

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**



Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca

in

Biotechnologie Mediche e Medicina Molecolare

XXII ciclo

**MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI BDNF
NELLA LINEA CELLULARE UMANA DI GLIOBLASTOMA
DA PARTE DELLA PAROXETINA**

DOTTORANDA: dr.ssa Nicoletta Croce

DOCENTE GUIDA/TUTOR: Prof. Sergio Bernardini

COORDINATORE: Prof. Giorgio Federici

Anno Accademico: 2009/2010

INDICE

INTRODUZIONE	1
1.1 Le neurotrofine	1
1.2 Produzione delle neurotrofine	2
1.3 I recettori delle neurotrofine	4
1.4 Trasduzione del segnale attraverso i recettori Trk e p75.....	8
1.5 Trasporto retrogrado ed anterogrado	12
1.6 Caratteristiche generali di BDNF	14
1.7 Il gene <i>BDNF</i>	18
1.8 Regolazione fine dell'espressione di BDNF: i microRNA come inibitori post-trascrizionali	20
1.9 BDNF nelle patologie del sistema nervoso centrale	22
1.10 Farmaci antidepressivi e loro azione su BDNF	25
1.11 Un inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina: la paroxetina.....	27
SCOPO DELLA TESI	29
MATERIALI E METODI	31
3.1 Colture cellulari.....	31
3.2 Saggio di citotossicità MTS su U-87 MG trattate con paroxetina	31
3.3 Trattamento farmacologico	32
3.4 Estrazione dell'RNA dalle cellule	33
3.5 Analisi dell'RNA utilizzando lo spettrofotometro e verifica della sua integrità tramite corsa su gel d'agarosio	34
3.6 Retrotrascrizione dell'RNA cellulare	35
3.7 PCR Real-Time su mRNA e microRNA	36
3.8 Saggio ELISA.....	40
RISULTATI	42
4.1 Scelta dell'intervallo di tempo del trattamento farmacologico	42
4.2 Scelta della concentrazione del farmaco.....	42
4.3 Effetti della paroxetina sulla crescita cellulare	43
4.4 Espressione di BDNF dopo trattamento con paroxetina	44
4.5 Effetti della paroxetina sull'espressione del miR che regola BDNF	45
4.6 Produzione e rilascio di BDNF dopo trattamento con paroxetina	46
DISCUSSIONE	49
BIBLIOGRAFIA	52

INTRODUZIONE

1.1 Le neurotrofine

Durante i primi anni '50 una scoperta fortuita aprì un nuovo e fondamentale campo d'indagine della biologia. Studi condotti da Rita Levi Montalcini e collaboratori sul sistema nervoso di topo e sulle cellule di un tumore chiamato Sarcoma 180, condussero alla scoperta che queste cellule tumorali sintetizzano e rilasciano una proteina che svolge un ruolo essenziale nel differenziamento e nella funzionalità di due specie di cellule sensitive e simpatiche (Levi-Montalcini R., Hamburger V., 1953; Cohen S. et al., 1954). Questa molecola venne denominata "fattore di crescita del nervo" (NGF – "Nerve Growth Factor") ed è considerata il prototipo dell'intera famiglia delle neurotrofine (NT). In seguito furono intrapresi diversi studi finalizzati ad isolare altre proteine strutturalmente e funzionalmente correlate all'NGF. Agli inizi degli anni '80 Barde e collaboratori riuscirono ad isolare dal cervello di maiale un fattore proteico con un'alta omologia di sequenza con l'NGF, chiamato "fattore neurotrofico derivato dal cervello" (BDNF – "Brain-Derived Neurotrophic Factor"). (Barde Y.A. et al., 1982; Leibrock J. et al., 1989). Successivamente la ricerca in questa direzione riuscì ad isolare numerosi altri componenti delle NT riguardanti i mammiferi, inclusa la neurotrofina 3 (NT-3) (Ernfors P. et al., 1990; Hohn A., 1990; Jones K.R. and Reichardt L.F., 1990; Maisonpierre P.C. et al., 1990) e la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Barde Y.A., 1990).

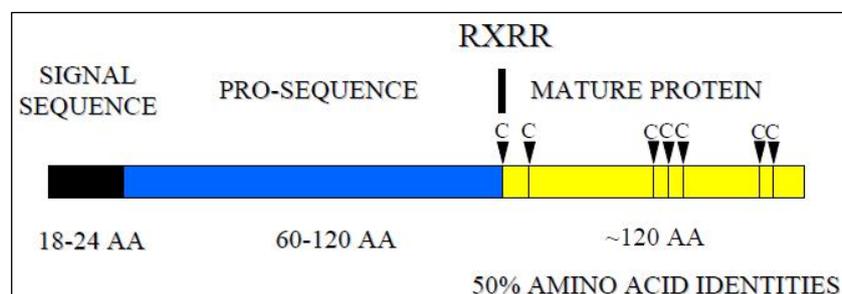
Questi geni codificano per pre-pro-neurotrofine. Le proteine mature hanno un peso di circa 13 kDa e sono presenti in soluzione come omodimeri legati non covalentemente. Presentano punti isoelettrici basici, caratteristica insolita per proteine secrete, la quale però può essere utile per limitare il loro raggio d'azione. Il promotore è caratterizzato da una conformazione di ponti disolfuro nota come "cysteine knot", identificato in seguito anche in altre proteine secrete, come PDGF ("Platelet-Derived Growth Factor") ed TGF- β s ("Transforming Growth Factor- β s") (McDonald and Hendrickson, 1993). Ad eccezione di NT-4/5, le sequenze delle neurotrofine sono altamente conservate nei mammiferi.

La famiglia delle neurotrofine svolge un importante ruolo nella sopravvivenza, differenziazione e funzionamento di differenti popolazioni neuronali, sia appartenenti al sistema nervoso centrale che periferico. Per questo motivo le NT sono al centro di numerosi studi nell'ambito delle neuroscienze, finalizzati non solo alla comprensione del loro ruolo fisiologico ma soprattutto del loro probabile coinvolgimento nella patogenesi di alcune malattie del sistema nervoso, caratterizzate dalla morte di specifiche popolazioni neuronali. Tra queste le più studiate sono malattie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer ed il morbo di Parkinson, e più recentemente anche numerose patologie del disturbo dell'umore, come ad esempio la depressione.

1.2 Produzione delle neurotrofine

I geni delle neurotrofine presentano un'organizzazione comune, poiché codificano tutti per precursori pre-pro-neurotrofinici che sono trasportati all'interno del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) sotto forma di peptidi lunghi circa 240-260 amminoacidi (Fig. 1), e qui vengono ulteriormente processati per essere poi secreti come proteine omodimeriche mature (lunghezza monomero: 118-129 aa per un peso molecolare di circa 12 kDa) (Halban P.A. and Irminger J.C., 1994; Merighi A., 2002; Presley J.F. et al., 1997).

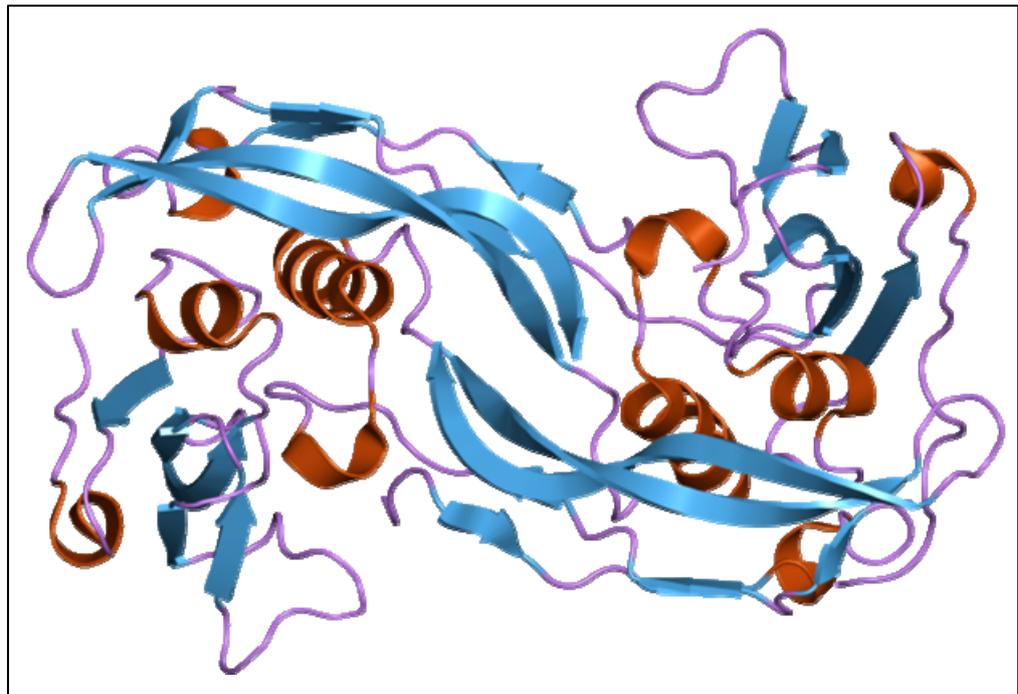
Figura 1. Struttura generale dei geni codificanti le neurotrofine.



Analizzando la sequenza dei geni si deduce che inizialmente queste proteine sono sintetizzate come precursori di 31-35 kDa. Questi ultimi presentano il seguente motivo precursore: Arg-Xaa-(Lys/Arg)-Arg (Bresnahan P.A., 1990), dove Xaa sta per Ser per quanto riguarda pro-NGF e pro NT-4/5, Val per quanto riguarda pro-BDNF e

Arg per quanto riguarda pro-NT-3. Il taglio proteolitico necessario per la formazione di proteine mature ed attive viene effettuato nelle cisterne della membrana del trans-Golgi ("TGM") ad opera dell'enzima "FURIN" o nei granuli secretori immaturi grazie ad enzimi chiamati convertasi, facenti parte della famiglia delle serin-proteasi (Seidah N.G. et al., 1996).

Figura 2.
Rappresentazione della proteina Transforming growth factor ("TGF- β "), della superfamiglia "cysteine-knot cyrokines".



I monomeri di ogni neurotrofina condividono molte caratteristiche chimiche comuni: numero di basi (118-120 aa) e grandezza molecolare simile (13,2-15,9 kDa), sequenza primaria simile al 50% o più, punto isoelettrico intorno a 9-10 e sei cisterne conservate nelle medesime posizioni relative, che permettono la formazione di tre legami disolfuro intracatena. Le neurotrofine, infatti, appartengono alla "Cysteine-Knot Superfamily" (Fig. 2), un vasto gruppo di proteine aventi in comune un core contenente tre legami disolfuro intracatena. Tutti i fattori di crescita appartenenti a questo gruppo presentano β -foglietti e mancano di un core idrofobico ben definito. Inoltre essi esistono unicamente come dimeri; un'ipotesi infatti afferma che la dimerizzazione di queste proteine è necessaria poiché il monomero non è sufficientemente stabile; solo con la dimerizzazione si forma un core idrofobico sufficiente alla stabilizzazione della struttura proteica (White F.A. et al., 1996).

All'interno del reticolo *trans* del Golgi si possono generare due differenti tipi di vescicole a seconda che il meccanismo di secrezione sia costitutivo o regolato (Merighi A., 2002). I granuli secretori della via costitutiva sono di piccole dimensioni (diametro: 50-100 nm) e si fondono con la membrana plasmatica per liberare il loro contenuto in assenza di qualsiasi specifico meccanismo di attivazione (Halban P.A. and Irminger J.C., 1994; Hokfelt T. et al., 2000; Harter C. and Reinhard C., 2000). Questa via costitutiva è presente in tutti i tipi di cellule ed è indipendente dai livelli intracellulari di Ca^{2+} . Invece vescicole relativamente grandi (diametro: 100-300 nm) fanno parte della via regolata: contrariamente ai granuli costitutivamente secreti, le vescicole della via regolata si fondono con la membrana plasmatica a seguito di un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} (Lang T. et al., 2001).

