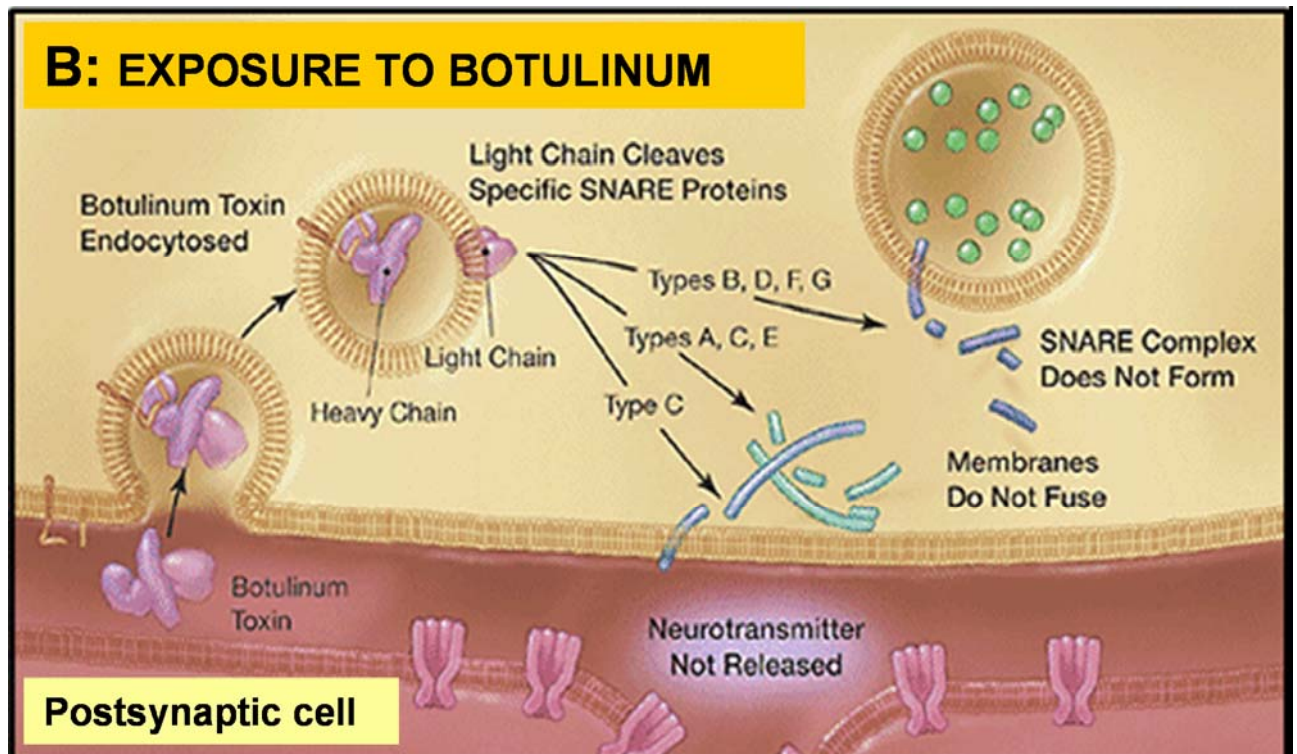
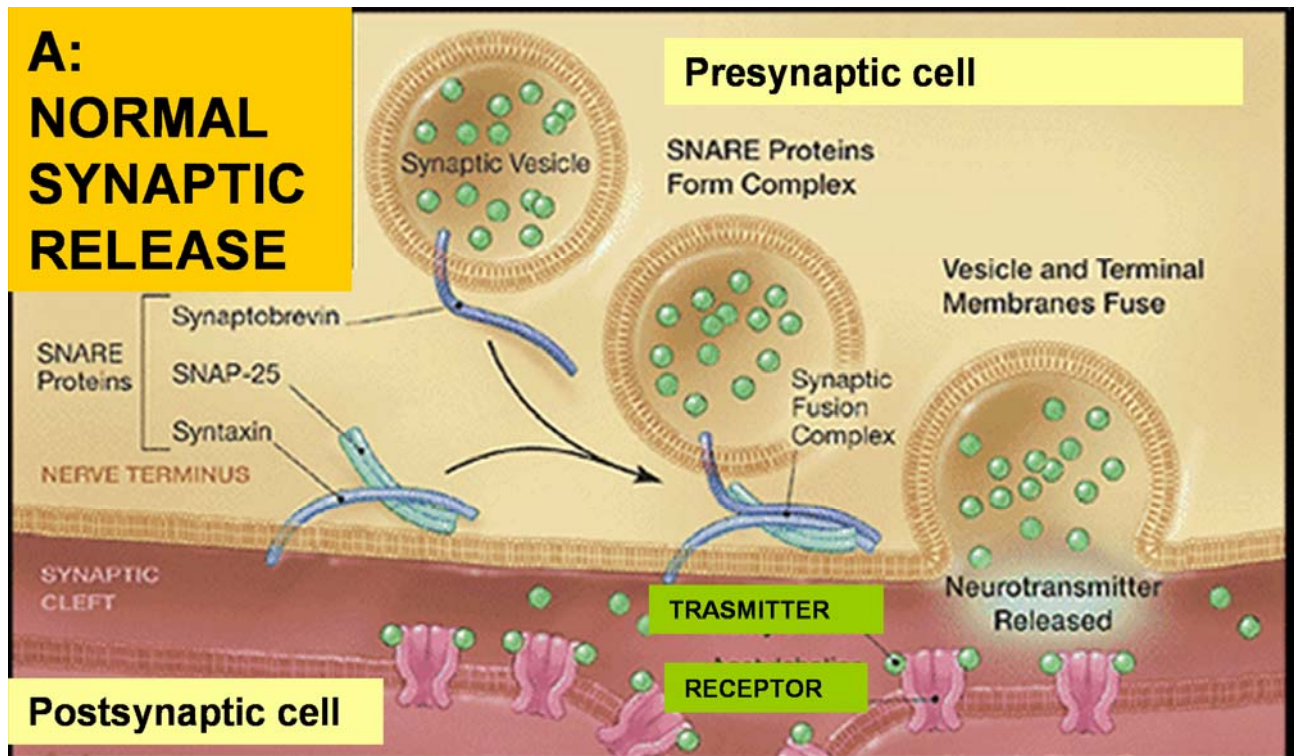


FIG 10: A- formazione del complesso SNARE nella condizione fisiologica di rilascio di neurotrasmettitore. B- Interazione delle tossine del botulinum con le proteine SNARE e la mancata trasmissione sinaptica

## ***Il priming delle vescicole***

L'acquisizione dell'abilità di fusione, che richiede molteplici passaggi e coinvolge cambiamenti conformazionali di proteine e lipidi di membrana, viene definita *priming*. Munc-13, un recettore presinaptico con un forbolo estere nel sito di legame la cui attivazione potenzia il rilascio di neurotrasmettitore, gioca un ruolo centrale nelle reazioni di *priming* (Augustin et al., 1999). Inizialmente identificato in *C. elegans*, la sua funzione si è mantenuta altamente conservata anche nei mammiferi (Richmond et al., 2001). L'interazione di Munc-13 con la proteina RIM della zona attiva è critica per il *priming*, inoltre la delezione di un'isoforma di RIM nei topi causa un'alterazione nell'efficacia del rilascio sinaptico senza una significativa alterazione del numero di vescicole *docked* (Schoch et al., 2002), identificando RIM stesso come una proteina cruciale nel *priming*.

## ***Il ruolo del calcio nell'esocitosi***

I lavori pionieristici sulla sinapsi gigante del calamaro hanno dimostrato come l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, in seguito all'arrivo di un potenziale d'azione, porta al rilascio di vescicole sinaptiche (Llinas et al., 1981; Augustine et al., 1985). Lo studio della trasmissione chimica a livello del sistema nervoso centrale comporta molte più difficoltà a causa delle ridotte dimensioni delle sinapsi. Tuttavia molte di queste difficoltà sono state superate utilizzando due regioni dotate di sinapsi giganti: il *calice di Held* nei nuclei uditivi del tronco encefalico (Borst et al., 1995) e le *mossy fiber* della regione CA3 dell'ippocampo (*Cornu Ammonis*) (Geiger and Jonas, 2000). In queste strutture è possibile effettuare registrazioni simultanee dal sito presinaptico e da quello postsinaptico. Gli ioni calcio innescano il processo che porta alla liberazione di neurotrasmettitore e l'efficacia del rilascio dipende dalla concentrazione di  $Ca^{2+}$  nella zona attiva, dalla distanza tra i VDCC e le proteine-sensore del  $Ca^{2+}$  e dalle proprietà dei buffers endogeni di calcio (ECB, endogenous buffer calcium). Gli ECB come la *parvalbumina*, la *calretinina* e la *calbindina* sono ampiamente espressi in molti neuroni del sistema nervoso

centrale e potrebbero avere un forte peso nella probabilità di rilascio sinaptico e nella modificazione dell'efficacia sinaptica a breve termine (Neher, 1998). La calcio-dipendenza dell'esocitosi riflette la sinergistica azione di molteplici proteine-sensore del  $\text{Ca}^{2+}$ , tra le quali alcune isoforme della *sinaptotagmina* che hanno un ruolo fondamentale nel processo esocitotico (Chapman, 2002). La *sinaptotagmina 1* è selettivamente presente nelle vescicole sinaptiche e la sua assenza causa una drammatica perdita di sincronia tra il rilascio e l'entrata di calcio. Studi suggeriscono che il legame con gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  porta all'interazione di uno o entrambi i domini C2 (calcio e fosfolipidi binding domain) con i lipidi e le proteine di membrana, aiutando così la fusione mediata da SNAREs (Fernandez-Chacon et al., 2002).

Un'altra proteina la cui assenza determina un fenotipo simile alla delezione della *sinaptotagmina* è la *complessina*. Le *complessine* (anche chiamate *sinafine*) sono proteine citoplasmatiche che si legano al complesso SNARE, e topi che mancano di queste proteine presentano un severo deficit di rilascio calcio-dipendente di neurotrasmettitore (Reim et al., 2001).

L'entrata di calcio dai canali di membrana dà vita ad una distribuzione non uniforme di questi ioni con una concentrazione molta più alta in prossimità dei canali stessi (Matthews, 1996). Dato che il calcio entra attraverso il poro del canale più velocemente di quanto possa diffondere nel citoplasma, si viene a creare un "microdominio" ad alta concentrazione proprio vicino ai canali aperti (Fogelson and Zucker, 1985; Smith and Augustine, 1988). A causa delle loro piccole dimensioni i microdomini di calcio non sono rilevabili con le convenzionali tecniche di calcium imaging. Tuttavia Llinàs et al (1992) furono in grado di visualizzare direttamente i microdomini iniettando nel terminale presinaptico della sinapsi gigante del calamaro la *n-aequorin-J*. Durante un potenziale d'azione presinaptico osservarono flash di luce localizzati nella zona attiva. Dato che la *n-aequorin-J* produce lampi di luce solo ad alte concentrazioni di calcio, i flash corrispondevano alle regioni in cui il potenziale d'azione aumentava la concentrazione intracellulare di calcio a livelli superiori a  $100\mu\text{M}$ . Una conseguenza di questi gradienti di concentrazione di calcio è che diverse vescicole potrebbero avere una differente probabilità di rilascio (Lisman et al., 2007). Un recente studio dimostra che la dimensione dei microdomini è regolata con lo sviluppo dell'animale. Nelle sinapsi del Calice

di Held di animali maturi l'effetto dei buffers di calcio sul rilascio diminuisce, indicando una necessità di più stretta relazione spaziale tra i VDCC e il sito di rilascio vescicolare (Fedchyshyn and Wang, 2005). L'importanza dei microdomini è data dal fatto che l'apertura dei canali del calcio porta ad un rapido ( $\approx 50 \mu\text{s}$ ) innalzamento della concentrazione di calcio, dopo la chiusura dei canali la diffusione al di fuori del microdominio rapidamente riduce il segnale dato dal calcio, di conseguenza permette di evitare che ci sia un'ulteriore attivazione delle proteine sensore del  $\text{Ca}^{2+}$ . Inoltre il fatto che le proteine sensore non siano completamente saturate dagli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  fa sì che il rilascio quantale sia altamente sensibile alla concentrazione di calcio. Questi meccanismi hanno importanti conseguenze per la modulazione della trasmissione sinaptica (Burnashev and Rozov, 2005).

## ***Endocitosi***

Il concetto di endocitosi è stato ampiamente studiato sin dagli inizi degli anni '70 (Holtzman et al., 1971; Ceccarelli et al., 1973). Gli studi di Heuser e Reese (1973) portarono alla formulazione del modello classico di endocitosi che comprende la formazione di endosomi rivestiti da molecole di *clatrina*. Oltre alla *clatrina* un'altra molecola coinvolta nel processo di endocitosi è la *dinamina* o *defosfina*, una GTP-binding protein. L'attività GTPasica della *dinamina* è aumentata dalla fosforilazione, mentre l'entrata di calcio nel terminale presinaptico defosforila questa proteina portandola ad una ridotta attività e ad un rallentamento del processo endocitotico (Robinson et al., 1994). Esistono tuttavia modelli addizionali di endocitosi. Nel modello "kiss and run" le vescicole rilasciano neurotrasmettitore attraverso un poro di fusione transiente (Fesce et al., 1994). Dopo la secrezione, le vescicole "svuotate" vengono recuperate intatte dalla membrana, riempite con nuovo neurotrasmettitore e rese immediatamente disponibili per il pool di vescicole destinate alla fusione. Questa rapida endocitosi sembra essere *clatrina* indipendente ed è stata studiata in molte cellule secretorie compresi i neuroni. (Palfrey and Artalejo, 1998) (FIG 11).

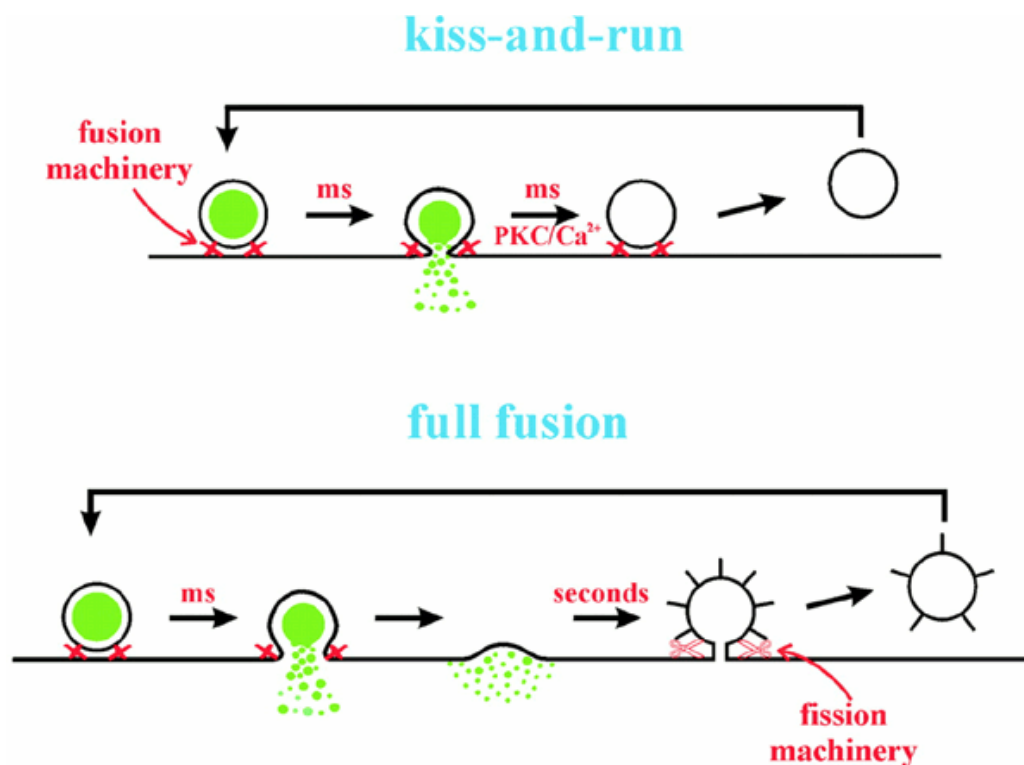


FIG 11: Due modelli di eso-endocitosi, che enfatizzano la differenza molecolare e temporale dei meccanismi alla base della classica teoria endocitotica di “full fusion” e quella del “kiss and run” (Burgoyne and de Toledo, 2000).

I meccanismi base della mobilitazione di vescicole, del “docking” nella zona attiva, del priming, dell’esocitosi e infine dell’endocitosi coinvolgono un set di proteine chiave, regolate tuttavia da una complessa lista di proteine accessori comprendenti anche chinasi e fosfatasi. Le modificazione a breve e a lungo termine che portano a cambiamenti dell’efficacia sinaptica si sono focalizzate a lungo sulle strutture postsinaptiche. E’ tuttavia oggi ben accertato che la regolazione delle strutture presinaptiche contribuiscono alla plasticità delle reti neuronali

## **LA MODULAZIONE SINAPTICA**

Il rilascio di neurotrasmettitore dal terminale presinaptico è regolato e modulato da un'ampia varietà di meccanismi. Questa modulazione è importante per numerose funzioni del sistema nervoso come i riflessi spinali, il "gating" delle informazioni sensoriali, l'apprendimento e la memoria. Inoltre questi meccanismi modulatori possono rappresentare possibili target di malattie ereditarie o acquisite, compresa la dipendenza da farmaci.

Uno dei primi esempi di modulazione sinaptica ad essere stata studiata è stata l'inibizione presinaptica del rilascio di neurotrasmettitore dai motoneuroni di crostaceo (Dudel and Kuffler, 1961) e dai neuroni sensoriali di midollo spinale murino (Eccles et al., 1963). In entrambi i lavori fu proposto che l'inibizione presinaptica fosse causata dall'attivazione da parte del GABA dei canali del cloro localizzati nel terminale presinaptico. In seguito questa ipotesi fu confermata in molti lavori sul sistema nervoso di vertebrati e di invertebrati. Negli anni seguenti divenne chiaro che l'inibizione presinaptica fosse mediata anche da recettori metabotropici coinvolgendo proteine G e cascate di secondi messaggeri (Kandel and Schwartz, 1982; Hille, 1994). L'attivazione di questi recettori può modificare la probabilità di rilascio sinaptico controllando la quantità di calcio che entra nella cellula durante un potenziale d'azione oppure in maniera indipendente dall'afflusso di calcio, modificando direttamente la machinery di rilascio vescicolare (Man-Son-Hing et al., 1989, Dale and Kandel, 1990).

Si possono distinguere due tipologie di modulazione presinaptica. Si parla di modulazione omosinaptica quando il trasmettitore è rilasciato dallo stesso terminale presinaptico in cui è localizzato il recettore. Il recettore presinaptico funziona dunque come un autorecettore per il neurotrasmettitore che viene rilasciato dal terminale e che attiva anche dei recettori postsinaptici (MacDermott et al., 1999). Ad esempio l'acetilcolina rilasciata nelle giunzioni neuromuscolari può attivare sia i recettori nicotinici della membrana postsinaptica sia dei recettori presinaptici che alterano il rilascio legato a successivi impulsi che giungono sul terminale presinaptico. Il recettore presinaptico potrebbe però anche servire come autorecettore per un cotrasmettitore rilasciato insieme al trasmettitore principale. Ad esempio,

l'attivazione dei recettori presinaptici purinergici nella giunzione neuromuscolare, dovuta al rilascio contemporaneo di ATP e ACh (Fu and Liu, 1997).

Alternativamente, se il neurotrasmettitore che determina la modulazione presinaptica viene rilasciato da un terminale distinto da quello in cui è situato il recettore, si parla di modulazione eterosinaptica. Le azioni eterosinaptiche possono essere dirette o diffuse, a seconda che il terminale presinaptico che contiene il recettore d'interesse sia in una sinapsi asso-asonica o sia distante dalla zona di rilascio del neurotrasmettitore (MacDermott et al., 1999).

### ***Meccanismi di regolazione presinaptica***

Una volta che il recettore presinaptico è stato attivato ci sono molteplici meccanismi con i quali potrebbe alterare il rilascio di neurotrasmettitore.