Per studiare i meccanismi della secrezione neuronale regolata di BDNF sono stati effettuati diversi studi sui neuroni ippocampali. In questi esperimenti è stato valutato l'aumento del contenuto di BDNF nel surnatante di colture cellulari tramite test ELISA: la depolarizzazione indotta da glutammato o da K^+ 50 mM (Canossa M. et al., 1997; Griesbeck O. et al., 1999) determina un notevole aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} che causa il rilascio di BDNF dalle vescicole secretorie.

Altri esperimenti effettuati su neuroni del sistema nervoso periferico (SNP) in coltura hanno evidenziato che una scarica di stimoli elettrici extracellulari (500 pulsazioni di 20-50 Hz ad intervalli di 20 secondi per 30/60 minuti) provoca un accumulo di BDNF nello spazio extracellulare, mentre un pattern di stimolazione con una frequenza più bassa è inefficace (Balkowiec A. and Katz D.M., 2000). Questi dati suggeriscono che la secrezione di BDNF è dipendente da alte concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} che possono essere raggiunte con influsso di Ca^{2+} a seguito di stimoli elettrici ad alta frequenza (Hartmann M. et al., 2001).

1.3 I recettori delle neurotrofine

Le neurotrofine si legano a due differenti tipi di recettori transmembrana: i Trk ("Tropomyosin Receptor Kinase") ed i recettori delle neurotrofine p75 (Fig. 3).

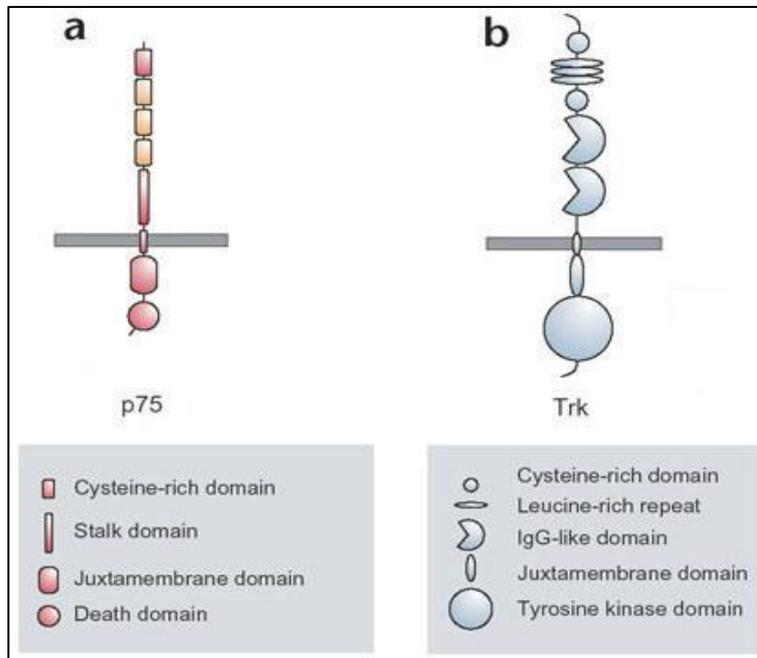


Figura 3. Struttura dei recettori delle neurotrofine p75 (a) e TrkA, B e C (b).

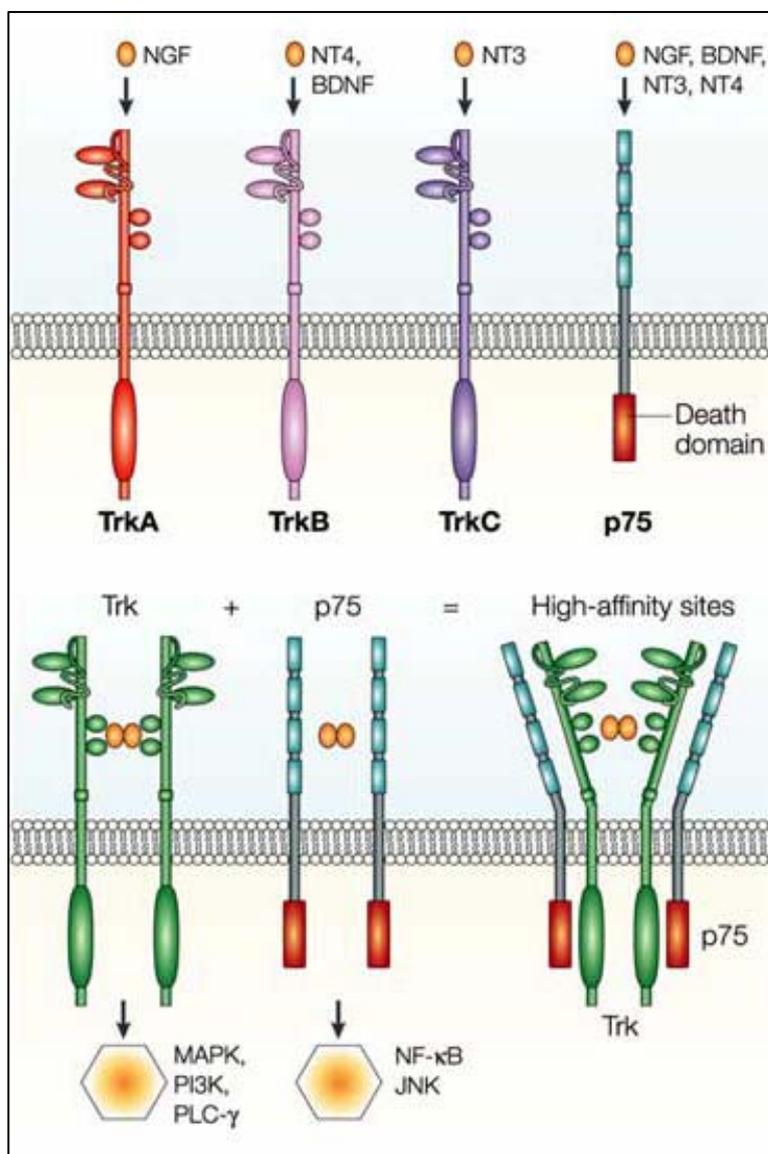
Questo sistema doppio porta alla trasduzione di segnali molto differenti in seguito al legame del ligando al proprio recettore; possono infatti essere trasmessi segnali di morte cellulare attraverso p75 o di sopravvivenza della cellula tramite i recettori Trk. Queste due classi di recettori interagiscono anche direttamente tra loro determinando così una regolazione molto fine.

I recettori Trk sono glicoproteine transmembrana di circa 140 kDa. Queste sono tirosin chinasi con un dominio di legame per il ligando extracellulare, il quale contiene ripetizioni multiple di motivi ricchi di leucine (LRR1-3), due cluster di cisterne (C1, C2), due domini immunoglobulina-like (Ig1, Ig2) ed un singolo dominio transmembrana (Schneider R. and Schweiger M., 1991). La specificità di legame dei recettori Trk è fortemente determinata dal secondo dominio Ig-like ed ogni recettore Trk lega il corrispondente ligando attraverso una diversa sequenza specifica (Urfer R. et al., 1995, 1998).

Nei mammiferi sono stati identificati tre geni *trk*, che riconoscono le neurotrofine con un relativamente alto grado di specificità di legame: NGF è il ligando di TrkA, mentre BDNF e NT4/5 sono i ligandi di TrkB, NT3 di TrkC (Kaplan

D.R. and Miller F.D., 2000). Non vi è tuttavia un'assoluta specificità, infatti NT3 è anche il ligando di TrkA e TrkB.

L'altra classe di recettore delle neurotrofine contiene il recettore a bassa affinità di legame p75 ($p75^{LNTR}$ – "Low-affinity NeuroTrophic Receptor"), il quale è una glicoproteina transmembrana di circa 75 kDa. Il dominio extracellulare presenta quattro cisterne ripetute (CR1-CR4) ed il residuo di cisteina presente in posizione 279, altamente conservato, è legato post-traduzionalmente con un residuo di acido palmitico attraverso un legame tioestere, servendo probabilmente per il riconoscimento proteina-proteina e per la localizzazione cellulare (Barker P.A. et al.,



1994). p75, come anche gli altri membri della sua famiglia (che comprende anche i recettori TNF e Fas), presenta ripetizioni di cisterne nel dominio extracellulare che forma il dominio di legame per il ligando (Fig. 4).

Figura 4. Il legame delle neurotrofine produce la dimerizzazione di ogni recettore. Le neurotrofine si legano selettivamente ad uno specifico recettore, mentre tutte si legano a p75.

Nessuno di questi recettori presenta alcuna attività catalitica intrinseca, ma tutti possiedono la capacità di avviare la cascata del segnale associandosi o distaccandosi da interattori citoplasmatici. Vi sono infatti molti motivi di associazione a proteine nel dominio citoplasmatico di p75. In p75 questo dominio consiste in un gruppo di sei brevi α -eliche della lunghezza di circa 90 aa, che formano un nuovo tipo di ripiegamento (Liepinsh E. et al., 1997). È importante anche una corta sequenza del dominio intracellulare di p75 che è chiaramente associata a quella del mastoparan, un peptide di 14 residui derivato dal veleno di vespa, capace di attivare direttamente le proteine G (Fernstein D.L. and Larhammar D., 1990). Il C-terminale forma una sequenza consenso comune a molte altre proteine che si associano con le DPS ("Densità Post Sinaptiche"), ovvero ispessimenti della membrana nei pressi delle aree di connessione fra i neuroni. Essi rappresentano importanti e complessi macchinari finalizzati a ricevere i segnali chimici dalle cellule neuronali adiacenti, essendo costituiti da diverse componenti proteiche tra cui recettori neuronali, proteine di trasporto, enzimi di segnalazione e molecole di adesione.

Tutte le neurotrofine si legano a p75 con un'affinità di circa 10^{-9} M (Rodriguez-Tèbar A. et al., 1990). Questa è una delle più basse affinità riscontrate in una neurotrofina che si lega sui neuroni (tipicamente 10^{-11} M). Sembra che la formazione di siti di legame ad alta affinità e specifici per le neurotrofine sia il risultato dell'associazione dei recettori p75 con i Trk (Mahadeo D. et al., 1994). Sono state trovate varianti di splicing per tutti e tre i recettori Trk (Shelton D.L. et al., 1995). Variazioni nel dominio extracellulare di TrkA e TrkB influenzano la specificità del ligando. Le varianti di splicing di Trk troncato sono spesso descritte come modulatori dominanti negativi della segnalazione di Trk; esiste infatti l'evidenza in sistemi ricostruiti *in vitro* che può avvenire una modulazione negativa (Eide F.F. et al., 1996; Ninkina N. et al., 1996). Anche per quanto riguarda p75, oltre al trascritto maggiore che codifica per il recettore completo, è stato trovato un trascritto minore che codifica per una proteina troncata nel dominio extracellulare (Dechant G. and Barde Y.A., 1997). Il suo dominio citoplasmatico e quello transmembrana sono identici a quelli della proteina completa, e visto che diverse

proteine intracellulari legano il dominio citoplasmatico di p75, esiste la possibilità che anche la presenza di piccole quantità di questa proteina troncata possano essere funzionalmente rilevanti.

1.4 Trasduzione del segnale attraverso i recettori Trk e p75

Il legame delle neurotrofine ai recettori Trk determina la fosforilazione della loro tirosina. Avviene quindi l'attivazione di cascate di segnalazione che determinano la prevenzione della morte cellulare programmata ed il differenziamento neuronale. La dimerizzazione indotta dal ligando porta alla fosforilazione di specifici residui di tirosina, localizzati nel cosiddetto "loop di attivazione" del dominio tirosin chinasi. La fosforilazione di questi residui determina una conformazione aperta del recettore, portando alla transfosforilazione e permettendo l'accesso dei substrati alla chinasi. I residui di fosfotirosina sui recettori Trk agiscono successivamente come siti di ancoraggio per molecole adattatrici; in particolare due specifici residui fosforilati di tirosina, localizzati nel dominio juxtamembrana e nel C-terminale (Y490 e Y785 in TrkA), funzionano come siti di ancoraggio per le molecole adattatrici. Due complessi di molecole adattatrici si legano al residuo di tirosina localizzato nella regione juxtamembrana del recettore Trk, i complessi Shc/Grb2/MEK/MAPK e FRS2/SHP-2/Grb/SOS. I recettori Trk ed i loro substrati attivano tre grandi cascate del segnale (Kaplan D. L. and Miller F. D., 2000; Pawson T. and Nash P., 2000) (Fig. 5):

1. la proteina Ras viene attivata attraverso alcune molecole adattatrici, in particolare un residuo di tirosina fosforilato del recettore (Y490) recluta la proteina Shc che viene fosforilata e, a sua volta, recluta nelle vicinanze della membrana il complesso Grb2/SOS ("Son of Sevenless"). Questo conduce all'attivazione di Ras, che può attivare in modo transiente PI3K o la via delle MAP chinasi ("Mitogen-Activated Proteinkinase"). La via della MAPK ha come bersaglio finale la fosforilazione della proteina CREB ("cAMP Responsive Element Binding protein"). CREB è un fattore di trascrizione responsabile

dell'attivazione della trascrizione dei geni che codificano per alcune proteine antiapoptotiche della famiglia Bcl-2 e dei geni per i fattori neurotrofici stessi.

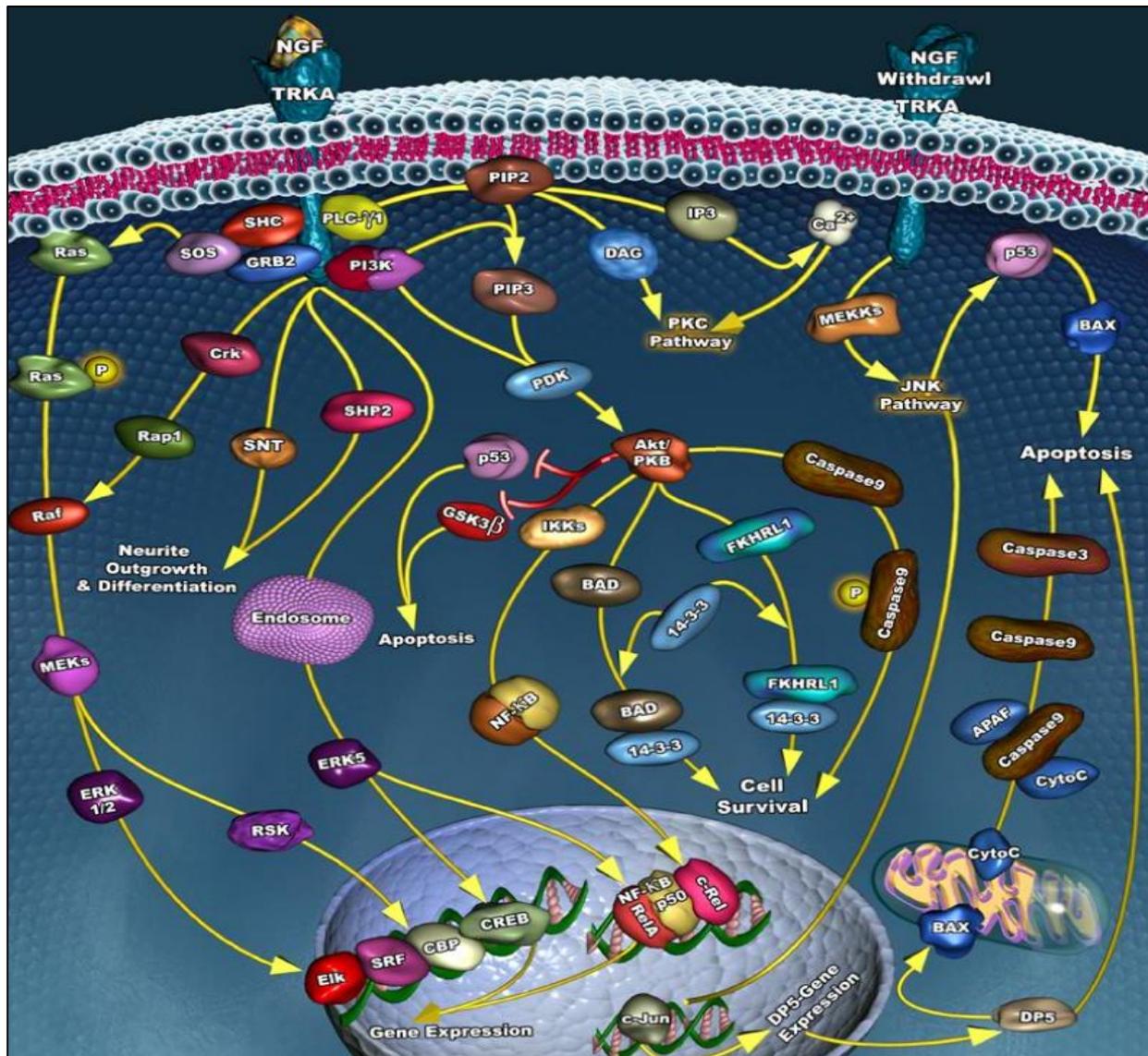


Figura 5. Segnalazione a valle del recettore TrkA.

- PI3K viene attivata dal complesso di proteine adattatrici Shc-Grg2-Gab1 o dalla proteina Ras. In entrambi i casi PI3K genera dei prodotti lipidici che reclutano nei pressi della membrana le chinasi Akt e le chinasi 3-fosfoinositide dipendenti (PDK). PDK attiva Akt che a sua volta fosforica alcune proteine importanti nel controllo della sopravvivenza cellulare, ad esempio fosforila BAD ("Bcl2/Bclx-Associated Death promoter") la quale è un membro della

famiglia Bcl-2. Essa, se non fosforilata, promuove l'apoptosi legando Bcl-xL, attiva il fattore di trascrizione Forkhead che controlla l'espressione di geni promuoventi l'apoptosi ed inibisce p53, proteina in grado di indurre apoptosi.

3. La fosforilazione di Y785 induce il legame tramite il dominio SH2 e la fosforilazione della fosfolipasi C- γ (PLC- γ). L'attivazione di PLC- γ porta alla produzione di inositolo-3-fosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). IP3 induce il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari portando all'attivazione della proteina chinasi Ca^{2+} calmodulina-dipendente (PKC), che a sua volta innesca la via della MAPK.

L'attivazione dello stesso recettore Trk da parte di differenti ligandi ed il legame di differenti proteine adattatrici rende possibile l'amplificazione e la diversificazione dei segnali recettore-mediati.

Per quanto riguarda p75, la funzione di questo recettore varia in modo considerevole a seconda del contesto cellulare in cui è espresso (Barker P.A., 1998). p75 media l'idrolisi della sfingomieline e la produzione di ceramide in seguito al legame delle neurotrofine (Dobrowsky R. T. et al., 1994, 1995), interagendo con la caveolina. Le caveole, microdomini presenti nelle membrane biologiche caratterizzati da una peculiare composizione lipidica e particolarmente ricchi di colesterolo e sfingolipidi, sono presumibilmente il sito di idrolisi della sfingomieline indotta dalle neurotrofine (Bilderback T.R. et al., 1997, 1999). Alla produzione di ceramide segue il legame di TNF ai suoi recettori e l'attivazione di NF- κ B (Wiegmann K. et al., 1994). Il segnale di p75 è tuttavia duplice in quanto, oltre all'attivazione di NF- κ B che sembra mediare la sopravvivenza cellulare, vi sono chiare indicazioni che l'attivazione di questo recettore da parte delle neurotrofine possa innescare anche un secondo segnale con attività apoptotica. La segnalazione della morte cellulare comporta l'attivazione delle caspasi, di Bax/Bad, Bcl-2 e Bcl-xL (Coulson E. J. et al., 1999; Soilu-Hanninen M. et al., 1999). Sono stati descritti diversi interattori citoplasmatici per p75 e le loro possibili funzioni nei processi di segnalazione, comprendendo il processo di morte cellulare, l'arresto del ciclo cellulare, l'inibizione della crescita neuritica e la trasmissione sinaptica (Fig. 6).

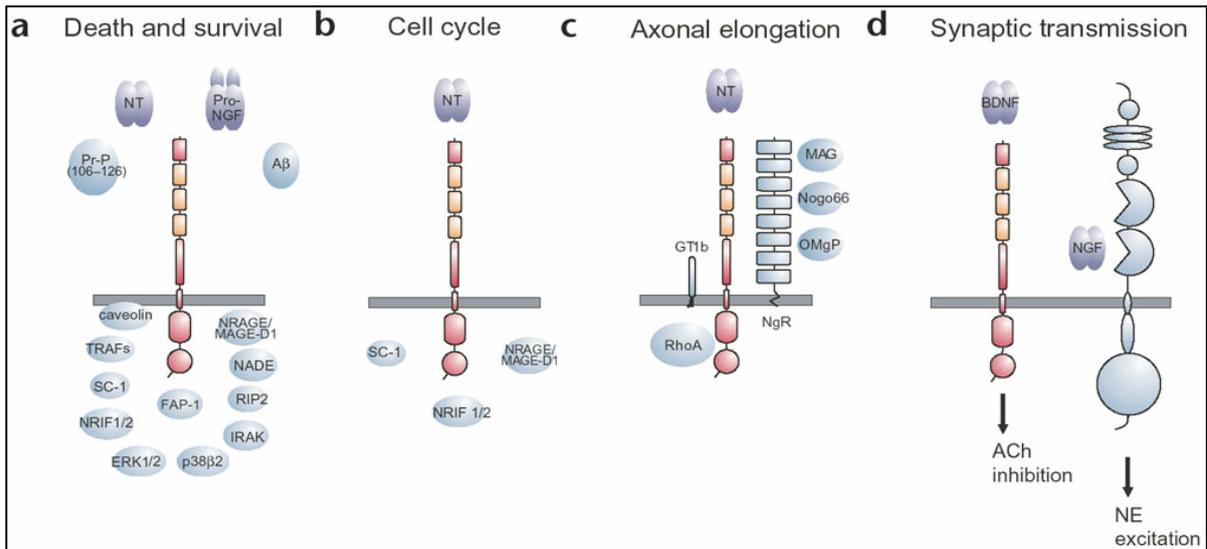


Figura 6. Ruoli di p75 e suoi interattori.