I lavori storici di Kandel sul sistema nervoso dell'*Aplysia californica* forniscono una delle prime prove dell'esistenza di meccanismi di modulazione presinaptica. In questi esperimenti, in seguito ad uno stimolo nocivo indirizzato alla testa o alla coda, si osserva che numerose sinapsi del circuito nervoso del riflesso di retrazione delle branchie, appaiono modificate. Nel caso di facilitazione sinaptica, la serotonina e gli altri neurotrasmettitori coinvolti, legandosi ai propri recettori, innescano una cascata di secondi messaggeri, che porta alla fosforilazione di un canale del potassio. La fosforilazione di questo canale riduce una delle componenti della corrente ionica che normalmente determina il processo di ripolarizzazione del potenziale d'azione. La prolungata durata del potenziale d'azione permette al canale del calcio di tipo N di rimanere attivato per un tempo maggiore del normale. In tal modo, nella terminazione entra una quantità maggiore di calcio e viene quindi esaltata la liberazione di neurotrasmettitore. Allungando o diminuendo la durata della ripolarizzazione si ottiene un aumento o una diminuzione nell'ingresso di calcio, e dunque facilitazione o inibizione presinaptica (Kandel, 2000).

I canali del calcio voltaggio dipendenti sono un importante target della modulazione presinaptica del rilascio di neurotrasmettitore. I canali del calcio presinaptici vengono modulati da molteplici meccanismi cellulari che provvedono ad una fine regolazione di entrata di calcio nei terminali nervosi. Molto spesso questi canali sono oggetto di molteplici input modulatori. I VDCC del tipo N e del tipo P/Q sono sottoposti a meccanismi di regolazione comune e condividono gli stessi modulatori.

L'attivazione di recettori presinaptici, come il recettore  $A_1$  per l'adenosina e  $GABA_B$  per il GABA mediano alcune forme di depressione sinaptica. L'inibizione presinaptica può servire come meccanismo per regolare l'efficacia sinaptica e/o per prevenire un eccessivo rilascio di neurotrasmettitore.

Un esempio di azione inibitoria sul rilascio sinaptico, è quello dovuto all'attivazione di canali permeabili agli ioni cloro, che inibendo il flusso di corrente eccitatoria, potrebbero innalzare la conduttanza di riposo di membrana e inibire così il propagarsi di un potenziale d'azione.

Invece l'attivazione di recettori ionotropici cationici potrebbe depolarizzare il terminale, inibendo o facilitando il rilascio. L'inibizione potrebbe sorgere nel caso in cui la depolarizzazione fosse sotto soglia e in grado di inattivare i canali del sodio e/o del calcio voltaggio dipendenti. Una facilitazione risulterebbe invece da una depolarizzazione in grado di aumentare i livelli di calcio presinaptici. L'elevato calcio potrebbe quindi attivare direttamente la machinery di rilascio o attivare secondi messaggeri quali proteine chinasi calcio- e calmodulina-dipendenti o la fosfoproteina fosfatasi calcineurina. Alternativamente l'alto calcio potrebbe essere ulteriormente amplificato dal rilascio calcio-indotto di questo ione dagli store intracellulari. La facilitazione presinaptica può essere legata anche a recettori ionotropici permeabili al calcio, come i recettori nicotinici. I lavori di Changeaux si concentrano sul ruolo di questi recettori presinaptici nella corteccia prefrontale, nel talamo, nei nuclei interpeduncolari e in altre aree del cervello (Vidal e Changeaux, 1993; Léna e Changeaux, 1997). Un altro interessante esempio su come il recettore nicotinico agisca sul rilascio di glutammato, viene dagli esperimenti condotti da Gray nell'ippocampo. La nicotina, applicata ad una concentrazione di 20  $\mu$ M, aumenta la frequenza delle mEPSCs registrate nelle cellule piramidali, ma non ha effetto sull'ampiezza, indicando un meccanismo di azione presinaptico.



Questo effetto richiede la presenza di calcio nella soluzione extracellulare, suggerendo che il complesso recettore-canale è esso stesso permeabile agli ioni calcio. Infatti, la nicotina è in grado di aumentare la concentrazione di calcio nei terminali delle *mossy fiber* attraverso recettori nicotinici presinaptici (Gray et al., 1996). Il recettore presinaptico del kainato, permeabile al calcio, presente nelle terminazione nervose in ippocampo, è anch'esso coinvolto nella facilitazione di rilascio sinaptico (Chittajallu et al., 1996; Lauri et al., 2001). Anche i recettori NMDA sono di fondamentale importanza nella plasticità neuronale. Per esempio nella corteccia entorinale è stata dimostrata la presenza di autorecettori NMDA presinaptici che facilitano il rilascio di glutammato (Berretta e Jones, 1996).

Un'altra forma di modulazione di rilascio indotta dal calcio, dipende dalla mobilitazione di questi ioni dalle riserve intracellulari (*stores*) presenti nel terminale. Innanzitutto gli *stores* di calcio potrebbero contribuire a tamponare l'entrata di calcio attraverso i VDCCs, modulando la cinetica dell'aumento di  $Ca^{2+}$  nel terminale (Fossier et al, 1992). Inoltre esistono due tipi di canale capaci di far rilasciare calcio dagli *stores* intracellulari: i canali/recettori della rianodina (RyR) e il recettore inositolo 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>R) (Henzi e MacDermott, 1992). La caffeina, un'agonista del RyR, è in grado di aumentare la trasmissione sinaptica in CA1 (Lee et al, 1987).

## ***Meccanismi di regolazione VDCC-indipendenti***

Nei meccanismi di inibizione presinaptica in cui non vengono coinvolti i canali del calcio voltaggio dipendenti, gli autorecettori interagiscono fisicamente, probabilmente indirettamente, con una o più proteine chiave coinvolte nel rilascio di neurotrasmettitore. Nei sinaptosomi di cervello di ratto, grazie all'uso della tecnica di immunoprecipitazione ed esperimenti di crosslinking, è stato dimostrato che il recettore muscarinico dell'acetilcolina M2 interagisce con la *sintassina*, SNAP25, VAMP e con la *sinaptotagmina* (Linial et al., 1997). Dato il loro ruolo di controllo, gli autorecettori devono essere presenti nelle zone di rilascio sinaptico, come è stato dimostrato per i recettori NMDA nelle sinapsi di crostaceo (Parnas et al., 1994).

Evidenze che l'inibizione del rilascio tonico di neurotrasmettitore può non essere mediato dal blocco dei canali del calcio viene da esperimenti in cui, grazie all'uso della tecnica del calcium imaging, si può notare come nella giunzione neuromuscolare di crostaceo, l'applicazione di glutammato o di NMDA provochi inibizione del rilascio di neurotrasmettitore indipendentemente dell'entrata di calcio o da un cambiamento nella conduttanza di membrana presinaptica (Parnas et al., 1996). Similarmente, è stato visto nella giunzione neuromuscolare di rana che l'inibizione voltaggio-dipendente prodotta da una bassa concentrazione di muscarina non è accompagnata da una riduzione della corrente del calcio (Slutsky et al., 1999). Infine, nei sinaptosomi di ratto, l'inibizione prodotta da cambiamenti di concentrazione di KCl, è indipendente dal livello extracellulare di calcio (Roche e Treisman, 1998).

Studi suggeriscono che il potenziale di membrana ha di *per se* un ruolo nel dare inizio e nel terminare il rilascio di neurotrasmettitore (Parnas et al., 2000). Mochida et al. (1998), hanno dimostrato nei loro esperimenti che la depolarizzazione del terminale presinaptico ha un effetto facilitante calcio-indipendente. Questi autori hanno misurato il rilascio di acetilcolina dai neuroni in coltura del ganglio cervicale superiore, che risulta aumentato dopo una stimolazione tetanica anche in presenza di agenti leganti il calcio, come il BAPTA, o in presenza di tapsigargina, in grado di mediare la deplezione degli store intracellulari di questo ione. Una possibilità su quale sia il meccanismo

con cui il potenziale di membrana possa direttamente controllare il rilascio fu suggerita da Silinsky nel 1985, che ipotizzò il coinvolgimento di una proteina legante il calcio, sensibile ai cambiamenti di potenziale di membrana, e direttamente coinvolta con la machinery di rilascio sinaptico .

Un altro meccanismo di modulazione sinaptica potrebbe dipendere dai cambiamenti dei fattori che regolano il riempimento da parte di neurotrasmettitore delle vescicole sinaptiche. Questi fattori, come la biosintesi e il ricircolo del trasmettitore stesso, il gradiente elettrochimico di ioni idrogeno che guida il trasporto all'interno delle vescicole e i trasportatori di neurotrasmettitori, sono in grado di regolare presinapticamente l'unità quantale di sostanza rilasciata e di conseguenza l'efficacia sinaptica (Edwards, 2007). Molti studi hanno dimostrato, in condizioni fisiologiche, questa modalità di regolazione presinaptica dovuta alle quantità di trasmettitore rilasciato. In *Drosophila*, il "quantal size" è correlato con il livello di nutrizione. Immediatamente dopo aver sostituito un piatto di cibo con uno senza, questi insetti iniziano a muoversi più velocemente e mostrano un incremento nel "quantal size" delle vescicole presinaptiche nelle sinapsi glutammatergiche delle giunzioni neuromuscolari (Steinert et al., 2006). Nei sinaptosomi di cervello di ratto, la depolarizzazione aumenta gli store di vescicole di glutammato (Bole et al., 2002) e la stimolazione di cellule cromaffine e la conseguente regolazione del pH incrementa il volume e il "quantal size" delle vescicole secretorie di bovino e di roditore (Pothos et al., 2002).

## **RECETTORI PRESINAPTICI DEL GABA E DEL GLUTAMMATO**

Il GABA e il glutammato, i due maggiori neurotrasmettitori nel Sistema Nervoso Centrale, agiscono legandosi a recettori sia ionotropici che metabotropici. La risposta cellulare all'attivazione di questi recettori dipende, tra gli altri fattori, dalla precisa localizzazione in relazione alle sinapsi. L'uso delle tecniche immunostochimiche abbinate a tecniche di microscopia elettronica ad alta definizione hanno permesso di fare un'accurata descrizione della localizzazione subcellulare e subsinaptica di questi recettori (Galvan et al., 2006).

### ***Recettori metabotropici del glutammato***

I recettori metabotropici del glutammato (mGluRs) fanno parte della classe di recettori associati ad una proteina G. Nel corso degli anni sono stati clonati otto sottotipi di mGluRs, basandosi sull'omologia di sequenza, sul profilo farmacologico e sull'accoppiamento col secondo messaggero. Possono essere divisi in tre gruppi: gruppo I (mGluRs 1 e 5), gruppo II (mGluRs 2 e 3) e il gruppo III (mGluRs 4, 6, 7 e 8). I recettori del gruppo I sono principalmente accoppiati alla famiglia G q/11 di proteine G eterotrimeriche, che attivano la fosfolipasi C e il susseguente incremento di concentrazione di calcio intracellulare. Gli mGluRs del gruppo I possono inoltre indurre una diretta depolarizzazione diminuendo le correnti del potassio. Invece i recettori del gruppo II e del gruppo III sono associati alla famiglia G i/o, che regola negativamente l'adenilato ciclato e la produzione di AMP ciclico (FIG 12). Gli mGluRs del gruppo II e III possono inoltre incrementare la corrente del potassio e diminuire le correnti calciche (Conn e Pin, 1997; Marino et al., 2003).

I tre sottogruppi degli mGluRs sono ampiamente distribuiti nei circuiti dei nuclei della base, dove modulano la trasmissione sinaptica attraverso meccanismi pre e postsinaptici (Conn et al., 2005). In generale il gruppo I è localizzato negli elementi postsinaptici, e media effetti eccitatori, mentre il

gruppo II e III sono localizzati a livello presinaptico e modulano il rilascio di neurotrasmettitore, agendo da auto- o eterorecettori (Galvan et al., 2006). Sia il gruppo II che il gruppo III sono stati trovati nei terminali glutammatergici dello striato (Tamaru et al., 2001) e della SNr (Bradley et al., 2000). Entrambe queste famiglie di recettori regolano il rilascio di glutammato alle sinapsi eccitatorie cortico-striatali (Calabresi et al., 1992; Pisani et al., 1997) e subtalamo-nigrali (Bradley et al., 2000). Evidenze elettrofisiologiche indicano inoltre che gli mGluRs del gruppo III inoltre agiscono come eterorecettori che modulano il rilascio di GABA nello striato, nel globo pallido e nella sostanza nera (Wittmann et al., 2001; Valenti et al., 2003).

## Recettori Metabotropici

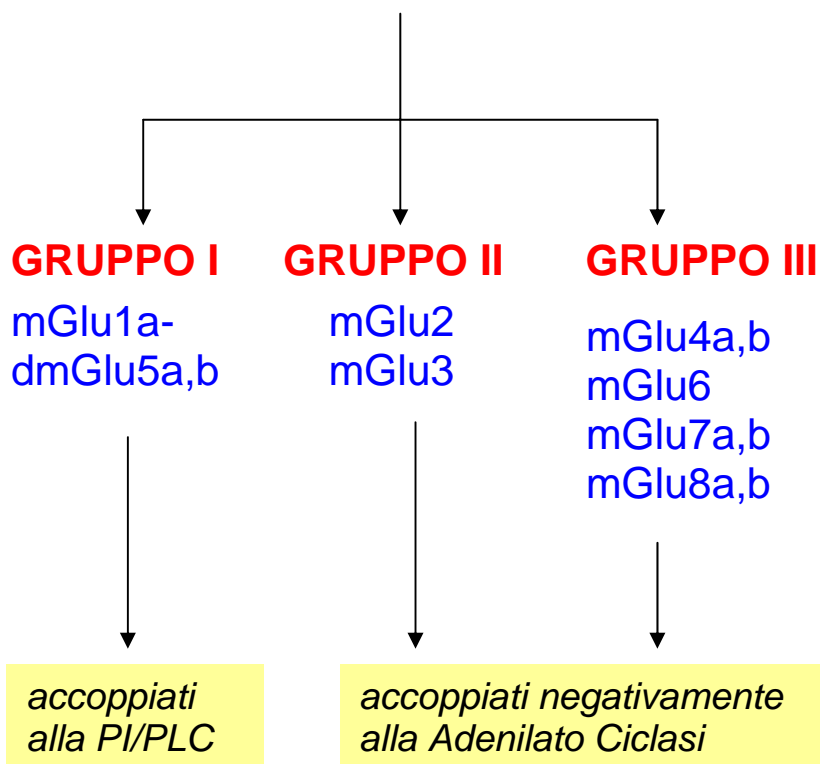


FIG 12: Schema riassuntivo delle famiglie dei recettori metabotropici del glutammato.

## **Recettori GABA<sub>B</sub>**

I recettori metabotropici GABA<sub>B</sub> sono eterodimeri formati dalle subunità R1 e R2 (Marshall et al., 1999) e sono accoppiati a proteina G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, dando luogo a effetti misti sull'attività dell'adenilato ciclasi (Bowery et al., 2002). Questi recettori possono essere localizzati sui terminali postsinaptici, mediando una lenta iperpolarizzazione, o sui siti presinaptici, inibendo il rilascio di neurotrasmettitore (Bettler et al., 2004). Una dettagliata localizzazione subsinaptica dei recettori GABA<sub>B</sub> è stata descritta nella SNr, nella SNc, nel GP e nello striato di ratto (Boyes e Bolam, 2007). Nello striato i recettori GABA<sub>B</sub> presinaptici sono espressi sui terminali corticali e talamici e colocalizzano con i trasportatori vescicolari del glutammato, indicando che le due maggiori fonti di input eccitatori dei neuroni striatali potrebbero essere regolate dal GABA (Lacey et al., 2005). Oltre al loro ruolo di eterorecettori, i recettori GABA<sub>B</sub> presinaptici sono espressi nei terminali GABAergici del mesencefalo modulando il rilascio di GABA (Wilson e Wilson, 1985; Chan et al., 1998; Giustizieri et al., 2005). In uno studio sulle sinapsi del calice di Held (Takahashi, 2005) l'effetto inibitorio del baclofen, agonista del recettore GABA<sub>B</sub>, è mediato dalla subunità βγ della proteina G<sub>0</sub>. Inoltre il baclofen occlude l'effetto inibitorio presinaptico dell'adenosina (Kimura et al., 2003) e quello dell'agonista mGluR L-AP4 (Takahashi et al., 1996) suggerendo che, in un singolo terminale sinaptico, molteplici proteine G presinaptiche siano legate ad un target comune, che potrebbe essere rappresentato dai VDCCs, via G βγ per inibire il rilascio di neurotrasmettitore.

# SCOPO DELLA RICERCA

L'inibizione presinaptica è un meccanismo di modulazione sinaptica comunemente osservato nelle sinapsi del sistema nervoso centrale e periferico. Questo processo inizia in risposta all'attivazione di un'ampia varietà di recettori presinaptici e porta ad una riduzione della probabilità di fusione delle vescicole con la membrana del terminale sinaptico. Uno dei più comuni meccanismi d'azione consiste nell'inibizione dei canali del calcio a voltaggio dipendenti (VDCCs) localizzati nei bottoni presinaptici. Tuttavia, esistono altre forme di inibizione presinaptica con meccanismi che coinvolgono direttamente la machinery di rilascio vescicolare.

Il presente lavoro sperimentale ha lo scopo di studiare i meccanismi di inibizione presinaptica mediata dai recettori metabotropici del glutammato di tipo III (mGluRs III) e dai recettori GABA<sub>B</sub> nella trasmissione GABAergica afferente ai neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SNc) di ratto. Mediante un approccio elettrofisiologico e farmacologico questi processi sono stati ampiamente studiati e i risultati ottenuti indicano un diverso meccanismo d'azione mediato dalle due famiglie di recettori. Gli mGluRs di tipo III deprimono il rilascio di GABA nei neuroni dopaminergici attraverso l'inibizione dei VDCCs presinaptici, mentre i recettori GABA<sub>B</sub> agiscono direttamente sull'esocitosi del neurotrasmettitore. Questa caratterizzazione fornisce nuove conoscenze sul ruolo di questi recettori presinaptici nello studio della fisiologia della *substantia nigra* e nel loro potenziale uso come target nel trattamento farmacologico di malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson.

# METODI

## ***Preparazione di fettine di mesencefalo di ratto***

Per la preparazione del tessuto di mesencefalo in vitro sono stati usati individui di ambo i sessi del ratto albino Wistar ad una età compresa tra i 18 e i 25 giorni.

Gli animali sono stati anestetizzati con l'inalazione di alotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1,1-tetrafluoroetano) per alcuni minuti e poi sacrificati in accordo con le direttive del Comitato Etico dell'università di Roma "Tor Vergata" sull'uso degli animali nella ricerca.

Sull'encefalo rapidamente esportato dalla scatola cranica, si praticano alcuni tagli in senso coronale, sagittale ed orizzontale per delimitare la regione mesencefalica d'interesse. Il tessuto viene subito immerso in una soluzione di liquido cerebrospinale artificiale (ACSF) composta da (in mM): NaCl 126; KCl 2.5; MgCl<sub>2</sub> 1.2; CaCl<sub>2</sub> 2.4; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; NaHCO<sub>3</sub> 24; glucosio 11; saturata al 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4) e mantenuta ad una temperatura di 8-10°C. Per mezzo di un vibratomo vengono eseguite sezioni orizzontali di 250 micrometri a partire dal lato ventrale e che includono la regione della sostanza nera.



## **Registrazioni di patch-clamp**

La tecnica del “patch-clamp” è stata ideata nel 1976 da Neher e Sakmann per la registrazione delle correnti di singoli canali ionici. La tecnica del patch-clamp utilizza un elettrodo di vetro contenente un’appropriata soluzione di elettroliti. Questo elettrodo registrante è di vetro borosilicato e si prepara per mezzo di un “puller”, uno strumento dotato di una resistenza circolare che, surriscaldandosi, provoca l’assottigliamento della pipetta. L’elettrodo viene riempito con una soluzione isoosmotica con il citoplasma della cellula (“soluzione intracellulare”) e collegato ad un amplificatore mediante un supporto (“holder”) per mantenere la continuità elettrochimica. La punta della pipetta è dotata di un’apertura terminale del diametro di 2-3  $\mu\text{m}$  che viene appoggiata delicatamente sulla membrana cellulare, aderendovi strettamente per formare una saldatura, detta *seal*, tale da isolare elettricamente l’ambiente interno all’elettrodo dal liquido extracellulare. La formazione di un buon *seal* è facilitata da una debole suzione tramite un tubicino di gomma collegato al microelettrodo. La qualità del *seal* può essere misurata elettricamente dalla resistenza al flusso di corrente dall’interno all’esterno dell’elettrodo, che deve raggiungere valori di almeno 1-10 Giga $\Omega$  ( $10^9$ - $10^{10}$  Ohm).