Tra le proteine più importanti che interagiscono con p75 ci sono i tre recettori Trk, infatti molte cellule esprimono contemporaneamente recettori Trk e p75, e l'interazione di questi modula il risultato del legame delle neurotrofine (Bibel M. et al., 1999). Questa interazione è funzionalmente rilevante in diversi modi: innanzitutto l'associazione dei recettori guida il legame ad alta affinità delle neurotrofine, che è cruciale in vista della quantità limitata di neurotrofine *in vivo* (Benedetti M. et al., 1993; Mahadeo D. et al., 1994). Inoltre, l'associazione del recettore incrementa la discriminazione del ligando dai recettori Trk, che è molto importante nel caso di TrkA e TrkB, che legano più di una neurotrofina (Benedetti M. et al., 1993; Bibel M. et al., 1999). Il segnale di Trk sopprime l'attivazione della Jun chinasi e della sфингомielasi, ma non l'induzione di NF-κB. Quindi in condizioni fisiologiche il legame delle NT mature ai recettori Trk e p75 promuove la sopravvivenza cellulare, poiché il segnale di sopravvivenza mediato da Trk sopprime il segnale pro-apoptotico proveniente da p75 ed agisce sinergicamente col segnale antiapoptotico proveniente da p75 (Dobrowsky R.T. et al., 1995; Mazzoni I.E. et al., 1999; Aloyz R.S. et al., 1998; Maggirwar S.B. et al., 1998; Hamanoue M. et al., 1999). Negli stati patologici, invece, predomina il segnale pro-apoptotico proveniente da p75. L'apoptosi è innescata quando non si ha più una situazione di

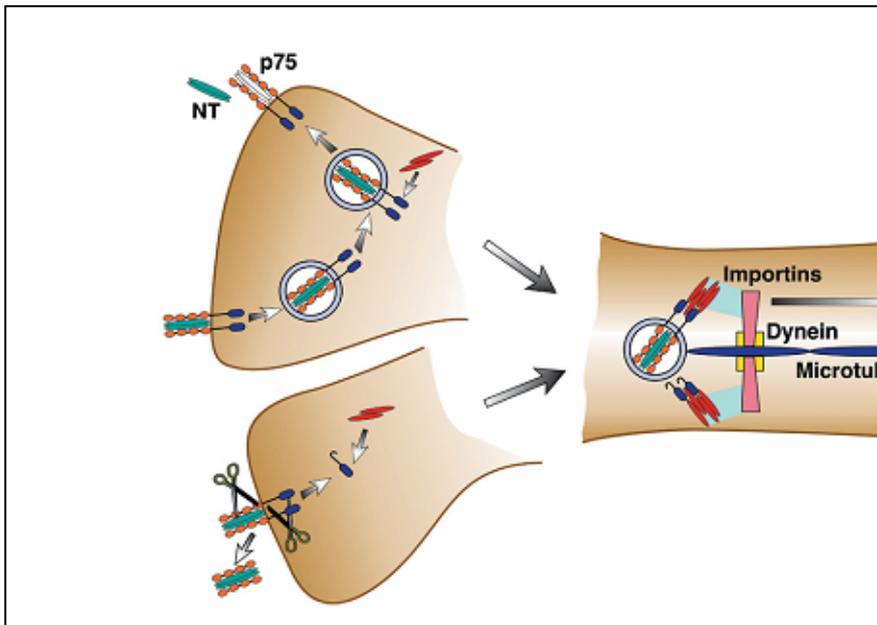
equilibrio tra i due recettori, perché p75 è regolato positivamente o perché è aumentata la concentrazione della pro-NT, che da studi in vitro è dimostrato legarsi ed attivare preferenzialmente p75 (Lee R. et al., 2001).

1.5 Trasporto retrogrado ed anterogrado

Le neurotrofine sono state originariamente scoperte come fattori bersaglio in grado di regolare la sopravvivenza e la differenziazione dei neuroni innervanti. Secondo la teoria neurotrofica della sopravvivenza neuronale, le neurotrofine sono liberate dai tessuti target in quantità limitata, il che comporta una competizione tra i neuroni innervanti: soltanto i neuroni che instaurano collegamenti adatti sopravvivranno e formeranno sinapsi, mentre i neuroni che non riescono ad ottenere quantità sufficienti di neurotrofine moriranno (Oppenheim R.W., 1991). Un aspetto interessante del segnale delle neurotrofine è proprio il trasporto retrogrado dei segnali dall'assone al corpo cellulare dei neuroni.

Il trasporto assonale retrogrado delle proteine dal terminale al corpo delle cellule è un meccanismo estremamente importante perché permette ai neuroni di ricevere le informazioni sull'ambiente che circonda i terminali nervosi, consentendo loro di rispondere in modo adatto ai numerosi segnali extracellulari. Le NT, per poter influenzare l'espressione genica dei neuroni innervanti, devono trasmettere un segnale che dal terminale dell'assone attraversa l'intera lunghezza dell'assone per arrivare al corpo cellulare. Diversi studi indicano che la somministrazione di NT al terminale dell'assone provoca la formazione di un complesso ligando-recettore attivato che viene endocitato e racchiuso in vescicole che sono trasportate attivamente lungo i microtubuli (Ehlers M. et al., 1995; Watson F.L. et al., 1999). I recettori Trk attivati vengono infatti endocitati per formare gli "endosomi di segnalazione" e la dineina trasporta in modo retrogrado tali endosomi contenenti i Trk lungo i microtubuli fino al corpo cellulare (Fig. 7).

Il recettore all'interno delle vescicole rimane cataliticamente attivo e trasmette segnali anche lungo gli assoni. Si possono quindi distinguere due tipi di

**Figura7.**

L'internalizzazione di p75 con il ligando per formare l'endosoma di riciclo (sopra) o il taglio di p75 per rilasciare il dominio intracellulare (sotto) possono essere seguiti entrambi dal reclutamento di interattori intracellulari con segnali di localizzazione nucleare. Questi potrebbero poi servire come adattatori per dirigere il complesso di segnalazione contenente p75 verso un meccanismo di trasporto retrogrado importina/dineina in direzione dei microtubuli.

segnale di base alla localizzazione: un segnale locale all'interno dell'assone, che può richiedere o meno la formazione di endosomi, ed un segnale, che agisce nei corpi cellulari, trasmesso dai recettori attivati trasportati dagli endosomi. Le NT a livello degli assoni distali provocano la fosforilazione dei Trk assonali e inducono l'attivazione locale di ERK1/2 (Watson F.L. et al., 2001;

Atwal J.K. et al., 2000), segnale che determina la crescita dell'assone (Zhang Y. et al., 2000; York R.D. et al., 2000). Un'altra cascata attivata all'interno dell'assone è la cascata di PI3K che provoca l'attivazione della chinasi Akt, contribuendo alla crescita dell'assone (Atwal J.K. et al., 2000; Kuruvilla R. et al., 2000). L'attivazione locale di ERK1/2 e di PI3K contribuisce all'allungamento assonale, probabilmente attraverso la fosforilazione delle proteine associate ai microtubuli (Fig. 8).

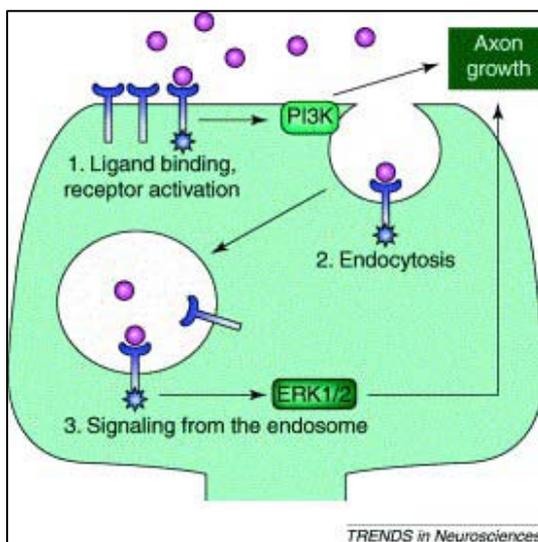


Fig. 8. Segnale locale delle neurotrofine all'interno dell'assone.

La stimolazione neurotrofica a livello degli assoni distali è responsabile nei corpi

cellulari dell'attivazione di un altro membro della famiglia delle MAPK: ERK5 (Watson F.L. et al., 2001) e di PI3K (Kuruville R. et al., 2000). L'attivazione di queste due molecole promuove la sopravvivenza neuronale (Brunet A. et al., 2001; Walton M. et al., 1999). Una stimolazione diretta sui corpi cellulari porta invece alla fosforilazione e alla traslocazione nucleare sia di ERK5 che di ERK1/2.

Più recentemente, è stato segnalato che le neurotrofine possono anche essere trasportate in modo anterogrado (Nawa H. and Takei N., 2001). Il trasporto anterogrado ed il rilascio terminale potrebbero essere meccanismi neurotrofici di sostegno o un modo veloce per rispondere alla richiesta fisiologica. Ciò è in conformità con il ruolo di BDNF come neurotrasmettitore. In effetti BDNF ha molte delle caratteristiche proprie di un neurotrasmettitore, per esempio, la sintesi presinaptica, l'immagazzinamento vescicolare, il rilascio evocato dalla depolarizzazione, la localizzazione post-sinaptica di TrkB, le azioni post-sinaptiche, l'inattivazione ed il riciclaggio di BDNF (Altar C.A. and Di Stefano P.S., 1998).

1.6 Caratteristiche generali di BDNF

BDNF ("Brain Derived Neurotrophic Factor") è tra le neurotrofine la molecola maggiormente diffusa nel cervello dei mammiferi, sia adulti che in fase di sviluppo. Uno degli aspetti più interessanti di questa neurotrofina riguarda il suo coinvolgimento nei meccanismi della plasticità sinaptica. Con questo termine si definisce la capacità dei circuiti cerebrali di modificarsi adattandosi agli stimoli ambientali, per cui è sia il meccanismo alla base della formazione dei circuiti neuronali durante lo sviluppo dell'organismo, sia quello alla base delle funzioni cognitive, come l'apprendimento e la memoria, oltre al processo grazie al quale i circuiti neuronali possono essere riparati in caso di lesioni di varia natura (lesioni traumatiche, vascolari, tumori e malattie neurodegenerative). Gli eventi che caratterizzano lo sviluppo e che quindi sono responsabili della plasticità sono la proliferazione, il differenziamento, la formazione dei contatti sinaptici, il rimodellamento assonale, la crescita assonale e la crescita dell'albero dendritico.

Tutti questi eventi sono indotti da vari fattori tra i quali ritroviamo le NT ed in particolare BDNF. Il ruolo di BDNF nella plasticità sinaptica a lungo termine nell'ippocampo e nella neurocorteccia è, oggi, ben chiaro (Lessmann V., 1998; Schuman E.M., 1999; Schinder A.F. and Poo M.M., 2000; Poo M.M., 2001). Vari esperimenti hanno dimostrato che la sintesi di BDNF viene incrementata dai livelli fisiologici dell'attività sinaptica (Patterson S.L. et al., 1992; Dragunow M. et al.; 1993; Rocamora N. et al.; 1996), suggerendo un probabile feedback positivo da parte di BDNF sulla plasticità sinaptica. Effettivamente, come indicato da lavori di diversi gruppi, la stimolazione delle cellule con BDNF può aumentare l'efficacia presinaptica incrementando il rilascio del glutammato nelle sinapsi eccitatorie (Carmignoto G. et al., 1997; Lessmann V. and Heumann R., 1998; Li Y.X. et al., 1998a; Li Y.X. et al., 1998b; Schinder A.F. et al., 2000; Paul J. et al., 2001). Inoltre il ruolo cruciale di BDNF nella plasticità sinaptica attività-dipendente di lunga durata è stato suggerito dal danneggiamento del potenziale di lunga durata (LTP) ippocampale osservato in topi knock-out per BDNF (Korte M. et al., 1995; Patterson S.L. et al., 1996). Sulla base di questi dati, BDNF è stato inizialmente proposto come messaggero retrogrado nell'LTP ippocampale, che viene liberato dalle cellule postsinaptiche in seguito a stimolo intenso. Esso media cambiamenti postsinaptici di lunga durata nelle sinapsi stimolate. Tuttavia, un modello aggiornato per la funzione di BDNF nell'LTP deve includere possibili effetti postsinaptici autocrini di BDNF per spiegare alcuni eventi postsinaptici dell'LTP iniziale (Malenka R.C. and Nicoll R.A., 1999). L'LTP è una rappresentazione elettrofisiologica della plasticità sinaptica e viene utilizzato come modello cellulare di apprendimento e di memoria: successivamente alla stimolazione di porzioni di ippocampo con una scarica di stimoli elettrici ad alta frequenza ad una delle vie afferenti ippocampali, si osserva un aumento dell'ampiezza dei potenziali post-sinaptici eccitatori che può durare alcune ore, ma anche giorni o settimane. A livello molecolare, nella trasmissione sinaptica a bassa frequenza si ha che il glutammato liberato dalle terminazioni presinaptiche agisce sia sui recettori/canale NMDA ("N-Methyl-D-Aspartate") che AMPA ("α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate") posti sulla membrana post-sinaptica, ma Na⁺ e K⁺ possono attraversare solo i canali AMPA in quanto, a

livello del potenziale di membrana, i canali NMDA sono bloccati dal Mg^{2+} . Durante l'LTP invece, la cellula post-sinaptica viene energicamente depolarizzata dalle afferenze convergenti di molti neuroni presinaptici e questo fa sì che si aprano anche i canali NMDA che lasciano passare Na^+ e Ca^{2+} . La concentrazione intracellulare di Ca^{2+} aumenta notevolmente e vengono attivate PKC ("Protein-Kinase C") e PK Ca^{2+} calmodulina-dipendente. Di conseguenza si ha che le molecole di BDNF presenti nella cellula post-sinaptica all'interno delle vescicole secretorie vengono liberate e vanno ad agire sia sulla cellula pre-sinaptica con segnale anterogrado (provocando l'ulteriore liberazione di glutammato), che in modo autocrino sulla cellula post-sinaptica, determinando un ulteriore rilascio di BDNF.

Diverse caratteristiche delle neurotrofine provano come queste possano essere effettivi mediatori della plasticità sinaptica:

1. rilascio post-sinaptico delle NT ed espressione dei loro rispettivi recettori sul terminale pre-sinaptico;
2. rilascio delle NT durante gli eventi di depolarizzazione;
3. azione preferenziale sui neuroni attivi;
4. induzione di un aumento delle sinapsi riguardo la sintesi ed il rilascio del neurotrasmettitore;
5. l'assenza di NT determina un deficit del potenziamento sinaptico.

Gli studi sulle sinapsi del SNC sono stati indirizzati su BDNF poiché la sua espressione e quella del suo recettore sono molto diffuse. Aumenti patologici dell'attività sinaptica causano un aumento dell'espressione di BDNF e dell'attivazione del suo recettore TrkB (Aloyz R. et al., 1999). L'applicazione diretta di BDNF su porzioni di ippocampo o in colture ippocampali incrementa la concentrazione delle vescicole sinaptiche sulla membrana pre-sinaptica (Collin C. et al., 2001). In concomitanza con alti livelli dell'attività sinaptica, i segnali di BDNF e del suo recettore TrkB influenzano la crescita dendritica e la densità delle spine dendritiche (correlata con le aree di integrazione sinaptica) (Danzer S.C. et al., 2002; Horch H.W. et al., 1999; Shimada A. et al., 1998; Yuste R. et al., 2001). Infine la perdita

del legame di BDNF attraverso TrkB nel cervello adulto di roditore mostra un deficit nella generazione dell'LTP (Xu B. et al., 2000).

BDNF inoltre ha un ruolo nella regolazione della sopravvivenza e della differenziazione del Sistema Nervoso Periferico (SNP) (Fritsch B. et al., 1997), mentre nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) sembra avere essenzialmente un ruolo nella differenziazione e nella modulazione delle funzioni neuronali (Murer M.G. et al., 2001).

Le NT sono inoltre importanti per la protezione dei neuroni del SNC e del SNP dagli insulti eccitotossici, ipossici ed ipoglicemici, suggerendo quindi un ruolo come promotori della sopravvivenza del SNC a seguito di una lesione. L'espressione di BDNF nel ratto adulto è abbondante nell'ippocampo, nella neocorteccia, nell'amigdala e nel cervelletto (Ernfors P. et al., 1990, 1992; Maisonpierre P.C. et al., 1990; Hofer M. et al., 1990); inoltre, l'mRNA di BDNF è stato ritrovato anche nell'ipotalamo, nel setto e nei nuclei adrenergici del tronco encefalico (Castren E. et al., 1995; Katoh-Semba R. et al., 1997). Nel SNC l'espressione di BDNF è regolata positivamente dall'attività neuronale (Lindholm D. et al., 1994; Lindvall O. et al., 1994); questo fenomeno è stato ben documentato nell'ippocampo, dove l'espressione di BDNF è fortemente influenzata dai livelli fisiologici e patofisiologici dell'attività neuronale (Zafra F. et al., 1990; Ernfors P. et al., 1991; Isackson P.J. et al., 1991). Le analisi *in vitro* ed *in vivo* effettuate essenzialmente nell'ippocampo, nella corteccia cerebrale e nell'ipotalamo del ratto hanno dimostrato che la regolazione attività-dipendente di BDNF è mediata dai neurotrasmettitori classici: in generale, i livelli di mRNA di BDNF sono regolati positivamente dal glutammato, dall'acetilcolina e dalla serotonina, mentre sono regolati negativamente dal GABA. Il significato biologico di questa regolazione è duplice:

1. un aumento localizzato provvede ad un feedback positivo sulla funzione sinaptica;
2. un aumento in seguito ad un insulto neuronale può proteggere i neuroni dall'eccitotossicità (Lindholm D. et al., 1994; Lindvall O. et al., 1994).

Oltre che nelle popolazioni neuronali, l'mRNA di BDNF è stato trovato anche in molti tessuti ed organi periferici non neuronali. Si suppone che la funzione di BDNF in queste diverse popolazioni cellulari sia strettamente correlata al fatto che esso è un fattore neurotrofico rilasciato dalle cellule bersaglio dei neuroni, quindi BDNF presente nelle popolazioni cellulari sopra citate viene rilasciato affinché agisca sui neuroni innervanti come promotore della sopravvivenza cellulare.

BDNF è anche presente nel circolo ematico, sia nel plasma che nel siero (Rosenfeld R.D. et al., 1995; Radka S.F. et al., 1996). Nel siero i livelli di BDNF sono circa dieci volte più alti che nel plasma. Questa differenza deriva dal fatto che le piastrine contengono grandi quantità di BDNF che rilasciano in seguito alla loro attivazione durante il processo di coagulazione. Le piastrine non producono BDNF ma lo acquisiscono dal plasma internalizzandolo attraverso un trasportatore (Fujimura H. et al., 2002). Dal momento che in letteratura si trovano lavori discordanti riguardo alla capacità di BDNF di attraversare la barriera ematoencefalica (Pan W. et al., 1998; Poduslo J.F. et al., 1996), non è ancora certo se possa esservi un contributo delle sorgenti centrali (neuroni del SNC e cellule gliali) sul contenuto ematico di BDNF. Potenziali produttori del BDNF plasmatico sono l'endotelio vascolare, la muscolatura liscia (Maisonpierre P.C. et al., 1991), i macrofagi ed i linfociti attivati (Braun A. et al., 1999; Gielen A. et al., 2003; Kerschensteiner M. et al., 1999). La funzione principale di BDNF espresso e rilasciato da queste popolazioni cellulari è quella di supportare la sopravvivenza neuronale e di stimolare la riparazione neuronale ed assonale nei siti dell'infiammazione (Kerschensteiner M. et al., 1999). Inoltre, poiché il recettore TrkB, oltre che sulle cellule neuronali è stato trovato anche in target periferici, BDNF presente nel circolo ematico potrebbe agire su altre popolazioni cellulari.

1.7 Il gene *BDNF*

Il gene *BDNF* si trova sul cromosoma 11p14, estendendosi per circa 70 kb. Questo gene mostra una grande complessità dovuta alla presenza di promotori

alternativi, diversi siti di poliadenilazione ed alla presenza di differenti siti accettori e siti donatori che producono numerosi pattern di splicing alternativo sia tra gli esoni che all'interno di questi ultimi.

La struttura di questo gene in Homo Sapiens è costituita, secondo il lavoro di Koppel e collaboratori del 2009, da un numero variabile ed abbastanza elevato di esoni a monte (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII) non codificanti poiché non vengono

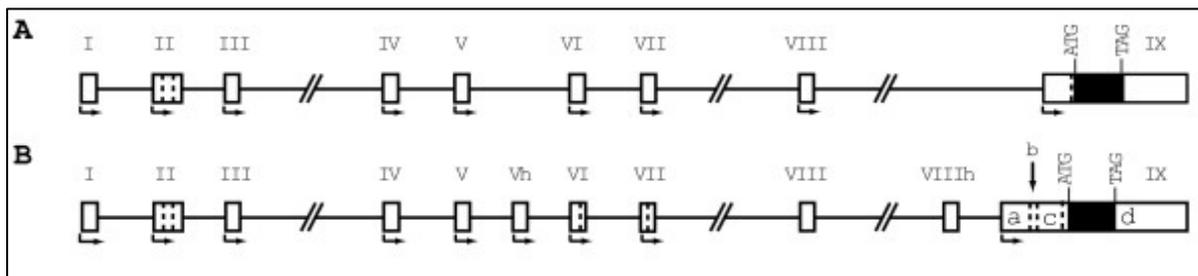


Figura 9. Disegno schematico del gene BDNF di topo (A) e di uomo (B). Il gene di topo è composto da 8 esoni (I-VIII) non codificanti (in bianco) che vengono uniti tramite splicing ad una sequenza codificante comune, indicata con "IX" (in nero) (i siti di inizio della trascrizione sono indicati con le frecce). Le linee tratteggiate indicano siti di splicing alternativo. Sebbene il gene umano sia molto simile, esso differisce per gli esoni aggiuntivi Vh e VIIIh e per un più complesso pattern di splicing alternativo che coinvolge l'esone IX. [Koppel I. *et al.*, 2009]

tradotti, seguiti da un unico esone codificante (XI) da cui deriva la pre-pro-proteina (Fig. 9).

I trascritti utilizzano un singolo sito accettore di splicing nell'esone XI. Si possono formare otto distinte classi di trascritti quando la trascrizione inizia a partire da uno degli esoni I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII ed il sito donatore di splicing di ognuna di queste sequenze esoniche è legato al sito accettore dell'esone codificante XI. Tuttavia, è possibile anche la formazione di varianti dei trascritti individuali all'interno di queste classi grazie alla presenza di ulteriori siti donatori di splicing in alcuni di questi esoni (II, VI e VII; a, b, c e d in figura 9). La traduzione generalmente parte dall'ATG posizionato nell'esone XI, tuttavia è stato notato che anche gli esoni I e VI contengono codoni ATG in-frame, i quali potrebbero essere usati come siti d'inizio della traduzione, portando alla formazione di proteine pre-pro-BDNF con N-terminali più lunghi. Infine, l'esone XI, che codifica per la proteina e il 3'UTR, risulta essere soggetto a splicing interno e quindi potrebbe avere la possibilità di generare trascritti alternativi oltre che possedere quattro siti di

poliadenilazione, che gli permettono di creare altrettante differenti regioni 3'UTR. La maggior parte dei trascritti è fortemente espressa a livello cerebrale, tuttavia è stato notato che molti mRNA alternativi del gene *BDNF* mostrano livelli relativamente alti di espressione in tessuti non neuronali. Il locus del gene *BDNF* porta inoltre alla formazione di trascritti antisenso non codificanti che mostrano splicing e pattern di espressione complessi, che potrebbero servire come regolatori antisenso per i trascritti di BDNF nell'uomo.