La formazione del *seal* e la successiva rottura del tassello di membrana che sottende alla punta dell’elettrodo permette di ottenere una configurazione cosiddetta di *whole-cell*, così che si ottiene una continuità diretta tra il contenuto della cellula e quello dell’elettrodo. In queste condizioni si possono misurare le correnti elettriche dell’intera cellula e si possono introdurre sostanze, farmaci o enzimi all’interno della cellula usando l’elettrodo stesso.

I neuroni dopaminergici della sostanza nera presi in esame sono stati inizialmente identificati visivamente mediante un sistema ottico costituito da un microscopio (Axoscope FS, Carl Zeiss Spa, Arese, Italy) fornito di obbiettivi 4X e 40X. Il campo ottico con l’immagine della fettina illuminata da luce bianca, viene filtrato per la luce infrarossa (Hamamatsu Photonics Italia Srl, Milan, Italy) e raccolto da una telecamera montata sul microscopio e poi proiettato su un monitor per visualizzare la regione che include MT, SN e VTA (FIG 1).

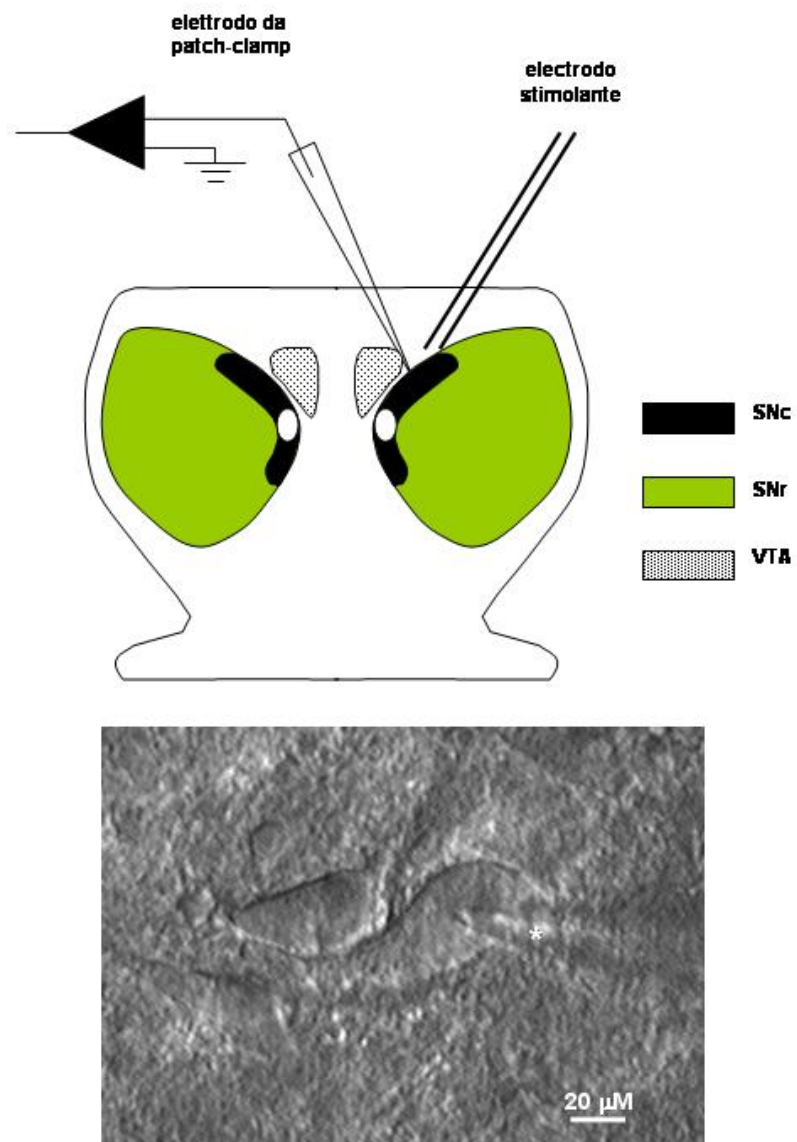


FIG 1: In alto rappresentazione schematica della sostanza nera e del sistema di elettrodi di registrazione e di stimolazione. In basso fotografia di un tipico neurone dopaminergico in cui è visibile anche l'elettrodo da patch clamp.

La registrazione dei segnali bioelettrici sono state effettuate per mezzo di un amplificatore collegato ad una interfaccia analogico/digitale (Digidata 1320A-Axon Instruments) e poi acquisite ed analizzate attraverso un personal computer.

## ***Proprietà dei neuroni dopaminergici***

Il lavoro della mia tesi si basa sullo studio di due forme di inibizione presinaptica descritte nelle sinapsi GABAergiche dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta*, mediate dal glutammato e dal GABA, attraverso l'attivazione dei recettori mGluRs e GABA<sub>B</sub> rispettivamente.

La maggior parte delle sinapsi delle cellule dopaminergiche mesencefaliche sono GABAergiche e provvedono ad una tonica inibizione di questi neuroni ed al controllo della loro attività di firing. Tuttavia anche input glutammatergici sono presenti in quest'area e contribuiscono, con le loro azioni pre- e postsinaptiche, alla modulazione dell'eccitabilità neuronale.

Numerosi studi sui neuroni dopaminergici, dimostrano che cambiamenti negli input GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> possono modificare il firing *pattern* di questi neuroni. L'applicazione della bicucullina, un'antagonista GABA<sub>A</sub>, aumenta il numero di neuroni che sparano in modalità burstiforme, mentre l'applicazione di antagonisti GABA<sub>B</sub>, causa un modesto shift verso la modalità pacemaker (Celada et al., 1999; Tepper e Lee, 2007).

Le registrazioni di patch clamp in modalità whole-cell sono state ottenute da cellule identificate come neuroni dopaminergici in base alla loro localizzazione in prossimità del nucleo medio terminale (MT) del tratto ottico accessorio e alla loro tipica conformazione fusiforme con lunghi dendriti prossimali poco ramificati. Tutte le registrazioni sono state ottenute in voltage clamp con un holding di -60 mV. Gli elettrodi sono stati riempiti con la soluzione intracellulare composta da (in mM): CsCl (133), MgCl<sub>2</sub> (2), EGTA (0.1), Hepes (10), QX-314 (10); pH portato a 7.3 con CsOH (280 mOsm). La soluzione intracellulare contenente anche cesio e QX-314 (bloccante dei canali del sodio) non ha permesso l'identificazione dei neuroni registrati in base alla loro corrente I<sub>h</sub> o in base alla loro risposta alla dopamina, ma in configurazione cell-attached è stato possibile osservare una frequenza di firing di 1-3 Hz,

tipica dei neuroni dopaminergici (Grillner and Mercuri, 2002). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in continua presenza degli agonisti dei recettori ionotropici del glutammato, il CNQX (10  $\mu$ M) e l'AP5 (50  $\mu$ M). Inoltre ogni risposta post sinaptica dovuta all'attivazione di conduttanze potassio è stata prevenuta con la dialisi intracellulare, attraverso la pipetta, del cesio e del QX-314.

## ***Analisi dei dati***

Il picco dell'ampiezza delle correnti post sinaptiche evocate (IPSCs), definito come la differenza tra l'ampiezza massima che segue lo stimolo e la linea di base, è stato misurato calcolando la media di tre tracce in ogni diversa condizione sperimentale. La baseline è stata definita dalla media del potenziale di membrana nei 100 ms che precedono l'artefatto dello stimolo. I dati ottenuti sono stati espressi come medie dei valori  $\pm$  SE. Le differenze statistiche sono state valutate con il test *t* di Student a due code ( $p < 0.05$ ).

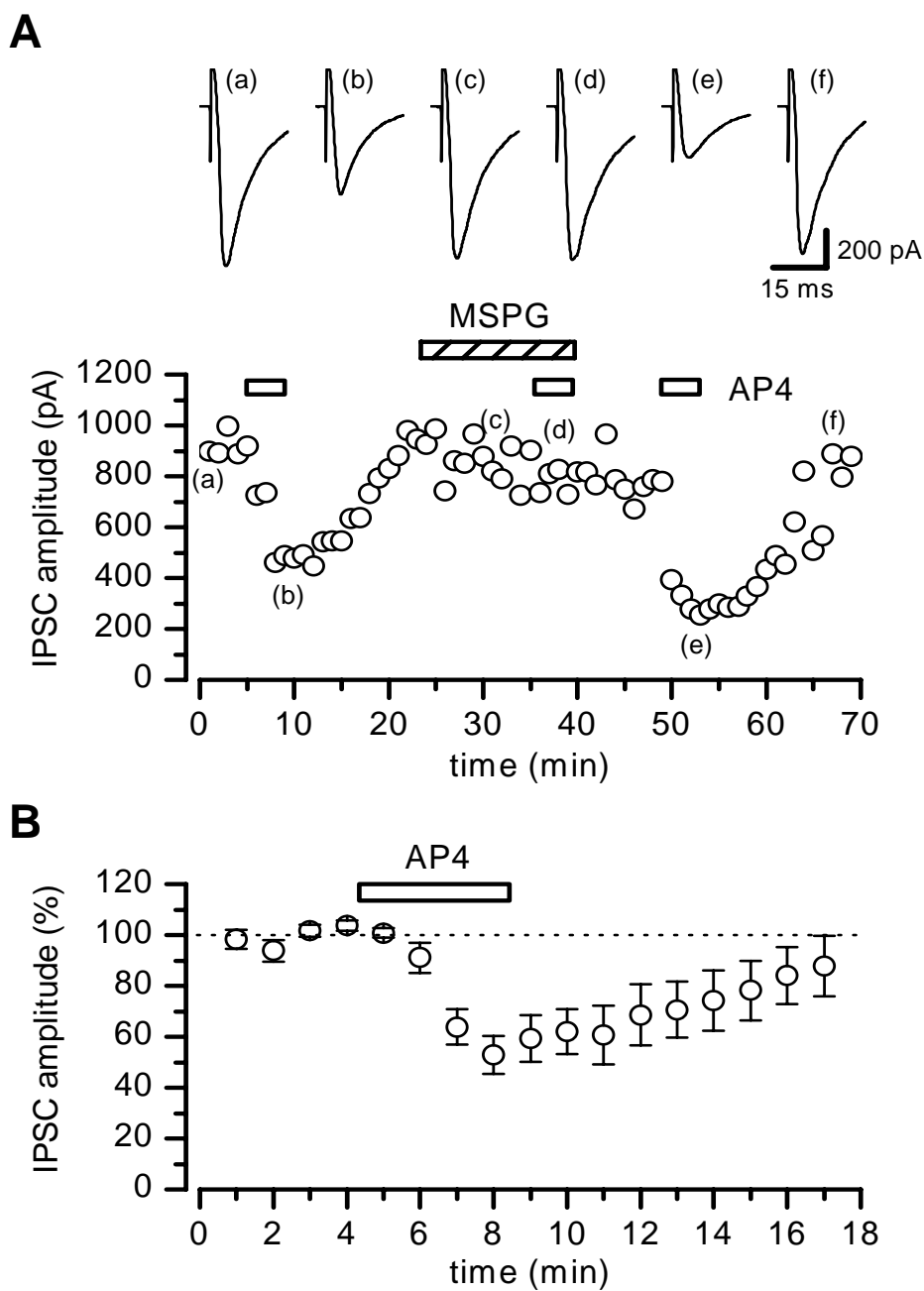
Le correnti sinaptiche spontanee sono state analizzate usando il Mini Analysis Program (Synaptosoft Inc., USA). L'ampiezza la frequenza istantanea dei miniature IPSCs (mIPSCs) e degli spontanei IPSCs (sIPSCs) sono stati statisticamente valutati con il test di *Kolmogorov-Smirnov* (K-S) con una  $p < 0.05$ .

# RISULTATI

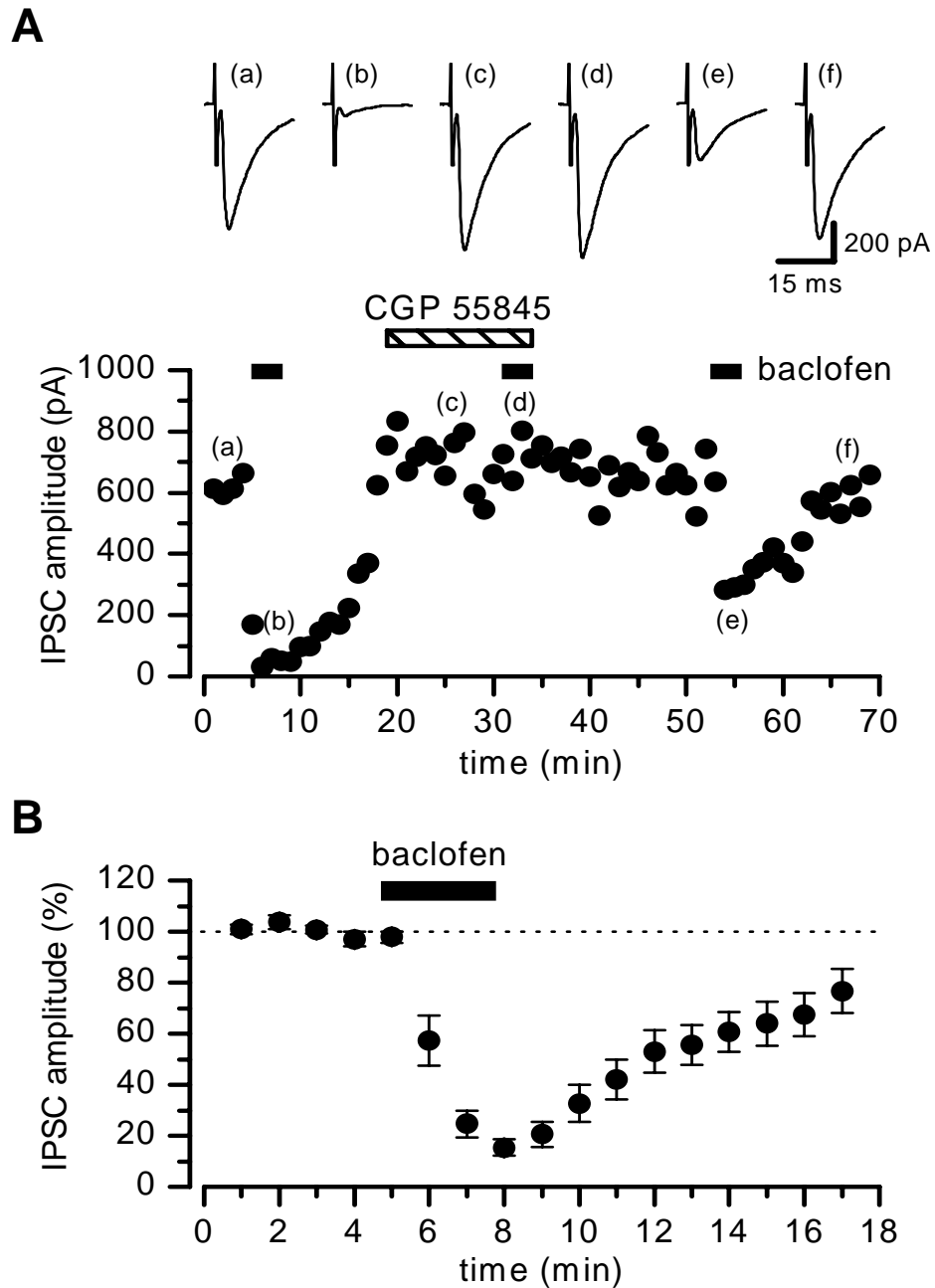
## ***Effetto dell'AP4 e del baclofen sulle eIPSCs***

Nella prima parte del mio studio sono state analizzate le risposte sinaptiche evocate ottenute grazie all'uso di un elettrodo stimolante posizionato nella sostanza nera. Lo stimolo elettrico è stato applicato con una frequenza di 0.1-0.3 Hz ed è stato generato da uno stimolatore (Grass Instruments) attraverso un elettrodo bipolare di tungsteno. Gli esperimenti sono stati condotti in continua presenza di CNQX (10  $\mu$ M) e AP5 (50  $\mu$ M), antagonisti dei recettori ionotropici del glutammato, per isolare la IPSC (corrente postsinaptica inibitoria) mediata dal recettore GABA<sub>A</sub>. Le risposte mediate da questo recettore sono molto veloci e sono completamente bloccate dalla picrotossina (100  $\mu$ M).

L'applicazione in bagno dell'agonista selettivo del recettore mGluRs di tipo III, AP4 (L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid), provoca una depressione reversibile dell'IPSC, che raggiunge il massimo effetto di  $59.8 \pm 8.9$  % del controllo (n = 6) ad una concentrazione di 100  $\mu$ M (FIG 1). In presenza di MSPG (RS-a-methyl-4-sulfonophenylglycine), antagonista aspecifico dei recettori mGluR, l'effetto dell'AP4 viene bloccato (FIG 1A). L'ampiezza dell'IPSC è inoltre inibita dall'applicazione del baclofen (10  $\mu$ M) (FIG 2), agonista del recettore GABA<sub>B</sub>, e questo effetto è prevenuto dalla perfusione con l'agonista dei recettori GABA<sub>B</sub>, il CGP 55845 ((2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)(ethyl)amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinic acid) (FIG 2A).



**FIG 1:** L'applicazione in bagno di 100  $\mu\text{M}$  di L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (AP4) deprime reversibilmente le correnti inibitorie post sinaptiche evocate. **A** (in alto): tracce di IPSCs registrate ai tempi indicati dalla lettera corrispondente nel plot sottostante. (in basso): nel plot l'inibizione delle IPSCs causata dall'AP4 è prevenuta dalla perfusione delle cellule con MSPG (500  $\mu\text{M}$ ). **B** Plot cumulativo dell'ampiezza normalizzata delle IPSC ottenuto da 10 cellule (media  $\pm$  SE) in risposta a 100  $\mu\text{M}$  di AP4.



**FIG 2:** L'applicazione in bagno di  $10 \mu\text{M}$  di baclofen deprime reversibilmente le correnti inibitorie post sinaptiche evocate. **A** (in alto): tracce di IPSCs registrate ai tempi indicati dalla lettera corrispondente nel plot sottostante. (in basso): nel plot l'inibizione delle IPSCs causata dal baclofen è prevenuta dalla perfusione delle cellule con il (2S)-3-[[1S)-1-(3,4-dichlorophenyl(ethyl)amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinic acid (CGP,  $1 \mu\text{M}$ ). **B** Plot cumulativo dell'ampiezza normalizzata delle IPSC ottenuto da 10 cellule in risposta a  $10 \mu\text{M}$  di baclofen.

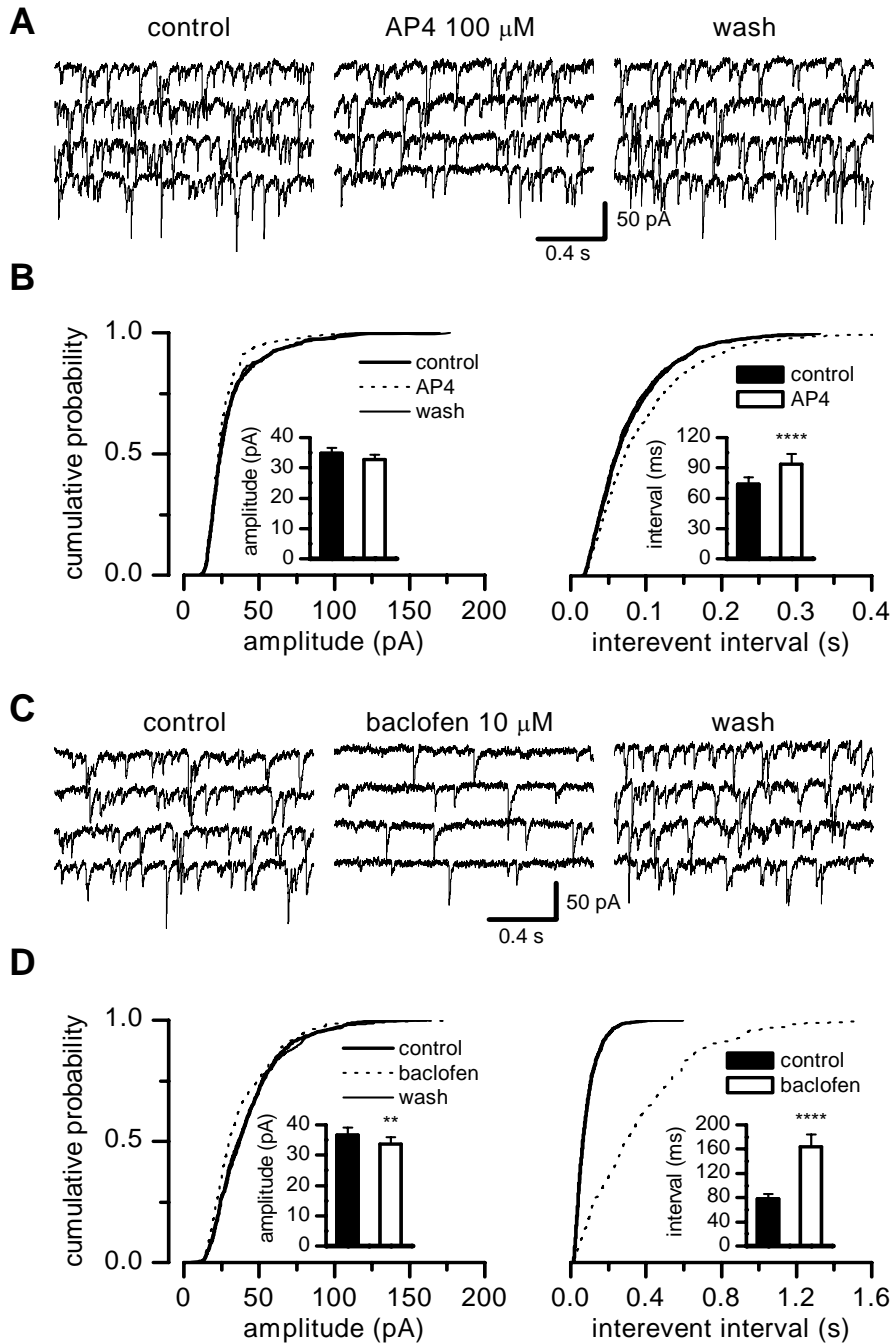
## ***Effetto dell'AP4 e del baclofen sulle sIPSCs***

Per capire in maggior dettaglio il meccanismo di inibizione presinaptica mediato dai recettori mGluRs di tipo III e dai recettori GABA<sub>B</sub> in questa area del cervello, sono stati esaminati gli effetti dell'AP4 e del baclofen sulle correnti inibitorie postsinaptiche spontanee (sIPSCs). In queste cellule l'attività sinaptica spontanea è dovuta al rilascio di glutammato e di GABA, tuttavia nei nostri esperimenti, in seguito alla perfusione con gli antagonisti dei recettori ionotropici del glutammato, le correnti post sinaptiche registrate sono dovute alla sola attivazione dei recettori GABA<sub>A</sub>. Queste correnti inibitorie, registrate ad un potenziale di holding di -60 mV, sono *inward* per via della composizione della soluzione intracellulare caratterizzata da un'alta concentrazione di cloro, che sposta il potenziale di equilibrio per lo ione cloro verso valori positivi.

In ogni neurone registrato, l'AP4 (100 μM) causa una riduzione reversibile della frequenza delle sIPSCs, senza interessare l'ampiezza di queste correnti. Allo stesso modo, il baclofen diminuisce la frequenza, ma in 3 degli 8 neuroni registrati causa anche una diminuzione dell'ampiezza delle sIPSCs con valori statisticamente significativi (FIG 3).

Gli effetti sulla riduzione della frequenza di rilascio sinaptico riscontrati sono indice di un meccanismo presinaptico.





**FIG 3:** I recettori GABA<sub>B</sub> ed mGluRs di tipo III deprimono la trasmissione GABAergica spontanea. **A:** tracce di sIPSCs prima, durante e dopo la perfusione di 100  $\mu$ M AP4. **B:** Distribuzione cumulativa dell'ampiezza (a sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi delle sIPSCs registrate dalla cellula in A. In queste cellule l'AP4 aumenta significativamente l'intervallo tra gli eventi ( $P < 0.0001$ , K-S test) e diminuisce l'ampiezza ( $P < 0.01$ , K-S test). Sempre in B, istogramma (media  $\pm$  SE) dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) delle sIPSCs di 10 cellule ( $P < 0.001$ , t-test). **C:** tracce di sIPSCs acquisite prima, durante e dopo la perfusione di 10  $\mu$ M baclofen. In questa cellula, in presenza di baclofen, l'intervallo tra gli eventi viene aumentato significativamente ( $P < 0.0001$ , K-S test) mentre l'ampiezza delle sIPSCs diminuisce ( $P < 0.001$ , K-S test) (**D**). Sempre in D, istogramma (media  $\pm$  SE) dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) delle sIPSCs di 8 cellule ( $P < 0.001$ , t-test).

## ***Effetti dell'AP4 e del baclofen sulle mIPSCs***

In presenza di TTX (1  $\mu$ M), antagonista dei canali del sodio voltaggio-dipendenti, sono stati analizzati gli effetti di questi due agonisti sulle correnti inibitorie postsinaptiche non dipendenti da un potenziale d'azione, le cosiddette correnti “miniature” (mIPSCs). Le correnti miniature, studiate da del Castillo e Katz già agli inizi degli anni '50 (del Castillo e Katz, 1954), dipendono da un rilascio quantale di neurotrasmettitore casuale dal terminale presinaptico, sono caratterizzati da un'ampiezza omogenea e avvengono anche in assenza di potenziali d'azione.

Nei neuroni studiati la frequenza delle mIPSCs è parzialmente ridotta dall'AP4, ma questo effetto non è statisticamente significativo. Similmente, l'applicazione di questa sostanza non provoca alcun effetto sull'ampiezza delle correnti.

Al contrario, il baclofen è in grado di ridurre la trasmissione GABAergica anche in presenza di TTX, mentre i valori dell'ampiezza non sono modificati.

In seguito, per abolire anche il contributo dei canali del calcio voltaggio dipendenti al rilascio spontaneo di GABA, gli esperimenti sono stati condotti in continua presenza di  $\text{Cd}^{2+}$  (100  $\mu$ M), bloccante dei VDCCs, e TTX. In queste condizioni nessun neurone testato (n=5) mostra cambiamenti significativi nella frequenza e nell'ampiezza delle mIPSCs a seguito di perfusione con AP4 (FIG 4). L'effetto del baclofen sulla frequenza delle mIPSCs è invece ancora presente, pur non modificando la loro ampiezza (FIG 5), dimostrando dunque che l'azione inibitoria legata alla stimolazione dei recettori  $\text{GABA}_B$  non si realizza attraverso una modulazione dei VDCCs.

in TTX and Cd<sup>2+</sup>

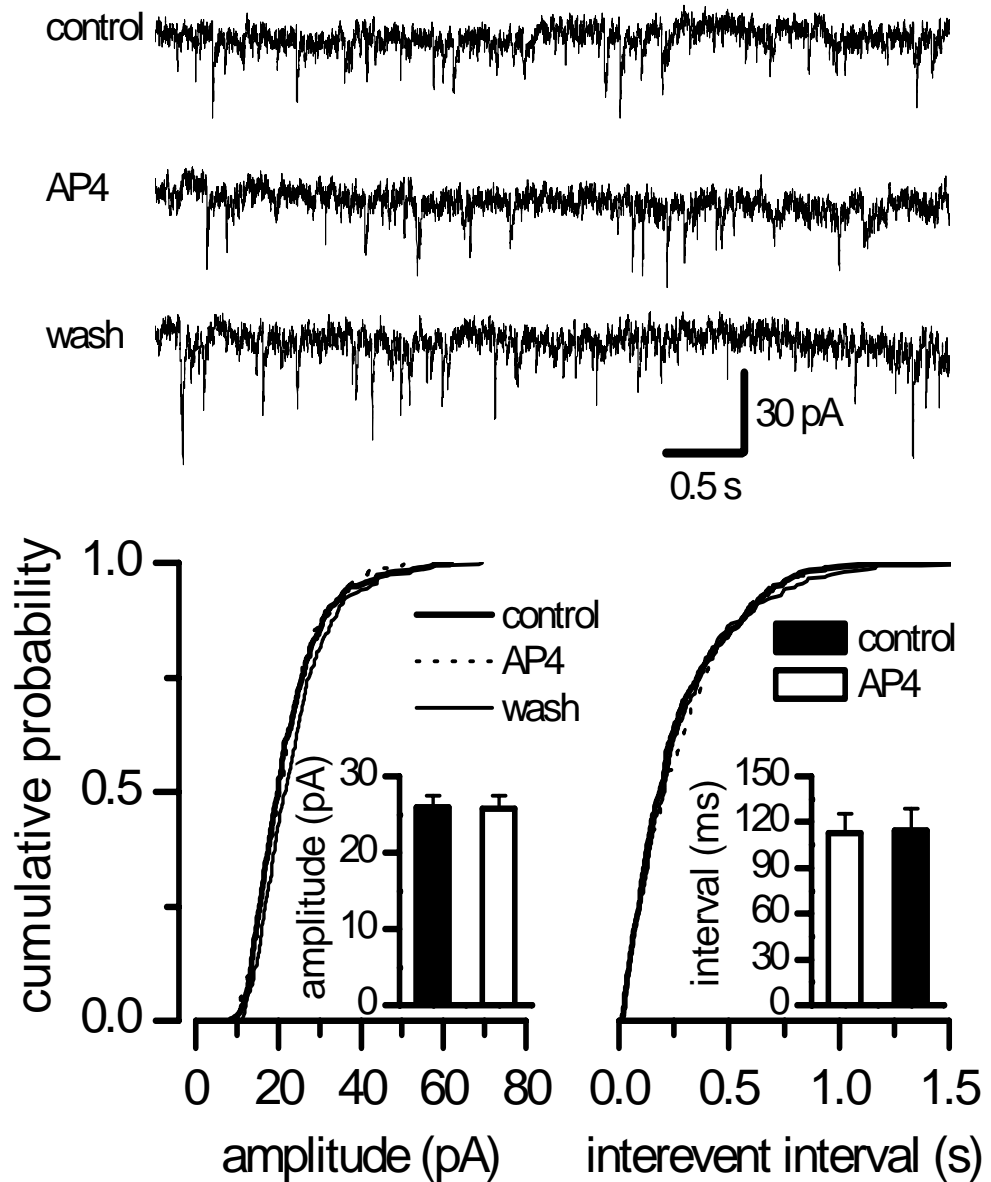


FIG 4: Gli mGluRs di tipo III inibiscono la trasmissione GABAergica VDCC-dipendente. In alto, tracce di mIPSCs prima, durante e dopo la perfusione di AP4 (100  $\mu$ M) in continua presenza di TTX (1 $\mu$ M) e cadmio (100  $\mu$ M). In basso, la distribuzione dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) delle mIPSCs della stessa cellula. L'AP4 non modifica nè l'intervallo tra gli eventi delle mIPSCs ( $P > 0.29$ , K-S test) nè le ampiezze ( $P > 0.53$  K-S test). Sono inoltre mostrati gli istogrammi della media  $\pm$  SE dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) di 5 neuroni ( $P < 0.02$ , t-test).

in TTX and Cd<sup>2+</sup>

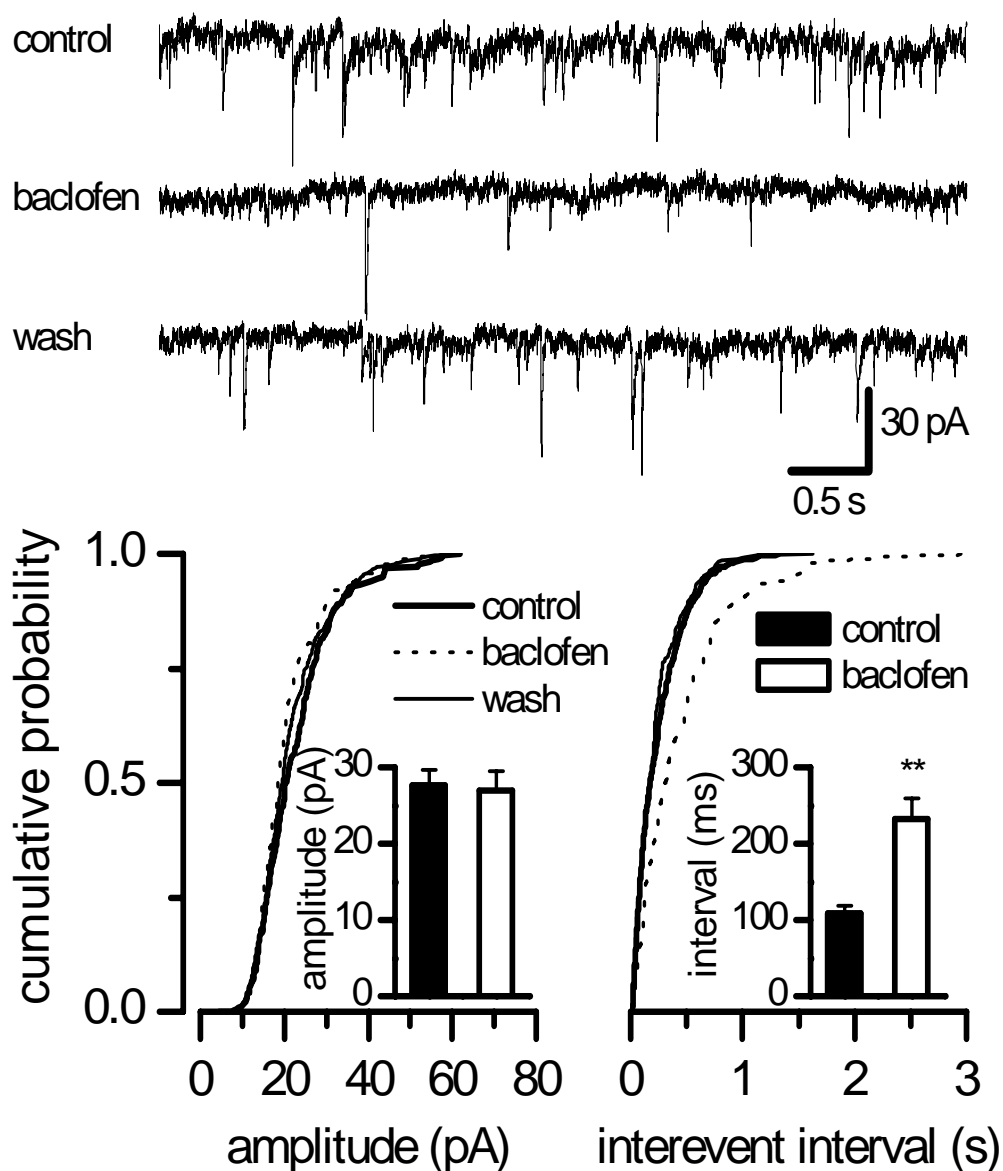


FIG 5: Gli mGluRs di tipo III inibiscono la trasmissione GABAergica VDCC-dipendente. In alto, tracce di mIPSCs prima, durante e dopo la perfusione di baclofen (10  $\mu$ M) in continua presenza di TTX (1  $\mu$ M) e cadmio (100  $\mu$ M). In basso, la distribuzione dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) delle mIPSCs della stessa cellula. Il baclofen aumenta significativamente l'intervallo tra gli eventi delle mIPSCs ( $P < 0.0001$ , K-S test) senza modificarne le ampiezze ( $P > 0.29$ , K-S test). Sono inoltre mostrati gli istogrammi della media  $\pm$  SE dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) di 5 neuroni ( $P < 0.02$ , t-test).

L'inefficacia dell'AP4 sulle mIPSCs suggerisce che i recettori metabotropici del glutammato del gruppo III potrebbero deprimere la trasmissione GABAergica agendo sui VDCCs aperti dopo l'invasione del terminale presinaptico da parte di un potenziale d'azione. Alternativamente questi recettori potrebbero agire sulle conduttanze del sodio TTX-sensibili, riducendo solo gli eventi dipendenti da potenziali d'azione presinaptici. Per discriminare tra queste due possibilità, gli stessi esperimenti sono stati ripetuti in presenza di TTX e di BaCl<sub>2</sub> (1 mM). Dal momento che il bario blocca i canali potassio, questa condizione sperimentale permette di depolarizzare il terminale presinaptico e attivare i VDCCs anche in assenza di un potenziale d'azione. In queste condizioni l'AP4 causa una significativa riduzione della frequenza di mIPSCs (FIG 6). Sempre in presenza di TTX e BaCl<sub>2</sub>, il baclofen è in grado di ridurre la trasmissione GABAergica (FIG 7). Questi esperimenti indicano che gli mGluRs del tipo III inibiscono il rilascio di GABA con un'azione mediata agendo sui canali del calcio voltaggio dipendenti presinaptici.

in TTX and Ba<sup>2+</sup>

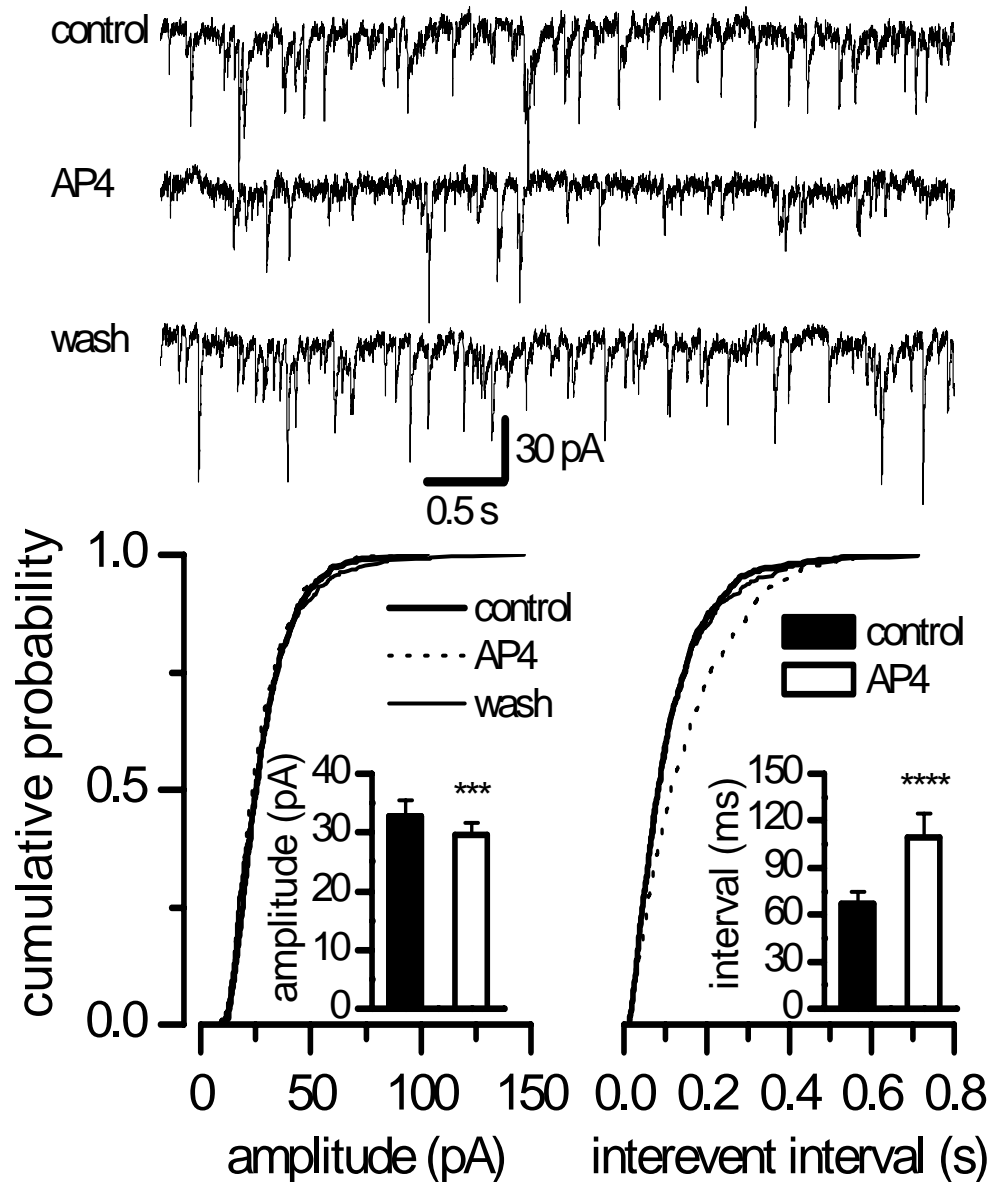


FIG 6: Gli mGluRs di tipo III inibiscono la trasmissione GABAergica VDCC-dipendente. In alto, tracce di mIPSCs prima, durante e dopo la perfusione di AP4 (100  $\mu$ M) in continua presenza di TTX (1  $\mu$ M) e bario (1 mM). In basso, la distribuzione dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) delle mIPSCs della stessa cellula. L'AP4 aumenta l'intervallo tra gli eventi delle mIPSCs ( $P < 0.0001$ , K-S test) senza modificarne le ampiezze ( $P > 0.08$  K-S test). Sono inoltre mostrati gli istogrammi della media  $\pm$  SE dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) di 11 neuroni ( $P < 0.005$ , t-test).