1.8 Regolazione fine dell'espressione di BDNF: i microRNA come inibitori post-trascrizionali

I microRNA (miRNA o miR) sono piccoli RNA di circa 22 nucleotidi che regolano a livello post-trascrizionale l'espressione di numerosi RNA messaggeri con cui condividono una complementarietà di sequenza (Filipowicz W. et al., 2008). Essi sono generati dall'enzima Dicer a partire da una molecola di RNA a doppia catena ed il loro principale meccanismo d'azione è quello di inibire a livello post-trascrizionale RNA messaggeri (mRNA) riconosciuti sulla base della loro omologia di sequenza, seppur imperfetta.

Geni codificanti per miRNA sono stati identificati in tutti gli organismi pluricellulari, dove svolgono numerose funzioni durante lo sviluppo ed il differenziamento. Nelle cellule di mammifero sono stati identificati oltre 300 miRNA (miRNA Registry, release 3.0; Griffiths-Jones, 2004), la cui espressione è, in molti casi, tessuto specifica.

L'inibizione post-trascrizionale attuata dai miRNA sui propri bersagli genici opera principalmente attraverso la repressione della traduzione. Ogni miRNA agisce su decine o centinaia di bersagli genici diversi.

Il meccanismo di formazione dei miRNA parte dalla RNA polimerasi II (ma a volte è coinvolta anche la RNA polimerasi III) che sintetizza un lungo filamento di RNA di circa 1kb. Questo filamento si ripiega su se stesso tramite interazioni intramolecolari formando una struttura a forcina con le estremità libere. Direttamente all'interno del nucleo la RNA III endonucleasi Drosha elimina queste code non

appaiate formando il pre-miRNA (Lee Y. et al., 2003). Il duplex imperfetto pre-miRNA attraversa la membrana nucleare legato a Rna-GTP/Esportina5 e nel citoplasma si lega all'enzima Dicer (anch'esso una endonucleasi Rnasi III) (Lee Y. et al., 2003) che elimina l'altra estremità, formando il duplex di miRNA, che viene trasformato in filamenti singoli tramite un'elicasi. Il filamento di miRNA maturo si lega ad un complesso proteico chiamato RISC ("RNA-Induced Silencing Complex"), il quale identifica bersagli di mRNA basati su una perfetta omologia di sequenza, cosicché l'endonucleasi del RISC (chiamata "Slicer") taglia l'mRNA bersaglio in una posizione situata a circa la metà del miRNA (Schwarz D.S. et al., 2002). Il complesso RISC

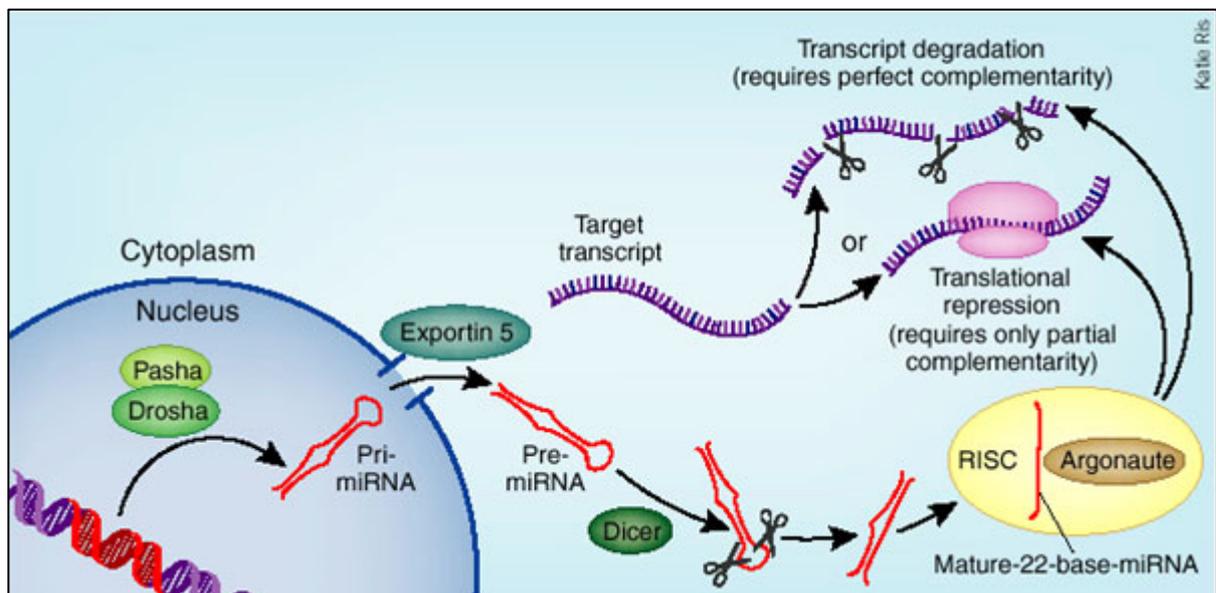


Figura 10. Meccanismo di produzione ed azione dei miRNA. [Mack G.S., 2007]

contiene un membro della famiglia proteica chiamata "Argonaute", le quali sono tipicamente associate alla funzione dei miRNA. Quando la complementarità tra le sequenze di miRNA e dell'mRNA bersaglio è quasi perfetta (e quindi vi è una quasi totale stabilità nell'eteroduplex) l'effetto finale è il taglio dell'mRNA bersaglio; se la complementarità è minima si otterrà la repressione. Dopo il taglio dell'mRNA, il miRNA rimane intatto e può guidare il riconoscimento di altri messaggeri (Bartel D. P., 2004).

È stato dimostrato che nel sistema nervoso dei vertebrati i miRNA sono coinvolti nello sviluppo (Giraldez, A.J., et al., 2005) e nella regolazione della plasticità sinaptica (Schratt G.M. et al., 2006).

La sottofamiglia di miRNA denominata miR-30 è abbondantemente espressa nel cervello umano (Miska E.A. et al., 2004) ed è stata implicata in numerose malattie cerebrali (Perkins D.O. et al., 2007; Wang G. et al., 2008; Wang W.X. et al., 2008). Questa famiglia di miRNA è altresì implicata nella regolazione del gene BDNF, in particolare durante la vita adulta e l'invecchiamento (Mellios N. et al., 2008).

1.9 BDNF nelle patologie del sistema nervoso centrale

Poiché BDNF è in grado di promuovere la sopravvivenza neuronale ed i processi di crescita durante lo sviluppo nonché proteggere i neuroni da insulti di varia natura, cambiamenti dei suoi livelli endogeni o della sua biodisponibilità potrebbero contribuire alla patogenesi di alcune malattie neurologiche. Sono infatti state riportate alterazioni della produzione e della secrezione di BDNF in varie malattie; tra queste vi sono malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer (AD) ed il morbo di Parkinson (PD), associate ad una diminuzione dei livelli di BDNF nel cervello (Connor B. et al., 1997; Howells D.W. et al., 2000; Michalski B. et al., 2003; Parain K. et al., 1999; Phillips H.S. et al., 1991); malattie del disturbo dell'umore come la depressione, caratterizzata da una minore concentrazione di BDNF sia a livello centrale (cervello) che periferico (sangue) (Altar C.A. et al., 1999; Chen B. et al., 2001; Shimizu E. et al., 2003) ed anche malattie infiammatorie come la sclerosi multipla, associata ad un aumento della sintesi di BDNF nei siti dell'infiammazione.

Numerose ipotesi sono state formulate per spiegare la genesi dell'AD. Tra queste è stato proposto che l'AD potesse essere dovuto soprattutto ad un deficit nell'espressione dei fattori neurotrofici e del recettore Trk (Connor B. et al., 1998). Una delle alterazioni più evidenti e classiche osservate in questa malattia è la degenerazione dei neuroni colinergici del mesencefalo (Siegel G.J. et al., 2000). Vari

studi riportano che sia i livelli proteici che l'mRNA di BDNF sono ridotti significativamente nell'ippocampo e nella corteccia dei soggetti con AD (Hock C. et al., 2000). I risultati degli studi *in vivo* ed *in vitro* indicano che BDNF promuove la sopravvivenza e la differenziazione dei neuroni da eventuali lesioni. Presi insieme, questi risultati suggeriscono un collegamento fra la malattia dell'Alzheimer e l'espressione di TrkB e/o di BDNF. La diminuzione dei livelli di BDNF potrebbe costituire una mancanza di supporto trofico e contribuire così alla degenerazione delle popolazioni neuronali specifiche nel cervello di pazienti affetti da AD, compreso il sistema colinergico del mesencefalo basale.

Per quanto riguarda il Parkinson (PD), sappiamo che è caratterizzato dalla perdita selettiva e progressiva dei neuroni dopaminergici nella substantia nigra (Parain K. et al., 1999); ciò è seguito da deplezione di dopamina striatale che causa disfunzione motoria (Siegel G.J. et al., 2000). È stata riscontrata anche una riduzione della concentrazione proteica di BDNF nel nucleo caudato e nel putamen dei pazienti affetti da PD (Mogi M. et al., 1999), mentre non è stata riscontrata nessuna differenza nell'espressione cellulare dei recettori TrkB nel cervello dei pazienti affetti da PD (Benisty S. et al., 1998). Molti studi dimostrano come BDNF sia in grado di agire sui neuroni dopaminergici e come una riduzione dei livelli di BDNF nella substantia nigra possa essere un fattore legato alla malattia (Aliaga E. et al., 2000; Dluzen D.E. et al., 1999; Hyman C. et al., 1991; Murer M.G. et al., 2001; Numan S. et al., 1997; Venero J.L. et al., 2000).

Per quanto riguarda la depressione, negli ultimi anni questa malattia è stata associata ad un'alterazione dei meccanismi che governano la sopravvivenza cellulare e la plasticità neuronale del cervello, ed anche danni a livello della plasticità strutturale. Secondo la teoria monoaminergica, la depressione è causata da un deficit funzionale dei trasmettitori monoaminergici (serotonina e norepinefrina) in alcune aree cerebrali (Schildkraut J.J., 1965). Recentemente invece la depressione è stata correlata con un deficit funzionale delle NT o dei loro recettori, e molti risultati ottenuti sia da studi sugli animali che sull'uomo supportano quest'ipotesi. Negli ultimi anni, studi *post-mortem* su pazienti depressi hanno documentato una riduzione del volume di alcune regioni corticali ed

ippocampali (Manji H.K. et al., 2000; Rajkowska G., 2000), con riduzione nel numero sia dei neuroni che delle cellule gliali (Ongur D. et al., 1998; Rajkowska G. et al., 1999). In queste zone corticali è stata conservata una riduzione non solo nel numero ma anche nella dimensione dei neuroni (Rajkowska G. et al., 1999). La riduzione del numero delle cellule gliali fa escludere un coinvolgimento di una risposta infiammatoria nella perdita neuronale (in tal caso si osserverebbe un aumento del numero di cellule della glia associato a gliosi), mentre l'aspetto atrofico delle popolazioni cellulari suggerisce l'innescarsi di fenomeni di morte cellulare per apoptosi. Ne segue che la ridotta neurosecrezione, ritenuta inizialmente responsabile della patologia depressiva, potrebbe essere interpretata come conseguenza di una ridotta funzionalità cellulare, successiva ad uno stato di malessere cellulare ed all'interruzione/riduzione di importanti cascate di traduzione del segnale. Altri studi *post-mortem* hanno riscontrato che in soggetti depressi trattati con antidepressivi i livelli proteici di BDNF nell'ippocampo sono maggiori rispetto a quelli misurati in soggetti non trattati (Chen B. et al., 2001). Inoltre è stata notata una riduzione dei livelli di BDNF nel siero di soggetti affetti da depressione (Karege F. et al., 2002).