in TTX and Ba<sup>2+</sup>

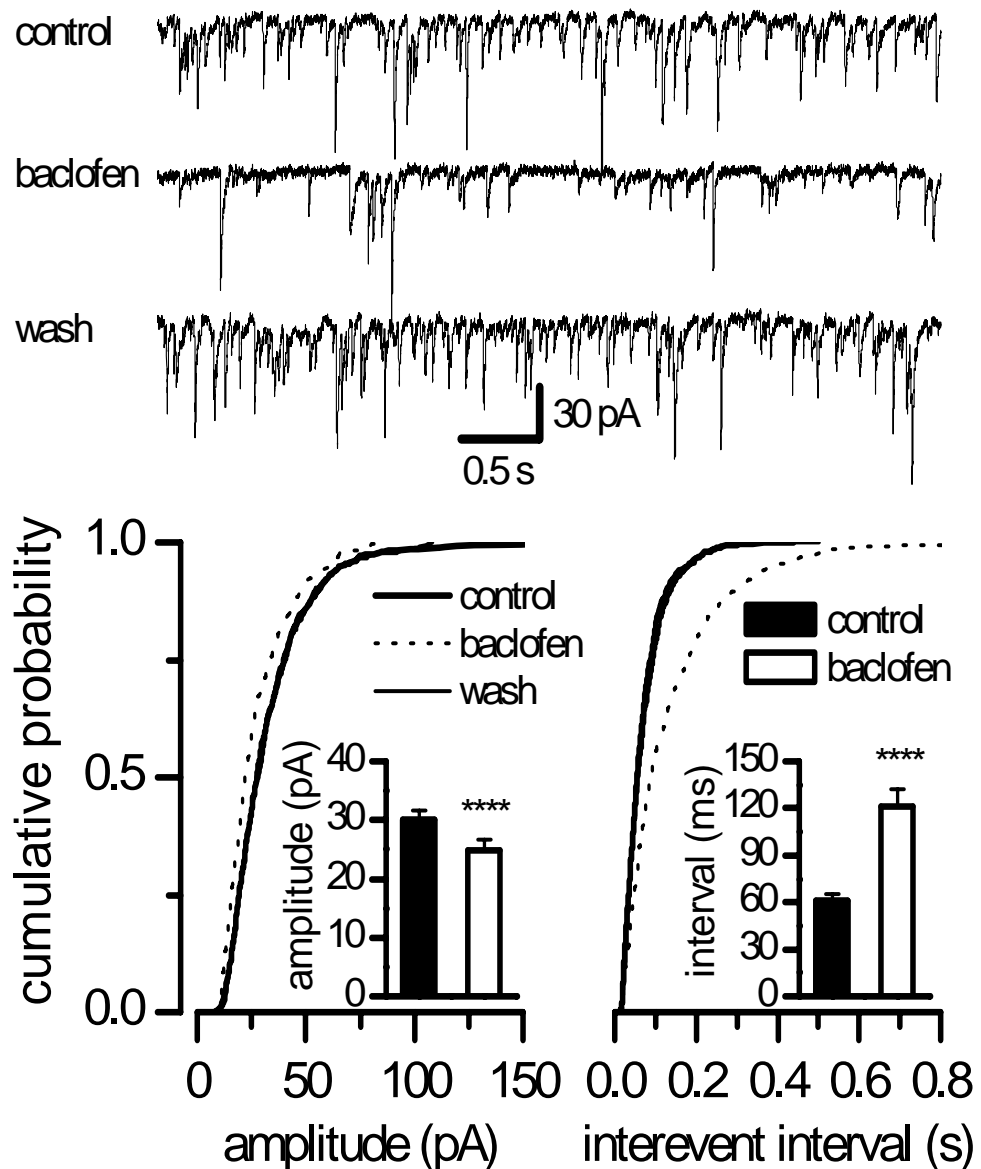


FIG 7: Gli mGluRs di tipo III inibiscono la trasmissione GABAergica VDCC-dipendente. In alto, tracce di mIPSCs prima, durante e dopo la perfusione di baclofen (10  $\mu$ M) in continua presenza di TTX (1 $\mu$ M) e bario (100 mM). In basso, la distribuzione dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) delle mIPSCs della stessa cellula. Il baclofen aumenta significativamente l'intervallo tra gli eventi delle mIPSCs ( $P < 0.0001$ , K-S test) e diminuisce le ampiezze ( $P < 0.001$ , K-S test). Sono inoltre mostrati gli istogrammi della media  $\pm$  SE dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) di 11 neuroni ( $P < 0.001$ , t-test).

## ***Effetti dell'AP4 e del baclofen in presenza di Ionomicina***

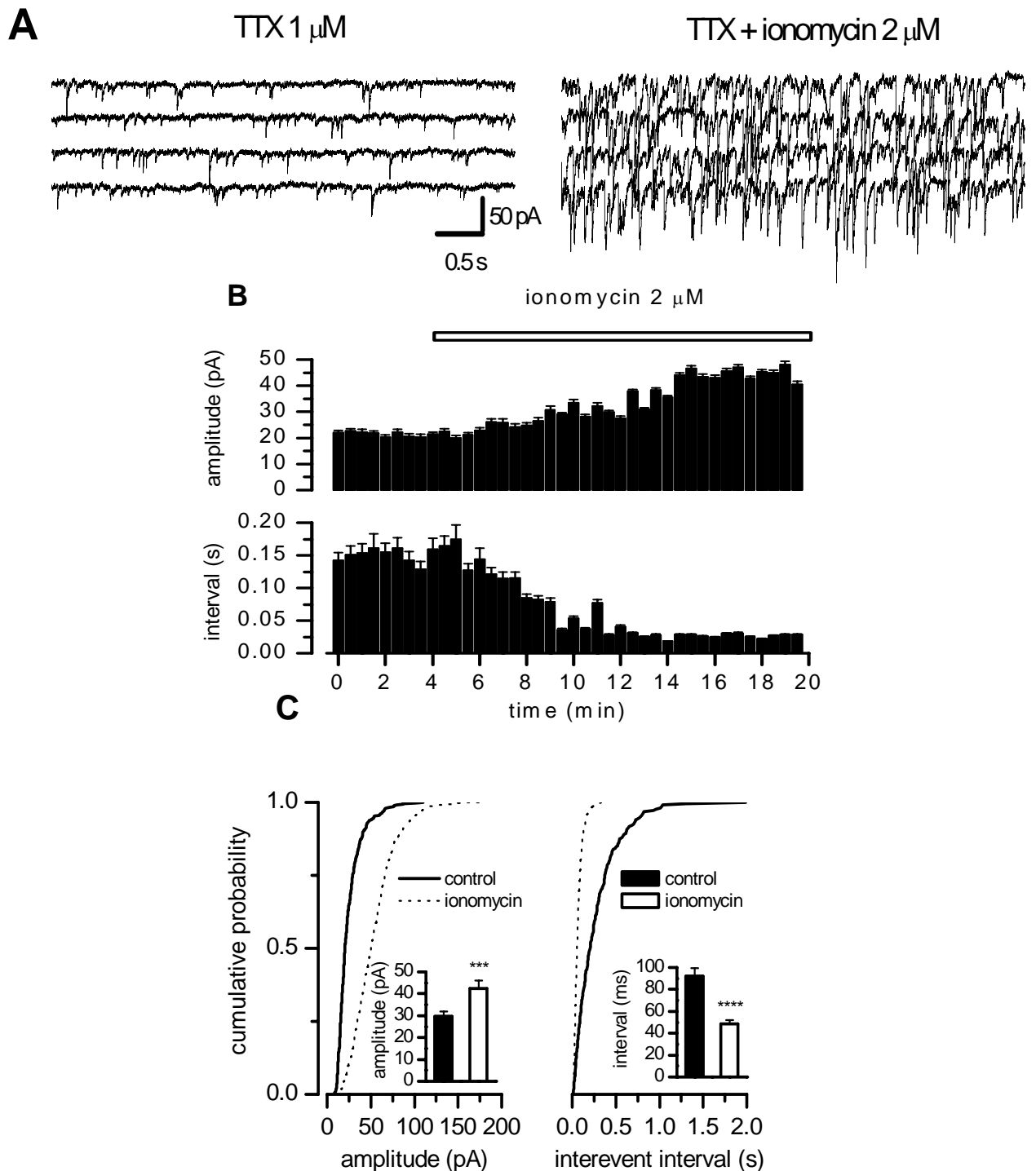
Un altro punto da chiarire in questo studio è stato se durante la trasmissione sinaptica dipendente dall'entrata di calcio, il baclofen esercitava la sua azione di inibizione presinaptica attraverso gli stessi meccanismi utilizzati negli eventi "miniature". Così è stato studiato se il baclofen poteva inibire il rilascio TTX-insensibile dipendente dal calcio, ma indipendente dai canali del calcio voltaggio dipendenti presinaptici. Per fare questo l'entrata di calcio attraverso questi canali è stata bypassata dall'uso dello ionoforo del calcio ionomicina.

Un modo per produrre un diretto influsso di calcio all'interno della cellula, e quindi di stimolare l'esocitosi, si ottiene con l'applicazione di sostanze note come trasportatori del calcio o ionofori. Esistono diversi ionofori, e la loro azione sulla trasmissione sinaptica è stata testata a livello della giunzione neuromuscolare (Van der Kloot e Molgò, 1994). In particolare l'uso della ionomicina nelle sinapsi di colture cellulari dell'area CA3 dell'ippocampo, aumenta la frequenza delle mEPSCs e delle mIPSCs. Questo effetto è stato attribuito ad un aumento di calcio nel terminale presinaptico, indipendente dai canali del calcio voltaggio dipendenti. Infatti in presenza di cadmio, antagonista dei VDCCs, l'effetto della ionomicina non è inibito (Capogna et al, 1996).

La perfusione di ionomicina (2  $\mu$ M), in presenza di TTX, causa un significativo aumento della frequenza delle mIPSCs, associato ad un aumento dell'ampiezza, e che raggiunge un plateau dopo 10-15 minuti di applicazione (FIG 8).

In continua presenza di TTX e ionomicina, il baclofen riduce la frequenza degli mIPSCs senza provocare cambiamenti significativi sull'ampiezza degli eventi (FIG 9). Come atteso, in queste condizioni, l'AP4 non ha effetti né sulla frequenza né sull'ampiezza dei mIPSCs (FIG 10).





**FIG 8:** I recettori  $\text{GABA}_B$  inibiscono le mIPSCs indotte dalla ionomicina. **A:** tracce delle mIPSCs registrate in continua presenza di TTX (1  $\mu\text{M}$ , sinistra) and TTX + ionomicina (2  $\mu\text{M}$ , destra). **B:** istogramma (media  $\pm$  SE; bin size 30 s) dell'ampiezza delle mIPSCs (in alto) e dell'intervallo tra gli eventi (in basso) della cellula A, che indica il time course dell'effetto della ionomicina. **C:** distribuzione cumulativa dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) delle mIPSCs registrate dalla stessa cellula mostrata in A, in TTX (controllo) e in TTX + ionomicina (ionomycin). In questa cellula, la ionomicina riduce la distribuzione dell'intervallo tra gli eventi delle mIPSCs ( $P < 0.0001$ , KS-test), mentre aumenta la loro ampiezza ( $P < 0.0001$ , KS-test). Inoltre sono mostrati gli istogrammi (media  $\pm$  SE) dell'ampiezza delle mIPSCs (sinistra) e dell'interevent interval (destra) da un totale di 14 neuroni (\*\*\*)  $P < 0.005$ , \*\*\*\*  $P < 0.001$ , 2-tailed paired Student's  $t$ -test).

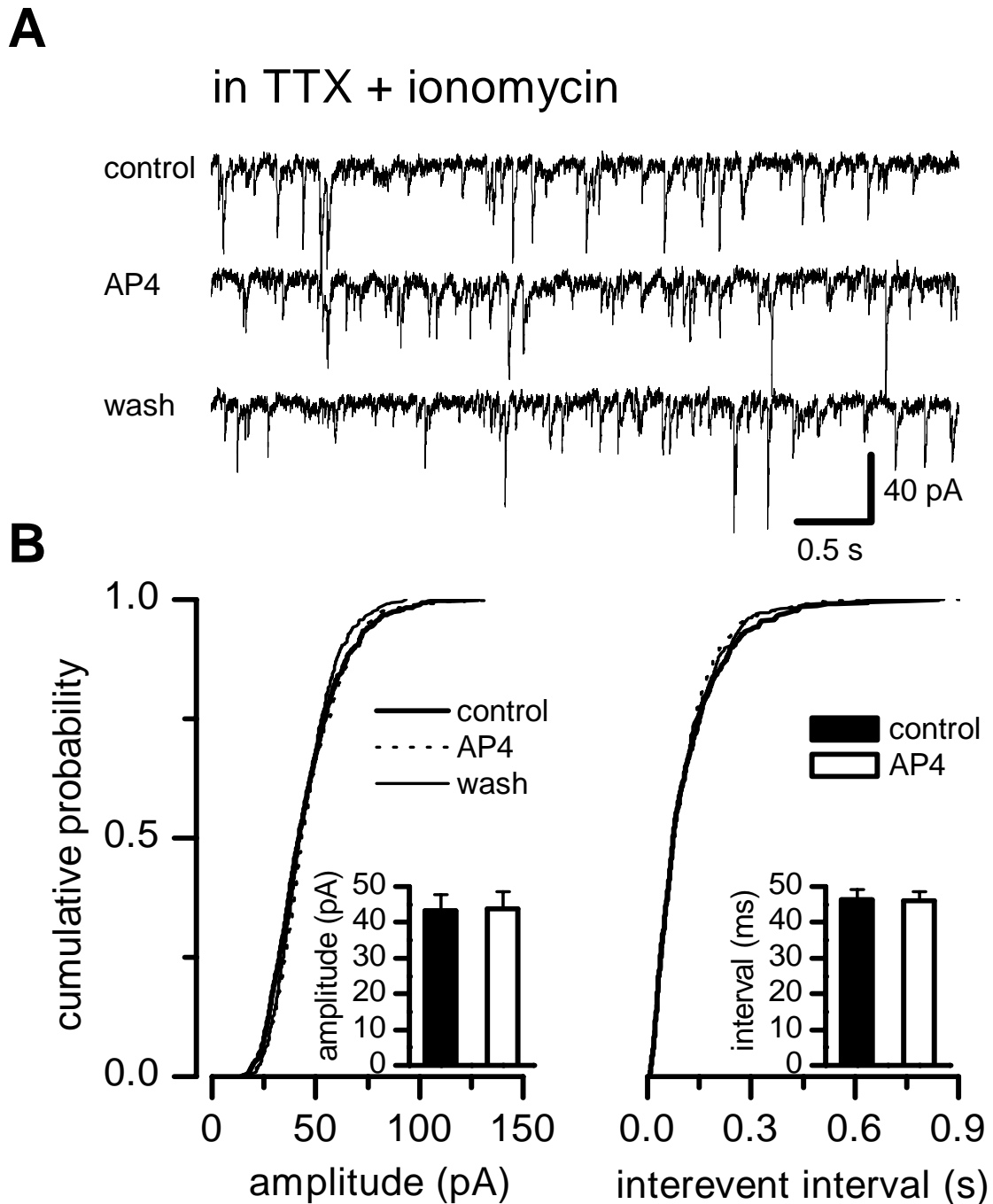


FIG 9: **A**: successive tracce delle mIPSCs registrate in continua presenza di TTX (1  $\mu$ M) e ionomicina (2  $\mu$ M), prima (in alto), durante (al centro) e dopo (in basso) la perfusione di 100  $\mu$ M di AP4. **B**: nella cellula mostrata in A, non ci sono cambiamenti significativi in seguito all'applicazione di AP4, nella distribuzione dell'intervallo tra gli eventi ( $P > 0.78$ , KS-test), e dell'ampiezza ( $P > 0.18$ , KS-test). Inoltre sono mostrati gli istogrammi (media  $\pm$  SE) dell'ampiezza delle mIPSCs (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) da un totale di 15 neuroni (\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.005$ , 2-tailed paired Student's  $t$ -test).

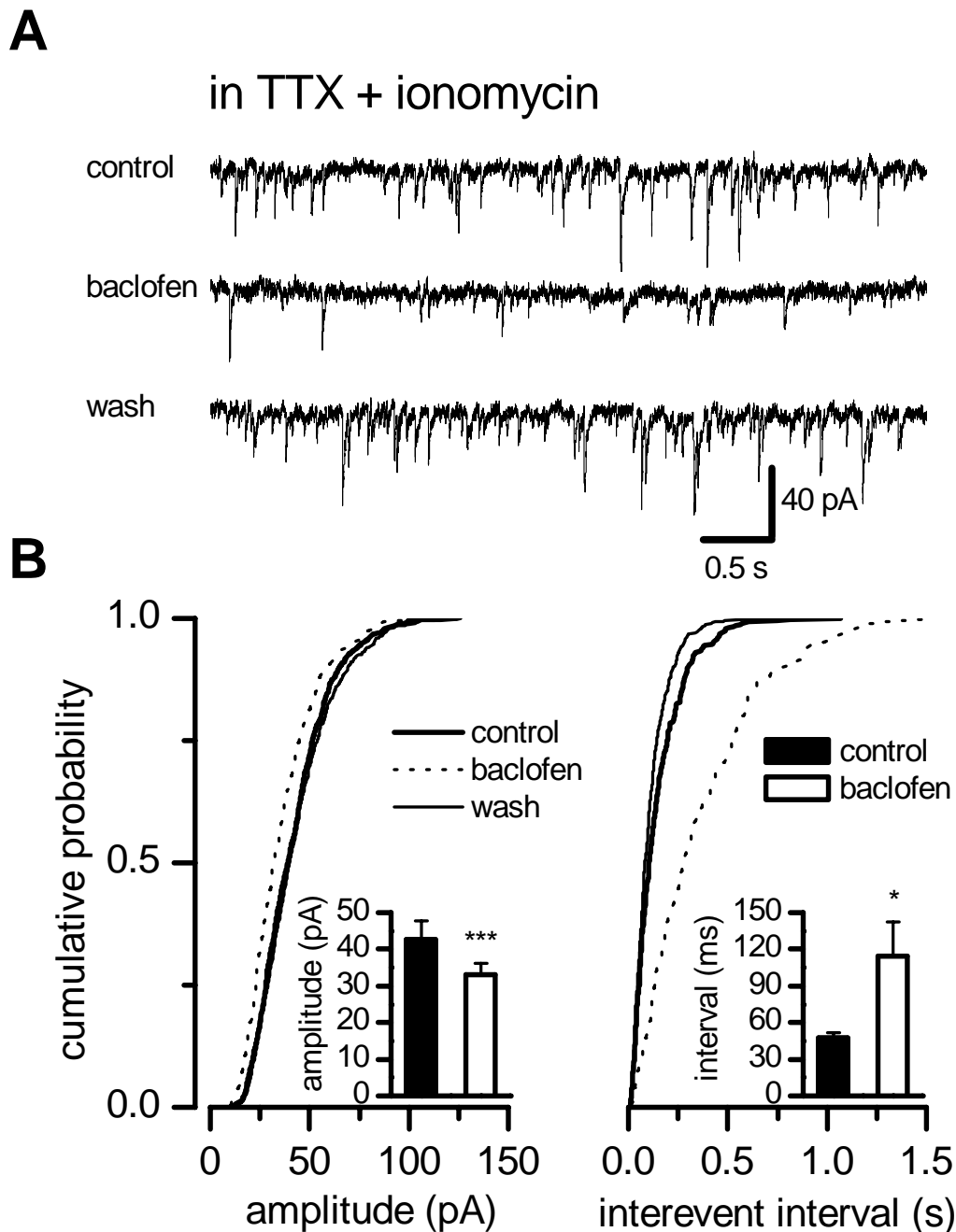
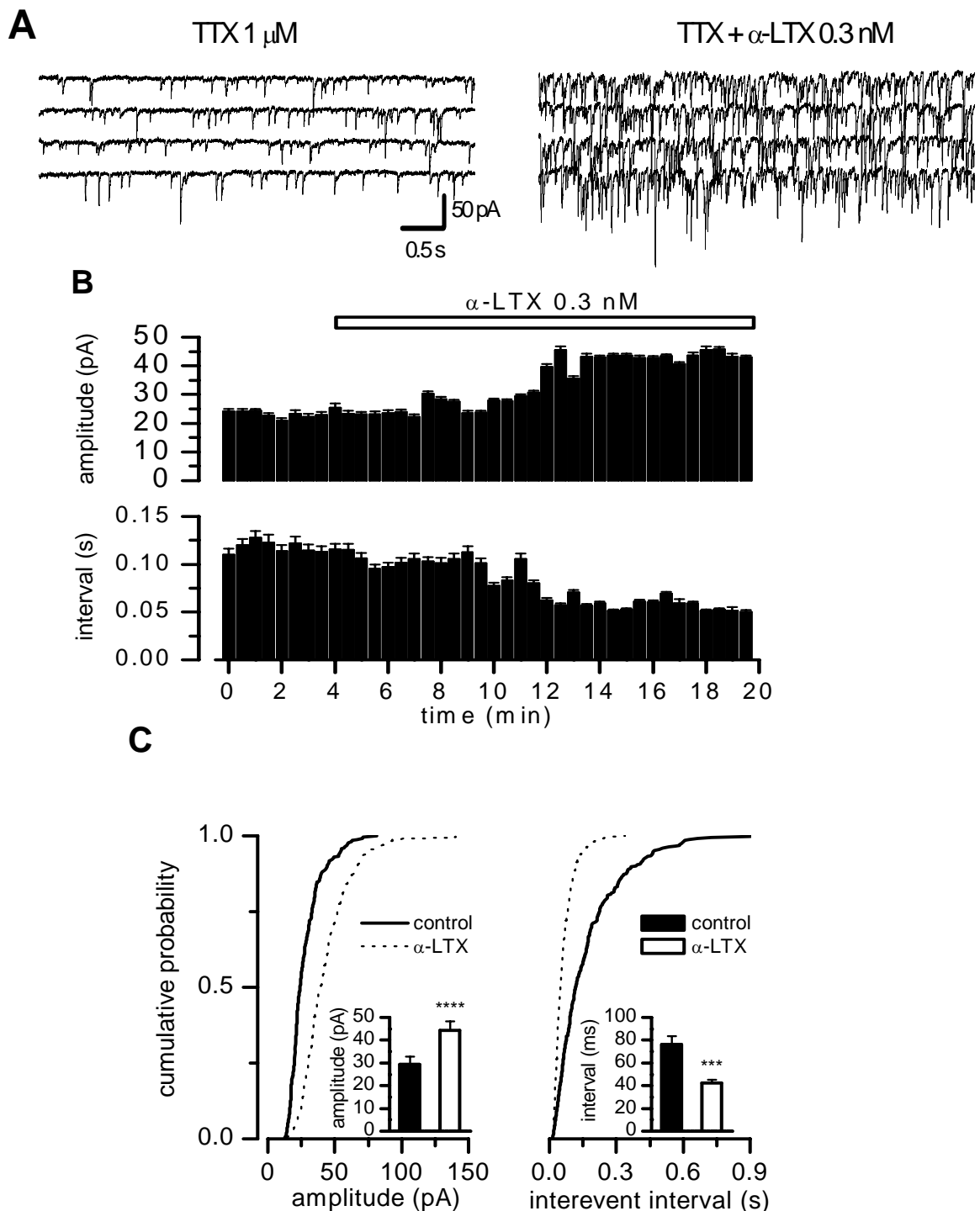


FIG 10 **A**: successive tracce delle mIPSCs registrate in continua presenza di TTX (1  $\mu$ M) e ionomicina (2  $\mu$ M), prima (in alto), durante (al centro) e dopo (in basso) la perfusione di 10  $\mu$ M di baclofen. **B**: il baclofen aumenta la distribuzione dell'intervallo tra gli eventi delle mIPSCs ( $P < 0.0001$ , KS-test), e riduce la loro ampiezza ( $P < 0.0005$ , KS-test) nella stessa cellula mostrata in A. Inoltre sono mostrati gli istogrammi (media  $\pm$  SE) dell'ampiezza delle mIPSCs (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) da un totale di 12 neuroni (\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.005$ , 2-tailed paired Student's  $t$ -test).

## ***Effetti dell'AP4 e del baclofen in presenza di Latrotossina***

Per capire se il meccanismo di inibizione presinaptica della trasmissione GABAergica mediata dai recettori GABA<sub>B</sub> coinvolgeva direttamente la machinery di rilascio sinaptico, nei successivi esperimenti è stata usata la  $\alpha$ -latrotossina ( $\alpha$ -LTX), il componente attivo del veleno della vedova nera. Questo peptide promuove il rilascio di vescicole di neurotrasmettitore indipendentemente dall'entrata di calcio (Capogna et al., 1996). La perfusione di  $\alpha$ -LTX (0.3 nM), in presenza di TTX, causa un significativo aumento della frequenza delle mIPSCs, associato ad un'aumento dell'ampiezza, e che raggiunge un plateau dopo 10-15 minuti di applicazione (FIG 11).

La perfusione in bagno di baclofen, in continua presenza di TTX e  $\alpha$ -LTX (0.3 nM) riduce la frequenza, e diminuisce l'ampiezza, delle mIPSCs (FIG 13). Quando gli stessi esperimenti sono stati ripetuti per indagare gli effetti della stimolazione della famiglia III dei recettori metabotropici del glutammato, è stato trovato che le correnti miniature erano insensibili all'applicazione dell'AP4 (FIG 12).



**FIG 11:** I recettori  $GABA_B$  inibiscono le mIPSCs indotte dalla  $\alpha$ -latrotossina. **A:** tracce delle mIPSCs registrate in continua presenza di TTX (1  $\mu$ M, sinistra) and TTX +  $\alpha$ -LTX (0.3 nM, destra). **B:** istogramma (media  $\pm$  SE; bin size 30 s) dell'ampiezza delle mIPSCs (in alto) e dell'intervallo tra gli eventi (in basso) della cellula A, che indica il time course dell'effetto della  $\alpha$ -LTX. **C:** distribuzione cumulativa dell'ampiezza (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) delle mIPSCs registrate dalla stessa cellula mostrata in A, in TTX (controllo) e in TTX + ionomicina ( $\alpha$ -LTX). In questa cellula, la  $\alpha$ -LTX riduce la distribuzione dell'intervallo tra gli eventi delle mIPSCs ( $P < 0.0001$ , KS-test), mentre aumenta la loro ampiezza ( $P < 0.0001$ , KS-test). Inoltre sono mostrati gli istogrammi (media  $\pm$  SE) dell'ampiezza delle mIPSCs (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) da un totale di 7 neuroni (\*\*\*)  $P < 0.005$ , \*\*\*\*  $P < 0.001$ , 2-tailed paired Student's  $t$ -test).

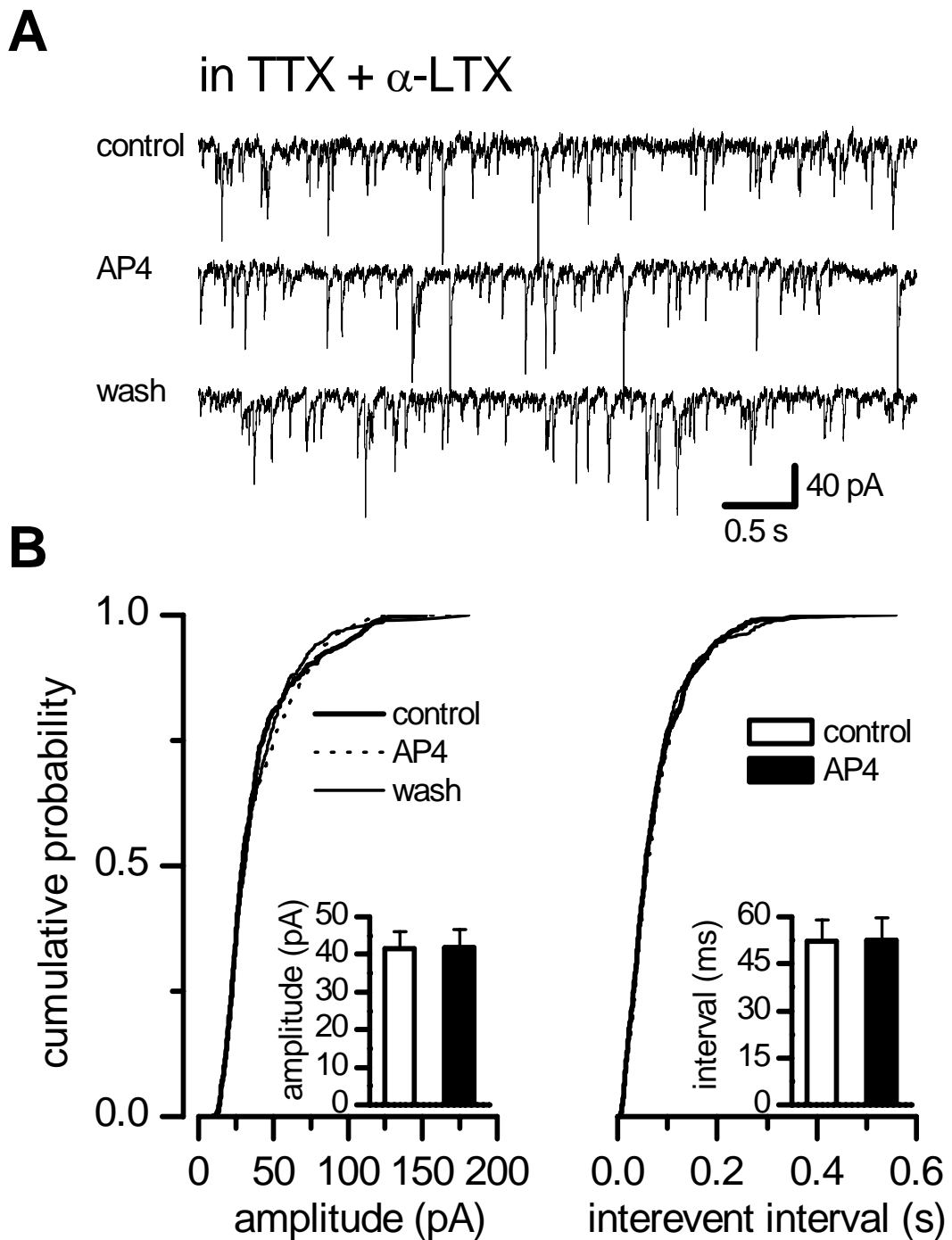


FIG 12: **A**: successive tracce delle mIPSCs registrate in continua presenza di TTX (1  $\mu$ M) e  $\alpha$ -LTX (0.3 nM), prima (in alto), durante (al centro) e dopo (in basso) la perfusione di 100  $\mu$ M di AP4. **B**: nella cellula mostrata in A, non ci sono cambiamenti significativi in seguito all'applicazione di AP4, nella distribuzione dell'intervallo tra gli eventi ( $P > 0.33$ , KS-test), e dell'ampiezza ( $P > 0.31$ , KS-test). Inoltre sono mostrati gli istogrammi (media  $\pm$  SE) dell'ampiezza delle mIPSCs (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) da un totale di 10 neuroni (\*\*  $P < 0.02$ , \*\*\*\*  $P < 0.001$ , 2-tailed paired Student's  $t$ -test).

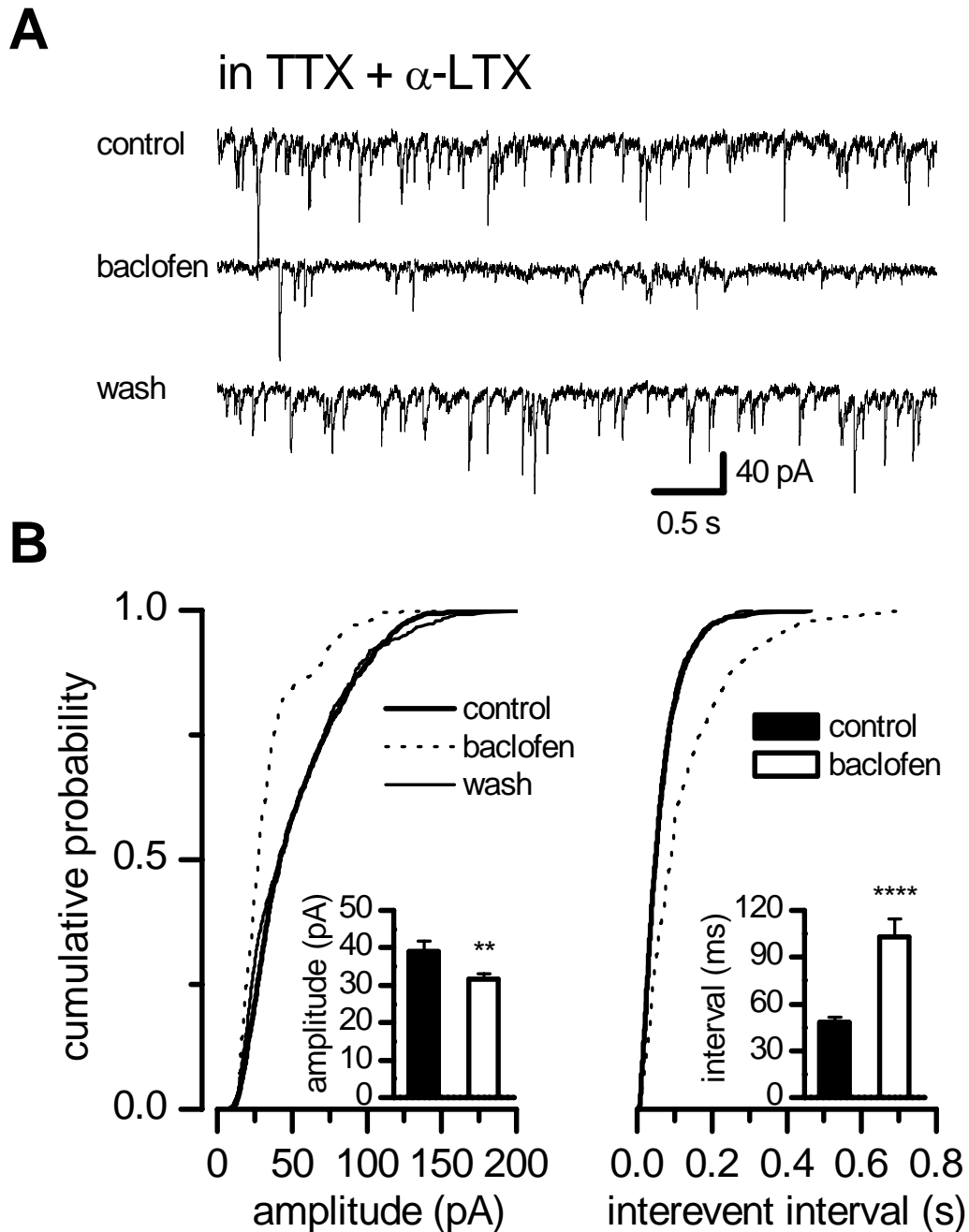


FIG 13 **A**: successive tracce delle mIPSCs registrate in continua presenza di TTX (1  $\mu$ M) e  $\alpha$ -LTX (0.3 nM), prima (in alto), durante (al centro) e dopo (in basso) la perfusione di 10  $\mu$ M di baclofen. **B**: il baclofen aumenta la distribuzione dell'intervallo tra gli eventi delle mIPSCs ( $P < 0.0001$ , KS-test), e riduce la loro ampiezza ( $P < 0.0001$ , KS-test) nella stessa cellula mostrata in A. Inoltre sono mostrati gli istogrammi (media  $\pm$  SE) dell'ampiezza delle mIPSCs (sinistra) e dell'intervallo tra gli eventi (destra) da un totale di 9 neuroni (\*\*  $P < 0.02$ , \*\*\*\*  $P < 0.001$ , 2-tailed paired Student's  $t$ -test).

## ***Il baclofen occlude l'effetto dell'AP4 sulle sIPSCs***

Le differenti proprietà dell'inibizione presinaptica mediata dai recettori mGluRs di tipo III e dai recettori GABA<sub>B</sub> suggerisce la coesistenza di due meccanismi separati di controllo di rilascio vescicolare all'interno delle stesse sinapsi GABAergiche. Alternativamente, distinti assoni GABAergici potrebbero essere soggetto di differenti modalità di inibizione presinaptica a seconda della presenza o meno di questi recettori. Nel nostro studio, è stato ipotizzato che, se i due meccanismi coesistono nella stessa sinapsi, qualsiasi forma di inibizione presinaptica dovuta alla modulazione dei canali del calcio voltaggio dipendenti da parte dell'AP4 dovrebbe risultare occlusa da una precedente applicazione del baclofen, data la sua azione a valle dell'entrata di calcio (FIG 14).

Per verificare questa ipotesi questi esperimenti sono stati condotti in assenza di TTX ma in presenza di BaCl<sub>2</sub> (1 mM), al fine di incrementare gli effetti mediati dall'AP4. In queste condizioni sperimentali, la perfusione con 10 μM di baclofen riduce la frequenza delle sIPSCs in modo statisticamente significativo. Questo effetto è inoltre associato ad una riduzione dell'ampiezza degli eventi. La susseguente perfusione dell'AP4, in continua presenza di baclofen, non produce un'ulteriore riduzione della frequenza e dell'ampiezza delle sIPSCs.