La ricerca ora in corso ha come scopo quello di capire se alcune neurotrofine hanno ruoli terapeutici potenziali nel ridurre o nell'impedire la perdita dei neuroni e delle cellule gliali e l'atrofia che si presenta nella maggior parte di queste patologie. L'uso dei fattori neurotrofici come agenti terapeutici è un nuovo approccio per ristabilire e mantenere la funzione ottimale del SNC. I fattori neurotrofici potrebbero essere potenzialmente molto utili per la protezione dei neuroni o per riparare i neuroni danneggiati. Tuttavia, alcuni problemi rimangono irrisolti, in particolar modo quelli relativi alla somministrazione di queste molecole, poiché la regione target del SNC è difficile da raggiungere. Le molecole native hanno infatti una diffusione limitata e sembra non possano attraversare la barriera ematoencefalica; tentativi futuri dovrebbero, pertanto, includere metodi indiretti, ad esempio innesti delle cellule adatte che secernono il fattore neurotrofico o l'utilizzazione di piccole molecole che stimolano l'espressione di BDNF o attivano il suo recettore (Tapia-Arancibia L. et al., 2004).

1.10 Farmaci antidepressivi e loro azione su BDNF

Gli antidepressivi sono farmaci con struttura chimica e azioni farmacologiche assai diverse, che vengono accomunati per l'effetto sul tono dell'umore. Sulla base del meccanismo d'azione è possibile individuare numerose classi di farmaci antidepressivi:

1. inibitori delle monoamminossidasi (IMAO);
2. inibitori non selettivi della ricaptazione delle monoamine (antidepressivi triciclici, ATC);
3. inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI);
4. inibitori selettivi della ricaptazione della noradrenalina (NARI);
5. inibitori misti (SNRI);
6. inibitori recettoriali (NASSA).

Il meccanismo d'azione di questi farmaci (aumentata disponibilità dei neurotrasmettitori) è un evento acuto che si manifesta entro minuti od ore dalla loro somministrazione; questo non si concilia con la realtà clinica in cui occorrono da settimane a mesi di trattamento continuato con farmaci per ottenere una risposta adeguata.

In letteratura si trovano molti lavori effettuati sia su animali che su soggetti umani, i quali dimostrano come la somministrazione cronica di antidepressivi determini un aumento dell'espressione di BDNF a livello centrale, ed un aumento delle sue concentrazioni ematiche. Per quanto riguarda gli studi condotti su animali, notiamo che sia trattamenti a lungo termine con antidepressivi (Nibuya M. et al., 1995; Duman R.S. and Vaidya V.A., 1998; Malberg J.E. et al., 2000), che la terapia elettroconvulsiva (Nibuya M. et al., 1995; Duman R.S. and Vaidya V.A., 1998) determinano un aumento dell'espressione di BDNF nel cervello di ratto. Inoltre, sempre in uno studio su animali nel quale viene indotto uno stato di ansia tramite privazione di etanolo, è stato visto che la somministrazione di fluoxetina (inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina) antagonizza la diminuzione

dell'espressione di BDNF che si ha normalmente nell'animale sottoposto a questo tipo di stress (Pandey S.C. et al., 1995).

In soggetti umani, studi *post-mortem* su pazienti depressi trattati con antidepressivi mostrano un incremento dell'espressione di BDNF nell'ippocampo rispetto a soggetti depressi non trattati (Chen B. et al., 2001).

Più recentemente sono stati effettuati dei lavori per valutare la concentrazione di BDNF nel circolo sanguigno. Da questi è emerso che i livelli sierici di BDNF di pazienti depressi non trattati sono inferiori rispetto a quelli riscontrati in pazienti depressi trattati con antidepressivi (Shimizu E. et al., 2003). Tra gli antidepressivi utilizzati negli esperimenti sopra citati ritroviamo inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI), inibitori selettivi della ricaptazione della norepinefrina e inibitori non selettivi della ricaptazione delle monoamine (triciclici). Questi diversi tipi di farmaci antidepressivi, inibendo la ricaptazione delle amine dalle terminazioni nervose, provocano un accumulo di queste molecole nello spazio sinaptico e quindi un maggior tempo d'azione di questi neurotrasmettitori, con conseguente miglioramento del tono dell'umore.

A livello molecolare ciò che succede è che la serotonina (5-hydroxytryptamine, 5-HT) e la norepinefrina (NE), attraverso il legame con i loro rispettivi recettori, provocano un aumento della concentrazione di cAMP ("Cyclic Adenosine MonoPhosphate") che induce l'attivazione della Protein Kinase C ("PKC"), la quale a sua volta fosforila, attivandolo, il fattore di trascrizione CREB ("cAMP response element binding"). CREB, come è stato precedentemente descritto, attiva anche la trascrizione del gene *BDNF*, favorendo la plasticità e la sopravvivenza neuronale (Duman R.S., 1998; Roseboom P.H. et al., 1995; Lin R.Z. et al., 1998; Markstein R. et al., 1999; Lambert H.W. et al., 2001). A conferma di questa teoria esistono diversi lavori, dai quali è risultato che il trattamento con antidepressivi provoca un aumento dei livelli di CREB nell'ippocampo di ratto (Nibuya M. et al., 1996); inoltre nella corteccia di pazienti depressi non trattati i livelli di CREB e di CREB fosforilato sono inferiori rispetto a quelli misurati in pazienti depressi trattati con antidepressivi (Dowlatshahi D. et al., 1998). È stato visto che il trattamento cronico con antidepressivi aumenta la neurogenesi ippocampale provocando una regolazione

positiva di cAMP e della via di trasduzione del segnale delle NT. Inoltre studi *in vitro* e *in vivo* dimostrano che CREB e BDNF sono mediatori fondamentali della risposta terapeutica agli antidepressivi (D'Sa C. and Duman R.S., 2002).

1.11 Un inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina: la paroxetina

L'interesse per gli effetti neuroplastici dimostrati su modelli animali dagli antidepressivi ha portato a considerare le opportunità cliniche di un loro uso a lungo termine anche sulla base delle loro specifiche affinità recettoriali, per il suo eventuale indice terapeutico nei pazienti depressi e/o con disturbi d'ansia. La paroxetina (SSRI) è un derivato fenilpiperidinico (Fig.11) ed è stata registrata in Italia nel 1992. I più

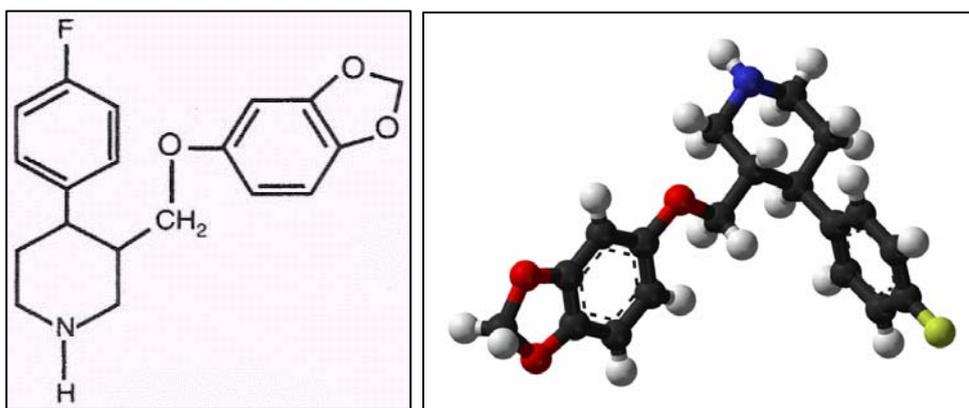


Figura 11. (sinistra): formula della paroxetina [(3*S*,4*R*)-3-[(2*H*-1,3-benzodioxol-5-yloxy)methyl]-4-(4-fluorophenyl)piperidine] - C₁₉H₂₀FNO₃.

(destra): conformazione spaziale a balls and sticks. In rosso: atomi di ossigeno; in blu: atomo di azoto; in giallo: atomo di fluoro; in bianco: atomi di idrogeno; in nero: scheletro di carbonio.

comuni farmaci a base di paroxetina sono il Sereupin ed il Paxil, sia in compresse che in gocce.

Il suo utilizzo è stato approvato per

la cura della depressione e di alcuni disturbi d'ansia che comprendono il disturbo d'ansia generalizzata, la fobia sociale, il disturbo di panico, il disturbo ossessivo compulsivo ed il disturbo da stress post-traumatico. È frequente che questo antidepressivo trovi impiego anche nel trattamento del disturbo disforico premenstruale e nella cura della cefalea cronica. Le conoscenze sugli aspetti farmacologici della paroxetina hanno presentato nel corso degli ultimi anni un'interessante evoluzione. Una ricerca (Gilmor M.L. et al., 2002) sembra aver modificato, infatti, un'opinione radicata nel tempo e secondo cui l'azione clinica della paroxetina veniva riferita

esclusivamente alla sue proprietà di inibitore selettivo del trasportatore della serotonina. I risultati di uno studio su soggetti con depressione maggiore hanno portato a ridefinire con maggiore precisione le proprietà farmacodinamiche della paroxetina, ne hanno ribadito le sue capacità di potente inibitore della ricaptazione di serotonina ed hanno sottolineato il suo primato di inibizione della ricaptazione della noradrenalina, *in vivo*, rispetto a qualsiasi altro SSRI (De Vane C.L., 2003). Un ampliamento del profilo farmacologico di un farmaco può modificare, entro certi limiti, il significato clinico e le sue applicazioni terapeutiche. Tra i farmaci SSRI, la paroxetina presenta, pertanto, la molecola con il più alto rapporto di inibizione della ricaptazione di noradrenalina rispetto alla serotonina, con una generale ridotta affinità per il sistema catecolaminergico, dopaminergico e istaminergico. Queste caratteristiche le consentono di garantire una buona tollerabilità per la sua scarsa tendenza a produrre effetti indesiderati a carico del SNC e autonomo, al contrario di quanto descritto con antidepressivi tricicli. Tuttavia alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato che tra gli SSRI la paroxetina presenta la maggiore affinità per i recettori muscarinici M3, e questo potrebbe favorire il rischio di effetti indesiderati come ad esempio la ritenzione urinaria e la stipsi. In dosaggi terapeutici la sua attività antistaminica, l'affinità per i recettori colinergici o di blocco per i recettori α e β adrenergici si mantiene ampiamente ridotta rispetto a quella dimostrata dai farmaci triciclici. Anche se con una potenza 15 volte inferiore a quella descritta per l'amitriptilina, la paroxetina presenta un'attività anticolinergica che può spiegare l'occasionale proprietà sedativa e giustifica l'assenza di diarrea durante la sua terapia. La paroxetina rappresenta l'inibitore più potente della 5-HT, anche se con una breve emivita, ed è l'unico antidepressivo che determina il blocco totale del trasportatore per la 5-HT già dopo una singola somministrazione (Brunello N., 2004). Questa molecola presenta inoltre il più alto indice di affinità per il trasportatore umano della serotonina rispetto a tutti gli altri farmaci della sua classe. L'efficacia della paroxetina nei disturbi d'ansia e nella depressione è una realtà clinica ampiamente documentata nel corso degli ultimi 10 anni da numerose ricerche cliniche controllate e da importanti studi di revisione.

SCOPO DELLA TESI

È stato postulato che la depressione è associata ad una diminuita concentrazione sinaptica delle monoammine, in particolar modo di serotonina e norepinefrina (Leonard B.E., 2001). Infatti gli effetti negativi sull'umore potrebbero essere diminuiti dall'inibizione della ricaptazione di questi neurotrasmettitori da parte del terminale assonico pre-sinaptico (Hyttel J., 1994), risultato raggiunto dalla somministrazione dei cosiddetti inibitori della ricaptazione, usati correntemente per il trattamento della depressione: gli inibitori della ricaptazione della serotonina e della noradrenalina (SNRI – "Serotonine and Noradrenaline Reuptake Inhibitors"). Gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI – "Selective Serotonine Reuptake Inhibitors") riducono la ricaptazione della serotonina in modo selettivo, determinando un aumento della neurotrasmissione serotonergica.