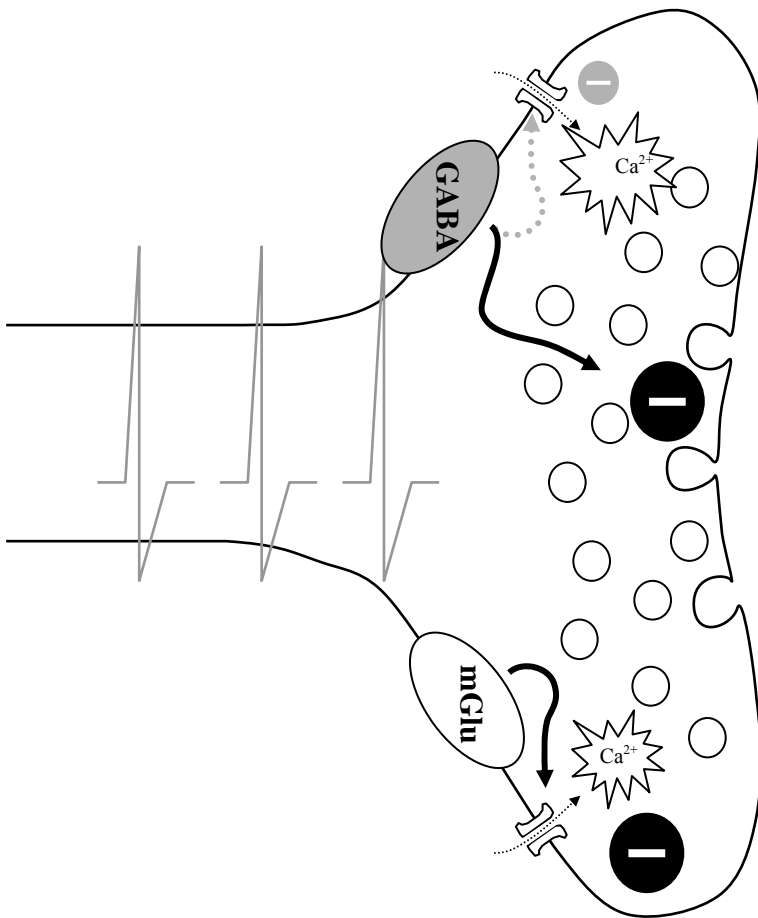


FIG 14: Illustrazione schematica del terminale GABAergico nella SNc. La sinapsi afferente GABAergica dei neuroni dopaminergici della SNc contiene sia i recettori mGluRs di tipo III sia i recettori GABA<sub>B</sub>. L'attivazione degli mGluRs porta ad una inibizione della neurotrasmissione riducendo esclusivamente la conduttanza dei canali del calcio voltaggio dipendenti presinaptici. Invece, l'inibizione presinaptica mediata dai recettori GABA<sub>B</sub> richiede il coinvolgimento delle vescicole sinaptiche.

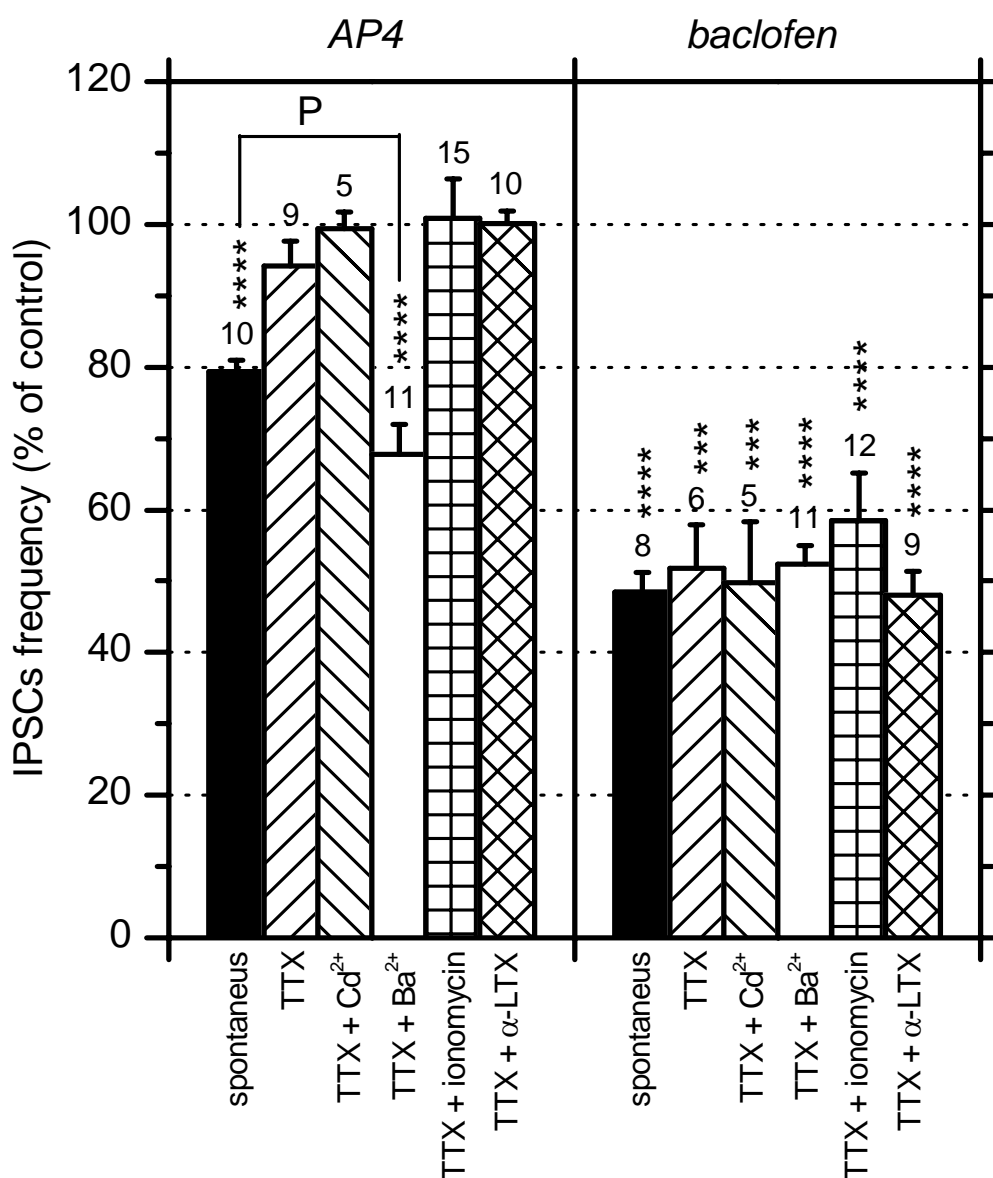


FIG 15: Istogramma riassuntivo. Valori normalizzati (medie  $\pm$  SE) della frequenza delle sIPSCs e della frequenza delle mIPSCs nelle differenti condizioni sperimentali, in risposta a 100  $\mu$ M di AP4 o a 10  $\mu$ M di baclofen. AP4 riduce la frequenza delle sIPSCs e delle mIPSCs in TTX e bario. Inoltre, il grado di inibizione della frequenza in TTX e bario è significativamente più alto di quello delle sIPSCs. In tutte le altre condizioni sperimentali, non ci sono cambiamenti significativi mediati dall'AP4 sulla frequenza delle mIPSCs. Al contrario il baclofen riduce significativamente la frequenza delle sIPSCs o delle mIPSCs in tutte le condizioni sperimentali. Il numero delle cellule registrate in ogni protocollo sperimentale è indicato sopra la rispettiva colonna. (\*\*\*)  $P < 0.005$ , \*\*\*\*  $P < 0.001$ , 2-tailed one population Student  $t$ -test;  $\Pi$   $P < 0.02$ , 2-tailed unpaired Student  $t$ -test).

# DISCUSSIONE

Lo studio di questa tesi dimostra l'esistenza di due meccanismi distinti di inibizione presinaptica nelle sinapsi GABAergiche dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta. Un meccanismo, attivato in risposta alla stimolazione dei recettori mGluRs di tipo III, consiste nell'inibizione dei VDCCs presinaptici. Il secondo, mediato dai recettori GABA<sub>B</sub>, richiede un diretto coinvolgimento della machinery di rilascio sinaptico.

L'azione inibitoria dell'AP4 o del baclofen potrebbe essere associata a cambiamenti dell'ampiezza degli eventi spontanei. Questo è stato osservato con il baclofen in presenza di bario, ionomicina e  $\alpha$ -latrotossina e con l'AP4 quando le mIPSCs sono state registrate in presenza di bario (FIG 15). Possiamo escludere che questi effetti siano dovuti a qualche forma di azione post sinaptica del baclofen o dell'AP4 perché nessuno di questi due agonisti interessa l'ampiezza delle mIPSCs in TTX e cadmio. In più, il rilascio di GABA si verifica da molteplici siti presenti in una stessa sinapsi; perciò in condizione di alta probabilità di rilascio, eventi multipli potrebbero sovrapporsi e generare eventi più ampi. Infatti, la media dell'ampiezza delle mIPSCs in TTX, o in TTX e cadmio, ha dei valori più bassi rispetto a quelli delle sIPSCs, indicando che gli eventi con un'ampiezza più grande sono dovuti ad un rilascio sinaptico dipendente dal potenziale d'azione. In accordo con queste ipotesi, il valore ridotto di questi eventi di ampiezza più grande è proporzionale al grado di riduzione della probabilità di rilascio mediato dai recettori mGluRs di tipo III o GABA<sub>B</sub>.

L'inibizione presinaptica mediata dai recettori mGluRs di tipo III è assente quando i VDCCs vengono bloccati dallo ione cadmio presente nella soluzione extracellulare, anche se vengono usate concentrazioni sopramassimali di AP4 (Bonci et al., 1997). Inoltre, quando le cellule vengono perfuse con il bario, al fine di aumentare il contributo dei VDCCs nel rilascio sinaptico, l'effetto inibitorio dell'AP4 sulla frequenza dei mIPSCs diviene più forte di quello osservato sulle sIPSCs. Oltretutto il rilascio di GABA, calcio-dipendente ma VDCCs-indipendente, indotto dalla ionomicina (Capogna et al., 1996) è insensibile all'AP4. Tutti questi risultati indicano che i mGluRs di tipo III

inibiscono il rilascio calcio-dipendente del GABA che segue all'invasione del terminale di un potenziale d'azione, riducendo esclusivamente la conduttanza dei canali del calcio voltaggio dipendenti presinaptici.

Al contrario, la stimolazione dei recettori GABA<sub>B</sub> risulta in una inibizione presinaptica del rilascio di GABA in tutte le condizioni sperimentali testate. In particolare, durante il blocco dei VDCCs da parte del bario, il grado dell'inibizione della frequenza delle mIPSCs mediata dal baclofen, è significativamente più piccola di quella osservata sulle correnti spontanee inibitorie post sinaptiche. Questo dato suggerisce che l'inibizione dei VDCCs contribuisce solo parzialmente all'effetto mediato dai recettori GABA<sub>B</sub>, e i meccanismi che sono a valle dell'entrata di calcio attraverso i VDCCs rappresentano il maggior contributo a questa forma di inibizione presinaptica. Infatti, il rilascio di neurotrasmettitore calcio-indipendente indotto dalla  $\alpha$ -latrotossina (Capogna et al., 1996) è significativamente inibito dal baclofen, e la riduzione della frequenza delle mIPSCs in presenza di questa tossina non è differente da quella osservata in presenza di cadmio. Questo risultato supporta l'ipotesi che nelle sinapsi studiate, i recettori GABA<sub>B</sub> inibiscono il rilascio di GABA principalmente interferendo con il processo esocitotico. Inoltre in questo lavoro è stato dimostrato che il baclofen riduce il rilascio spontaneo di GABA indotto dalla ionomicina, una riduzione della stessa entità di quella osservata in presenza di cadmio. Dato che la ionomicina induce un rilascio sinaptico calcio-dipendente ma VDCCs-indipendente, abbiamo ottenuto un'ulteriore prova a favore della diretta interazione dei recettori GABA<sub>B</sub> con la machinery che guida il rilascio di neurotrasmettitore. Questo tipo di meccanismo d'azione dei recettori GABA<sub>B</sub> presinaptici conferma le teorie espresse in un precedente lavoro sull'inibizione indotta dal baclofen delle mIPSCs cadmio-resistenti in colture embrionali di mesencefalo (Rohrbacher et al., 1997).

La parte finale dello studio di questa tesi si è incentrata sulla comprensione della localizzazione delle due famiglie di recettori nelle sinapsi dei neuroni dopaminergici di SNc.

Se i GABA<sub>B</sub> e gli mGluRs di tipo III fossero stati segregati in distinti input GABAergici, un coinvolgimento della machinery di rilascio vescicolare causata dai recettori GABA<sub>B</sub> non avrebbe interferito con l'inibizione mediata

dai recettori mGluRs di tipo III. Al contrario, se entrambi i recettori fossero stati presenti all'interno delle stesse sinapsi, l'inibizione della machinery esocitotica avrebbe occluso qualsiasi ulteriore effetto dovuto al blocco dei canali del calcio a valle dipendenti presinaptici. Quindi, in base ai risultati ottenuti, in cui il baclofen previene gli effetti inibitori dell'AP4, possiamo concludere che i due meccanismi di inibizione presinaptica coesistono nelle stesse sinapsi GABAergiche.

Molti degli otto sottogruppi clonati della famiglia dei recettori metabotropici del glutammato (Conn & Pin, 1997) sono distribuiti in tutte le aree dei gangli della base e regolano l'eccitabilità cellulare e la trasmissione sinaptica nelle sinapsi eccitatorie ed inibitorie (Rouse et al. 2000). Studi di immunostochimica e di ibridazione in situ hanno dimostrato la presenza del recettore mGluR7 della famiglia mGluRs di tipo III nei terminali presinaptici striatonigrali (Kosinski et al. 1999). Infatti l'alta concentrazione dell'AP4, agonista selettivo della famiglia di tipo III, usata negli esperimenti di questo lavoro per ottenere la risposta massimale, è indicativa di questo sottotipo di mGluR (Conn & Pin, 1997). Nelle proiezioni striatopallidali l'AP4 deprime la trasmissione GABAergica agendo presinapticamente sul recettore mGluR4, appartenente sempre alla famiglia di tipo III (Valenti et al. 2003). In quest'area anche le mIPSC sono depresse dall'AP4, suggerendo che differenti sottotipi della stessa famiglia di recettori utilizza differenti meccanismi d'azione per deprimere la neurotrasmissione.

In diversi lavori è stato dimostrato che i recettori GABA<sub>B</sub> inibiscono la trasmissione nervosa nelle sinapsi del sistema nervoso centrale utilizzando entrambi i meccanismi di riduzione della conduttanza dei VDCCs (Wu & Saggau, 1995; Isaacson, 1998; Takahashi et al. 1998; Chen & van den Pol, 1998) e di inibizione della machinery di rilascio vescicolare (Scanziani et al. 1992; Kolaj et al. 2004; Sakaba & Neher, 2003). Nel cervelletto i recettori GABA<sub>B</sub> deprimono la trasmissione sinaptica attraverso meccanismi calcio-dipendenti e calcio-indipendenti, con un coinvolgimento dei VDCCs del 70-90% (Dittman & Regehr, 1996). Nello studio di questa tesi sulle sinapsi GABAergiche della SNc viene dimostrato che la maggior parte dell'inibizione presinaptica mediata dai GABA<sub>B</sub> avviene attraverso il diretto coinvolgimento del rilascio esocitotico, dato il confronto tra il grado di riduzione della

frequenza delle sIPSCs e delle mIPSCs (in TTX e in cadmio), con una ratio di 1/3 contro 2/3 a favore di processi VDCCs indipendenti. Inoltre se si considera il fatto che questo modello potrebbe sottostimare il relativo contributo dell'inibizione della machinery di rilascio (Wu & Saggau, 1997), l'esistenza di due meccanismi d'azione distinti mediati dagli mGluR e dai GABA<sub>B</sub> in queste sinapsi diviene ancora più evidente.

### ***Considerazioni funzionali***

Se si prende in considerazione l'intera circuiteria neuronale, piuttosto che le singole risposte sinaptiche, si può arrivare ad alcune considerazioni funzionali in base al tipo di meccanismo di inibizione presinaptica coinvolto. Innanzitutto, l'efficacia dell'inibizione presinaptica che coinvolge i VDCCs dipende dalle proprietà biofisiche del tipo di canale del calcio espresso nel terminale. Inoltre, i VDCCs presinaptici sono soggetti ad inibizione voltaggio-dipendente o mediata da proteine G (Brody & Yue, 2000), quindi l'efficacia di questo tipo di inibizione presinaptica è strettamente dipendente sia dal livello di polarizzazione del terminale, sia dall'attività di firing presinaptico (Brody et al. 1997; Reid et al. 2003). Al contrario, il meccanismo di inibizione presinaptica che coinvolge direttamente la machinery di rilascio è indipendente dal livello di attività presinaptica. Tutto ciò causa una parallela inibizione di segnali codificati attivamente generati da input afferenti e da segnali casualmente generati dalla fusione passiva di vescicole con la membrana presinaptica. Inoltre, nelle sinapsi GABAergiche, l'inibizione del rilascio spontaneo di trasmettitore, può ridurre l'attivazione tonica dei recettori postsinaptici, modificando il processamento delle informazioni nervose e interferendo sull'eccitabilità delle vie neuronali (Semyanov et al. 2004). Perciò i recettori presinaptici GABA<sub>B</sub> e mGluRs di tipo III potrebbero differenzialmente modulare gli input GABAergici dei neuroni dopaminergici della SNc. L'attività di firing dei neuroni dopaminergici mesencefalici, e il conseguente rilascio di dopamina, è altamente sensibile all'inibizione tonica svolta dalle afferenze GABAergiche (Paladini et al. 1999; Celada et al. 1999; Paladini &

Tepper, 1999). Perciò, mentre i recettori GABA<sub>B</sub> potrebbero esercitare un'auto-inibizione a feed back delle risposte GABAergiche, la stimolazione dei recettori mGluRs di tipo III da parte di un'afferenza glutamatergica potrebbe selettivamente deprimere segnali attivamente generati. In più, specifici codici dei segnali GABAergici potrebbero mostrare differenti sensibilità a questa forma di etero-inibizione mediata dal glutammato.

Per questa ragione, la caratterizzazione dell'inibizione presinaptica mediata dagli mGluRs di tipo III, in relazione a quella mediata dai GABA<sub>B</sub>, fornisce nuove conoscenze sul ruolo di questi recettori nel processamento delle informazioni che passano attraverso la sostanza nera, e apre nuove prospettive sul potenziale uso di questi recettori come target di trattamenti farmacologici di malattie neurodegenerative (Rouse et al. 2000; Valenti et al. 2003).

# BIBLIOGRAFIA

- Alexander GE & Crutcher MD (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* **13(7)**: 266-71.
- Andén NE, Hfuxe K, Hamberger B, Hokfelt T (1966). A quantitative study on the nigro-neostriatal dopamine neuron system in the rat. *Acta Physiol Scand* **67(3)**: 306-12.
- Augustin I, Betz A, Herrmann C, Jo T, Brose N (1999). Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain. *Biochem J* **337 ( Pt 3)**: 363-71.
- Augustine GJ (2001). How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol* **11(3)**: 320-6.
- Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ (1985). Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. *J Physiol* **367**: 163-81.
- Bean BP (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* **8(6)**: 451-65.
- Beninato M & Spencer RF (1987). A cholinergic projection to the rat substantia nigra from the pedunculo-pontine tegmental nucleus. *Brain Res* **412(1)**: 169-74.
- Bennett MK, Calakos N, Scheller RH (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* **257(5067)**: 255-9.
- Berretta N, Bernardi G, Mercuri NB (2000). Alpha(1)-adrenoceptor-mediated excitation of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience* **98(3)**:599-604.
- Berretta N, Jones RS (1996). Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex. *Neuroscience* **75(2)**:339-44.



- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* **84(3)**: 835-67.
- Bjorklund A, Ehinger B, Falck B (1968). A possibility for differentiating dopamine from noradrenaline in tissue sections by microspectrofluorometry. *Acta Physiol Scand* **72(1)**: 253-4.
- Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, Sudhof TC, Niemann H, Jahn R (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* **365(6442)** :160-3. Comment in: *Nature* **365(6442)**: 104-5.
- Bolam JP & Smith Y (1990). The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res* **529(1-2)**: 57-78.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* **196 ( Pt 4)**: 527-42.
- Bole DG, Hirata K, Ueda T (2002). Prolonged depolarization of rat cerebral synaptosomes leads to an increase in vesicular glutamate content. *Neurosci Lett* **322(1)**: 17-20.
- Bonci A, Bernardi G, Grillner P, Mercuri NB (2003). The dopamine-containing neuron: maestro or simple musician in the orchestra of addiction? *Trends Pharmacol Sci* **24(4)**: 172-7.
- Bonci A, Grillner P, Siniscalchi A, Mercuri NB, Bernardi G (1997). Glutamate metabotropic receptor agonists depress excitatory and inhibitory transmission on rat mesencephalic principal neurons. *Eur J Neurosci* **9(11)**: 2359-69.
- Borst JG, Helmchen F, Sakmann B (1995). Pre- and postsynaptic whole-cell recordings in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Physiol* **489 ( Pt 3)**:825-40.

- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B)receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* **54(2)**: 247-64.
- Boyd IA e Martin AR (1956).The end-plate potential in mammalian muscle. *J Physiol* **132(1)**:74-91.
- Boyes J & Bolam JP (2007). Localization of GABA receptors in the basal ganglia. *Prog Brain Res* **160**: 229-43.
- Bradley SR, Marino MJ, Wittmann M, Rouse ST, Awad H, Levey AI, Conn PJ (2000). Activation of group II metabotropic glutamate receptors inhibits synaptic excitation of the substantia Nigra pars reticulata. *J Neurosci* **20(9)**:3085-94.
- Brody DL & Yue DT (2000). Relief of G-protein inhibition of calcium channels and short-term synaptic facilitation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**: 889-98.
- Brody DL, Patil PG, Mulle JG, Snutch TP & Yue DT (1997). Bursts of action potential waveforms relieve G-protein inhibition of recombinant P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in HEK 293 cells. *J Physiol* **499**: 637-44.
- Bunney BS & Aghajanian GK (1976). Dopaminergic influence in the basal ganglia: evidence for striatonigral feedback regulation. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **55**: 249-67.
- Burgoyne RD & Alvarez de Toledo G (2000). Fusion proteins and fusion pores. Workshop: regulated exocytosis and the vesicle cycle. *EMBO Rep* **1(4)**: 304-7.
- Burnashev N & Rozov A (2005). Presynaptic Ca<sup>2+</sup> dynamics, Ca<sup>2+</sup> buffers and synaptic efficacy. *Cell Calcium* **37(5)**: 489-95.
- Calabresi P, Mercuri NB, Bernardi G (1992). Activation of quisqualate metabotropic receptors reduces glutamate and GABA-mediated synaptic potentials in the rat striatum. *Neurosci Lett* **139(1)**: 41-4.

- Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM (1996). Calcium-independent actions of alpha-latrotoxin on spontaneous and evoked synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurophysiol* **76**(5): 3149-58.
- Carlsson A & Waldeck B (1958). A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol Scand* **44**(3-4): 293-8.
- Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 521-55.
- Ceccarelli B, Hurlbut WP, Mauro A (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57**(2): 499-524.
- Ceccarelli & Hurlbut (1980). Vesicle hypothesis of the release of quanta of acetylcholine. *Physiological reviews* **60** : 396-441
- Celada P, Paladini CA & Tepper JM (1999). GABAergic control of rat substantia nigra dopaminergic neurons: role of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* **89**: 813-25.
- Celada P, Paladini CA, Tepper JM (1999). GABAergic control of rat substantia nigra dopaminergic neurons: role of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* **89**(3):813-25.
- Chan PK, Leung CK, Yung WH (1998). Differential expression of pre- and postsynaptic GABA(B) receptors in rat substantia nigra pars reticulata neurones. *Eur J Pharmacol* **349**(2-3): 187-97.
- Chapman ER (2002). Synaptotagmin: a Ca<sup>2+</sup> sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(7): 498-508.
- Chen G & van den Pol AN (1998). Presynaptic GABAB autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci* **18**: 1913-22.

- Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, Barnes JM, Collingridge GL, Henley JM (2001). Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Neuron* **32**(4):697-709.
- Conn PJ & Pin JP (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 205-37.
- Conn PJ, Battaglia G, Marino MJ, Nicoletti F (2005). Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nat Rev Neurosci* **6**(10): 787-98.
- Dale N & Kandel ER (1990). Facilitatory and inhibitory transmitters modulate spontaneous transmitter release at cultured *Aplysia* sensorimotor synapses. *J Physiol* **421**: 203-22.
- Del Castillo J. & Katz B. (1954).quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* **124**: 560-573.
- Dittman JS & Regehr WG (1996). Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J Neurosci* **16**: 1623-33.
- Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED (2001). The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci* **58**(1): 94-116..
- Dudel J & Kuffler SW (1961). Mechanism of facilitation at the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol* **155**: 530-42.
- Eccles JC, Schmidt R, Willis WD (1963). Pharmacological studies on presynaptic inhibition. *J Physiol* **168**: 500-30.
- Edwards RH (2007). The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* **55**(6): 835-58.
- Fedchyshyn MJ & Wang LY (2005).Developmental transformation of the release modality at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* **25**(16): 4131-40.

- Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempf U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC (2000). Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* **25(1)**: 203-14.
- Fernandez-Chacon R, Shin OH, Konigstorfer A, Matos MF, Meyer AC, Garcia J, Gerber SH, Rizo J, Sudhof TC, Rosenmund C (2001). Structure/function analysis of Ca<sup>2+</sup> binding to the C2A domain of synaptotagmin 1. *J Neurosci* **22(19)**: 8438-46.
- Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, Meldolesi J (1994). Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol* **4(1)**: 1-4.
- Fogelson AL & Zucker RS (1985). Presynaptic calcium diffusion from various arrays of single channels. Implications for transmitter release and synaptic facilitation. *Biophys J* **48(6)**: 1003-17.
- Fossier P, Baux G, Trudeau LE, Tauc L (1992). Involvement of Ca<sup>2+</sup> uptake by a reticulum-like store in the control of transmitter release. *Neuroscience* **50(2)**: 427-34.
- Fu WM & Liu JJ (1997). Regulation of acetylcholine release by presynaptic nicotinic receptors at developing neuromuscular synapses. *Mol Pharmacol* **51(3)**: 390-8.
- Galvan A, Kuwajima M, Smith Y (2006). Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? *Neuroscience* **143(2)**: 351-75.
- Garcia EP, McPherson PS, Chilcote TJ, Takei K, De Camilli P (1995). rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *J Cell Biol* **129(1)**: 105-20.
- Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED (2000). Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr Opin Neurobiol* **10(3)**: 321-7.
- Geiger JR & Jonas P (2000). Dynamic control of presynaptic Ca<sup>2+</sup> inflow by fast-inactivating K<sup>(+)</sup> channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* **28(3)**: 927-39.

- Giustizieri M, Bernardi G, Mercuri NB, Berretta N (2005). Distinct mechanisms of presynaptic inhibition at GABAergic synapses of the rat substantia nigra pars compacta. *J Neurophysiol* **94**(3): 1992-2003
- Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* **383**(6602):713-6.
- Grenhoff J, North RA, Johnson SW (1995). Alpha 1-adrenergic effects on dopamine neurons recorded intracellularly in the rat midbrain slice. *Eur J Neurosci* **7**(8): 1707-13.
- Grenhoff J, Ugedo L, Svensson TH (1988). Firing patterns of midbrain dopamine neurons: differences between A9 and A10 cells. *Acta Physiol Scand* **134**(1): 127-32.
- Grillner P & Mercuri NB (2002). Intrinsic membrane properties and synaptic inputs regulating the firing activity of the dopamine neurons. *Behav Brain Res* **130**(1-2): 149-69.
- Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* **90**(3): 523-35.
- Harlow ML, Ress D, Stoschek A, Marshall RM, McMahan UJ (2001). The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature* **409**(6819): 479-84.
- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Sudhof TC, Niemann H (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* **13**(21): 5051-61.
- Haydon PG (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* **2**(3): 185-93.
- Henzi V, MacDermott AB (1992). Characteristics and function of Ca(2+)- and inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable stores of Ca<sup>2+</sup> in neurons. *Neuroscience* **46**(2):251-73.

- Heuser JE & Reese TS (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57(2)**: 315-44.
- Hille B (1994). Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* **17(12)**: 531-6.
- Holtzman E, Freeman AR, Kashner LA (1971). Stimulation-dependent alterations in peroxidase uptake at lobster neuromuscular in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurophysiol* **85(5)**: 1960-8.
- Isaacson JS (1998). GABAB receptor-mediated modulation of presynaptic currents and excitatory transmission at a fast central synapse. *J Neurophysiol* **80**: 1571-6.
- Jarvis SE & Zamponi GW (2001). Interactions between presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. *Trends Pharmacol Sci* **22(10)**: 519-25.
- Kandel ER & Schwartz JH (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* **218(4571)**: 433-43.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2000). Principles of Neural Science:4th edition, New York.
- Kimura M, Saitoh N, Takahashi T (2003). Adenosine A(1) receptor-mediated presynaptic inhibition at the calyx of Held of immature rats. *J Physiol* **553(Pt 2)**: 415-26
- Kolaj M, Bai D & Renaud LP (2004). GABAB receptor modulation of rapid inhibitory and excitatory neurotransmission from subfornical organ and other afferents to median preoptic nucleus neurons. *J Neurophysiol* **92**: 111-22.
- Kosinski CM, Risso Bradley S, Conn PJ, Levey AI, Landwehrmeyer GB, Penney JB Jr, Young AB & Standaert DG (1999). Localization of metabotropic glutamate receptor 7 mRNA and mGluR7a protein in the rat basal ganglia. *J Comp Neurol* **415**: 266-84.

- Lacey CJ, Boyes J, Gerlach O, Chen L, Magill PJ, Bolam JP (2005). GABA(B) receptors at glutamatergic synapses in the rat striatum. *Neuroscience* **136(4)**: 1083-95
- Lauri SE, Bortolotto ZA, Bleakman D, Ornstein PL, Lodge D, Isaac JT, Collingridge GL (1996). A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Nature* **379(6560)**:78-81.
- Lee WL, Anwyl R, Rowan M (1987). Caffeine inhibits post-tetanic potentiation but does not alter long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Brain Res* **426(2)**:250-6.
- Léna C, Changeux JP (1997). Role of Ca<sup>2+</sup> ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. *J Neurosci* **17(2)**:576-85.
- Lindvall O, Bjorklund A, Skagerberg G (1984). Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* **306(1-2)**: 19-30.
- Linial M, Ilouz N, Parnas H (1997). Voltage-dependent interaction between the muscarinic ACh receptor and proteins of the exocytic machinery. *J Physiol* **504 ( Pt 2)**: 251-8.
- Lisman JE, Raghavachari S, Tsien RW (2007). The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat Rev Neurosci* **8(8)**: 597-609.
- Llinas R, Steinberg IZ, Walton K (1985). Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* **33(3)**: 323-51.
- Llinas R, Sugimori M, Silver RB (1992). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* **256(5057)**: 677-9.
- MacDermott AB, Role LW, Siegelbaum SA (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci* **22**: 443-85.



- Man-Son-Hing H, Zoran MJ, Lukowiak K, Haydon PG (1989). A neuromodulator of synaptic transmission acts on the secretory apparatus as well as on ion channels. *Nature* **341(6239)**: 237-9.
- Marino MJ, Valenti O, Conn PJ (2003). Glutamate receptors and Parkinson's disease: opportunities for intervention. *Drugs Aging* **20(5)**: 377-97.
- Marshall FH, Jones KA, Kaupmann K, Bettler B (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* **20(10)**: 396-9.
- Matthews G (1996). Neurotransmitter release. *Annu Rev Neurosci* **19**: 219-33.
- Mercuri NB, Stratta F, Calabresi P, Bonci A, Bernardi G (1993). Activation of metabotropic glutamate receptors induces an inward current in rat dopamine mesencephalic neurons. *Neuroscience* **56(2)**: 399-407.
- Mink JW & Thach WT (1993). Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. *Curr Opin Neurobiol* **3(6)**: 950-7.
- Mochida S, Sheng ZH, Baker C, Kobayashi H, Catterall WA (1996). Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* **17(4)**: 781-8.
- Mochida S, Yokoyama CT, Kim DK, Itoh K, Catterall WA (1998). Evidence for a voltage-dependent enhancement of neurotransmitter release mediated via the synaptic protein interaction site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95(24)**: 14523-8.
- Murthy VN & De Camilli P (2003). Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* **26**: 701-28.
- Neher E & Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260(5554)**: 799-802.

- Neher E (1998). Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20(3)**: 389-99.
- Paladini CA & Tepper JM (1999). GABA(A) and GABA(B) antagonists differentially affect the firing pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Synapse* **32**: 165-76.
- Paladini CA, Celada P & Tepper JM (1999). Striatal, pallidal, and pars reticulata evoked inhibition of nigrostriatal dopaminergic neurons is mediated by GABA(A) receptors in vivo. *Neuroscience* **89**: 799-812.
- Palfrey HC & Artalejo CR (1998). Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step. *Neuroscience* **83(4)**: 969-89.
- Parnas H, Parnas I, Ravin R, Yudelevitch B (1994). Glutamate and N-methyl-D-aspartate affect release from crayfish axon terminals in a voltage-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91(24)**: 11586-90.
- Parnas H, Segel L, Dudel J, Parnas I (2000). Autoreceptors, membrane potential and the regulation of transmitter release. *Trends Neurosci* **23(2)**: 60-8.
- Parnas I, Dudel J, Parnas H, Ravin R (1996). Glutamate depresses release by activating non-conventional glutamate receptors at crayfish nerve terminals. *Eur J Neurosci* **8(1)**: 116-26.
- Pisani A, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G (1997). Activation of group III metabotropic glutamate receptors depresses glutamatergic transmission at corticostriatal synapse. *Neuropharmacology* **36(6)**: 845-51.
- Pothos EN, Mosharov E, Liu KP, Setlik W, Haburcak M, Baldini G, Gershon MD, Tamir H, Sulzer D (2002). Stimulation-dependent regulation of the pH, volume and quantal size of bovine and rodent secretory vesicles. *J Physiol* **542(Pt 2)**: 453-76.

- RC, Sudhof TC (2002). RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* **415(6869)** :321-6. Comment in: *Nature* **415(6869)**: 277-8.
- Reid CA, Bekkers JM & Clements JD (2003). Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci* **26**: 683-7.
- Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, McMahon HT, Sudhof TC, Brose N, Rosenmund C (2001). Complexins regulate a late step in Ca<sup>2+</sup>-dependent neurotransmitter release. *Cell* **104(1)**: 71-81.
- Richmond JE, Weimer RM, Jorgensen EM (2001). An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature* **412(6844)**: 338-41.
- Robinson PJ, Liu JP, Powell KA, Fykse EM, Sudhof TC (1994). Phosphorylation of dynamin I and synaptic-vesicle recycling. *Trends Neurosci* **17(8)**: 348-53.
- Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Charlton MP (1993). Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* **11(4)**: 645-55.
- Roche JP & Treistman SN (1998). Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit enhances voltage-dependent relief of G-protein inhibition induced by muscarinic receptor activation and Gbetagamma. *J Neurosci* **18(13)**: 4883-90.
- Rohrbacher J, Jarolimek W, Lewen A & Misgeld U (1997). GABAB receptor-mediated inhibition of spontaneous inhibitory synaptic currents in rat midbrain culture. *J Physiol* **500**: 739-49.
- Roos J & Kelly RB (1999). The endocytic machinery in nerve terminals surrounds sites of exocytosis. *Curr Biol* **9(23)**: 1411-4.

- Rouse ST, Marino MJ, Bradley SR, Awad H, Wittmann M & Conn PJ (2000). Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson's disease and related disorders. *Pharmacol Ther* **88**: 427-35.
- Sakaba T & Neher E (2003). Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* **424**: 775-8.
- Scanziani M, Gahwiler BH & Thompson SM (1995). Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by muscarinic and metabotropic glutamate receptor activation in the hippocampus: are Ca<sup>2+</sup> channels involved? *Neuropharmacology* **34**: 1549-57.
- Schekman R (2002). Lasker Basic Medical Research Award. SEC mutants and the secretory apparatus. *Nat Med* **8(10)**: 1055-8.
- Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, Schmitz F, Malenka RC, Sadhof TC (2002). RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* **415(6869)**: 321-6. Comment in: *Nature* **415(6869)**: 277-8.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM & Silver RA (2004). Tonicly active GABA(A) receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* **27**, 262-9.
- Sheng ZH, Yokoyama CT, Catterall WA (1997). Interaction of the synprint site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94(10)**: 5405-10.
- Silinsky EM (1985). The biophysical pharmacology of calcium-dependent acetylcholine secretion. *Pharmacol Rev* **37(1)**: 81-132.
- Slutsky I, Parnas H, Parnas I (1999). Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* **514 ( Pt 3)**: 769-82.

- Smith SJ & Augustine GJ (1998). Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci* **11(10)**: 458-64.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* **86(2)**: 353-87
- Spafford JD & Zamponi GW (2003). Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Curr Opin Neurobiol* **13(3)**: 308-14.
- Stanford IM & Lacey MG (1996). Electrophysiological investigation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* **74(2)**: 499-509.
- Steinert JR, Kuromi H, Hellwig A, Knirr M, Wyatt AW, Kidokoro Y, Schuster CM (2006). Experience-dependent formation and recruitment of large vesicles from reserve pool. *Neuron* **50(5)**: 723-33.
- Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle (2004). *Annu Rev Neurosci* **27**:509-47.
- Surmeier, D.J. (2006) Microcircuits in the striatum: Cell types, intrinsic properties and Neuromodulation. In: Grillner S. and Graybiel A.M. (Eds.), *Microcircuits — The Interface Between Neurons and Global Brain Function*. MIT Press, Cambridge, pp. 105–112.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395(6700)** :347-53. Comment in: *Nature* **395(6700)**: 328-9.
- Takahashi T (2005). Dynamic aspects of presynaptic calcium currents mediating synaptic transmission. *Cell Calcium* **37(5)**: 507-11

- Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K (1996). Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* **274(5287)**: 594-7.
- Takahashi T, Kajikawa Y & Tsujimoto T (1998). G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABAB receptor. *J Neurosci* **18**: 3138-46.
- Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N, Shigemoto R (2001). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS:differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience* **106(3)**: 481-503.
- Tepper JM, Abercrombie ED, Bolam JP (2007). Basal ganglia macrocircuits. *Prog Brain Res* **160**: 3-7.
- Tepper JM, Lee CR (2007). GABAergic control of substantia nigra dopaminergic neurons. *Prog Brain Res* **160**: 189-208.
- tom Dieck S, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kampf U, Franzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED (1998). Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* **142(2)**: 499-509
- Valenti O, Mannaioni G, Seabrook GR, Conn PJ, Marino MJ (2005). Group III metabotropic glutamate-receptor-mediated modulation of excitatory transmission in rodent substantia nigra pars compacta dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **313(3)**: 1296-304
- Valenti O, Marino MJ, Wittmann M, Lis E, DiLella AG, Kinney GG & Conn PJ (2003). Group III metabotropic glutamate receptor-mediated modulation of the striatopallidal synapse. *J Neurosci* **23**: 7218-26.

- Van Bockstaele EJ, Biswas A, Pickel VM (1993). Topography of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus that send axon collaterals to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res* **624(1-2)**: 188-98.
- Van der Kloot W, Molgó J (1994). Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev* **74(4)**:899-991.
- Vidal C, Changeux JP (1993). Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro. *Neuroscience* **56(1)**:23-32.
- Volynski KE, Capogna M, Ashton AC, Thomson D, Orlova EV, Manser CF, Ribchester RR, Ushkaryov YA (2003). Mutant alpha-latrotoxin (LTXN4C) does not form pores and causes secretion by receptor stimulation: this action does not require neurexins. *J Biol Chem* **278(33)**:31058-66.
- Wang X, Kibschull M, Laue MM, Lichte B, Petrasch-Parwez E, Kilimann MW. J (1999). Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin. *Cell Biol* **147(1)**: 151-62.
- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Sadhof TC (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* **388(6642)**: 593-8.
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sallner TH, Rothman JE (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92(6)**: 759-72.
- Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA (1998). Localization of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* **18(16)**: 6319-30.
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994). Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* **264(5155)** :107-11. Comment in: *Science* **266(5186)**: 828-31.

- Wilson JS & Wilson JA (1985). Baclofen attenuates hyperpolarizing not depolarizing responses of caudate neurons in cat. *Brain Res* **342(2)**: 396-400.
- Wittmann M, Marino MJ, Bradley SR, Conn PJ (2001). Activation of group III mGluRs inhibits GABAergic and glutamatergic transmission. *J Neurophysiol* **85(5)**: 1960-8.
- Wu LG & Saggau P (1995). GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx. *J Physiol* **485**: 649-57.
- Wu LG & Saggau P (1997). Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* **20**: 204-12.
- Zamponi GW (2003). Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci* **92(2)**: 79-83.