Tuttavia, poichè circa 20%-30% dei pazienti sono resistenti alle odierne terapie farmacologiche e poichè esiste un intervallo di 2-3 settimane tra la somministrazione dei farmaci e l'efficacia terapeutica, è necessario studiare nuovi meccanismi che conducono alla depressione affinché vengano sviluppati farmaci nuovi e più efficaci. L'intervallo di tempo dell'azione terapeutica è stato attribuito a meccanismi neuroadattativi che coinvolgono una serie di eventi tra cui cambiamenti nella trasduzione del segnale, modulazione dell'espressione genica e stimolazione della neurogenesi (Santarelli L. et al., 2003; Castrèn E., 2005; Berton O. and Nestler E.J., 2006; Duman R.S. and Monteggia L.M., 2006).

Tra tutti i geni coinvolti, BDNF ha destato maggiore interesse a causa del suo coinvolgimento nello sviluppo neuronale e nella sua plasticità (Tongiorgi E., 2008). In modo particolare BDNF, a causa dei suoi effetti a lungo termine sulle sinapsi (Bramhan C.R., 2007), è stato correlato ad una numerosa serie di malattie, tra cui disfunzioni cognitive (Egan M.F. et al., 2003), schizofrenia (Nanko S. et al., 2003), Alzheimer (Phillips H.S. et al, 1991), Parkinson (Liu Q.R. et al., 2005) e depressione (Nakata K. et al, 2003, Tsai S.J. et al., 2003). Un ruolo di BDNF nella depressione è stato ipotizzato a causa della sua stretta relazione con

le monoamine cerebrali (Altar C.A., 1999). BDNF è un potente agente trofico per i neuroni serotonergici (Djalali S. et al., 2005; Luellen B.A. et al., 2007) e studi su soggetti umani hanno dimostrato più volte che i livelli di BDNF sono ridotti durante stati depressivi ma si normalizzano dopo l'assunzione di antidepressivi (Sen S. et al., 2008). Studi condotti sui ratti hanno dimostrato che i livelli di BDNF sono diminuiti nello stress – un importante fattore che peggiora i disordini dell'umore – ed il trattamento antidepressivo cronico può contrastare gli effetti dello stress aumentando l'espressione ippocampale di BDNF (Nibuya M. et al., 1995; Tsankova N.M. et al., 2006; Tardito D. et al., 2006). Inoltre, livelli ridotti di mRNA di BDNF sono stati trovati nel cervello di morti suicidi (con una possibile diagnosi di depressione) (Chen B. et al., 2001). Queste osservazioni suggeriscono che un'aumentata produzione di BDNF sembra essere un fattore cruciale per l'efficacia del trattamento antidepressivo.

Un ruolo cruciale nelle patologie depressive potrebbe essere quello giocato dalle cellule gliali e dal loro ruolo di supporto ai neuroni, come suggerito dalla riduzione del loro numero in differenti patologie psichiatriche (Ongür D. et al. 1998, Rajkowska G. et al 1999, Rajkowska G., 2000). Queste cellule sono inoltre capaci di sintetizzare e rilasciare molti tipi di fattori neurotrofici e/o fattori di crescita, tra cui anche BDNF (Darlington C.L., 2005). È stato visto che nella linea di glioblastoma di ratto, gli antidepressivi sono effettivamente in grado di modulare l'espressione genica inducendo una maggiore produzione del fattore neurotrofico GDNF (Hisaoka K. et al., 2001), mentre sono disponibili pochi dati riguardanti la modulazione di tale espressione da parte di antidepressivi, ed in particolare della paroxetina, uno degli SSRI più utilizzati e con maggiore attività farmacologica, su linee cellulari umane.

Comunque, tranne i neuroni, non si sa molto sulla modulazione di BDNF attraverso gli inibitori della ricaptazione a livello di RNA e proteina in altri tipi cellulari del sistema nervoso centrale. Le cellule gliali sono capaci di produrre e immagazzinare BDNF (Saha R.N., 2006), divenendo così una probabile fonte di proteina per i neuroni del SNC.

MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

La linea cellulare U-87 MG (human glioblastoma-astrocytoma, epithelial-like cell line – Malignant Glioma –) è stata acquistata dall’American Type Tissue Collection (Manassas, VA, U.S.A). Si tratta di cellule a morfologia epiteliale, derivanti da un glioblastoma-astrocitoma del cervello. Il glioblastoma è la più grave forma non differenziata di tumori cerebrali astrocitici, in molti casi resistente alla chemioterapia.

Le cellule U-87 MG sono state cresciute in terreno di coltura Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) a cui è stato aggiunto siero fetale bovino (FBS, Euroclone, Devon U.K.) al 5% (v/v), glutammina all’1% (Euroclone Devon U.K.) e penicillina/streptomina (20 mg/ml) (Invitrogen). La crescita delle cellule è avvenuta in atmosfera umida al 5% di CO₂ alla temperatura di 37°C; due volte a settimana sono state propagate a 5x10⁵ in una fiasca T75. Per staccare le cellule dal fondo della piastra è stata utilizzata tripsina (Ca²⁺ e Mg²⁺-free, Euroclone, Devon U.K.). La conta delle cellule vitali è stata effettuata utilizzando il colorante Trypan-Blue (0,4% p/v). Tutta la plastiche per colture cellulari è stata acquistata dalla Becton Dickinsons Labware (Bedford, MA, USA).

3.2 Saggio di citotossicità MTS su U-87 MG trattate con paroxetina

Per determinare la concentrazione citotossica della paroxetina, le cellule sono state piastrate in 100 µl di terreno di coltura su piastre da 96 pozzetti (4000 cellule/pozzetto). Dopo 24 ore queste sono state trattate con paroxetina a diverse concentrazioni (0,75 µM, 1,5 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM) per 48 ore. Una fila di pozzetti non è stata trattata ed è stata utilizzata come controllo. Per determinare l’effetto citotossico alla fine del periodo di incubazione col farmaco, è stato effettuato il saggio colorimetrico MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell

Proliferation Assay, Promega). Il test si basa sull'utilizzo del composto tetrazolico di colore giallo MTS (3-(4-5-dimetiltiazol-2-yl-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolo) il quale viene bioridotto all'interno delle cellule formando

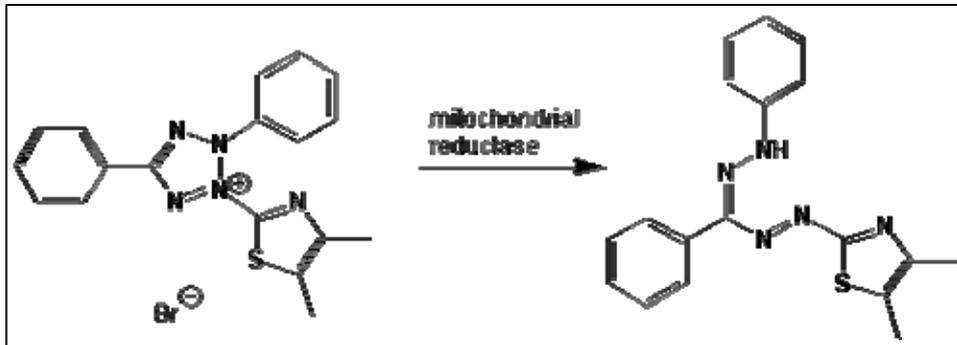


Figura 12. Meccanismo di riduzione dell'MTS in formazano.

un prodotto

color porpora, detto formazano (Fig.12), che è solubile nel terreno di coltura.

La conversione a formazano è permessa dagli enzimi cellulari deidrogenasi che producono NADPH o NADH in cellule metabolicamente attive. La quantità di formazano prodotta viene misurata allo spettrofotometro dall'assorbanza letta a 490 nm, che sarà direttamente proporzionale al numero di cellule vive in coltura. La piastra è stata incubata per 2 ore a 37°C al 90% di umidità e 5% di CO₂ e successivamente è stata misurata l'assorbanza a 490 nm usando lo spettrofotometro Sirio-S (SEAC, Radim Group).

3.3 Trattamento farmacologico

Per studiare gli effetti della paroxetina sull'espressione di BDNF, le cellule U-87 MG sono state trattate per diversi tempi (6 h, 12 h, 24 h, 48 h) con il farmaco paroxetina (SIGMA) alla concentrazione finale di 7 µM. La paroxetina, sciolta in dimetilsolfossido (DMSO), è stata aggiunta al terreno di coltura, mentre a quello delle cellule di controllo è stata aggiunta una pari quantità di DMSO in modo da avere le medesime condizioni di crescita. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

3.4 Estrazione dell'RNA dalle cellule

Tutti i passaggi nei quali si è lavorato con l'RNA sono stati effettuati in contenitori privi di RNasi e sono state utilizzate sempre soluzioni preparate in acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma), per evitare la degradazione dell'acido ribonucleico ad opera delle ribonucleasi. Il dietilpirocarbonato è, infatti, un potente inibitore delle RNasi che agisce legandosi alle lisine ed istidine dell'enzima, modificandone la conformazione e alterando quindi la sua completa funzionalità.

Per estrarre l'RNA totale è stato utilizzato il metodo semplificato della guanidina tiocianato di Cromczynski-Sacchi. In particolare, è stato utilizzato 1 ml di Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) per ogni milione di cellule. La miscela, dopo esser stata pipettata ripetutamente con una siringa per lisare le cellule, è stata lasciata per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi ribonucleoproteici. Sono stati poi aggiunti 0,2 ml di cloroformio e, dopo una vigorosa agitazione di 15 secondi, i campioni sono stati lasciati per 3 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugati a 12.000 xg per 15 minuti a 4°C. In questo modo la miscela si è separata in 3 fasi:

- una fase organica rosa contenente le proteine,
- un'interfase contenente DNA;
- una fase acquosa superiore incolore contenente l'RNA.

Quest'ultima fase è stata recuperata e vi sono stati poi aggiunti 0.5 ml di isopropanolo 100%. Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente, la soluzione è stata centrifugata a 12.000 xg per 10 minuti a 4°C, in modo da ottenere la precipitazione dell'RNA. Il pellet di RNA è stato lavato aggiungendo 1 ml di etanolo 75% per ogni ml di Tri-Reagent utilizzato ed è stato centrifugato a 7500 xg per 5 minuti a 4°C. Eliminato il surnatante, il pellet di RNA è stato lasciato asciugare all'aria per circa 15 minuti. L'RNA è stato infine risospeso in 20 µl di H₂O DEPC scaldando la provetta per 10 minuti a 60°C.

3.5 Analisi dell'RNA utilizzando lo spettrofotometro e verifica della sua integrità tramite corsa su gel d'agarosio

1 µl di RNA estratto è stato diluito 1:100 (v/v) in H₂O DEPC e quantizzato allo spettrofotometro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, CELBIO S.p.A.). La lettura è stata effettuata alla lunghezza d'onda (λ) di 260 nm, alla quale assorbono le basi eterocicliche degli acidi nucleici. La concentrazione dell'RNA, espressa in µg/ml, è stata ottenuta utilizzando la seguente formula:

$$[\text{RNA}]_{260\text{nm}} (\mu\text{g/ml}) = \text{Assorbanza } (A)_{260\text{nm}} \times 40 (\mu\text{g/ml}) \times (\text{reciproco della diluizione})$$

Ovvero, nel nostro caso specifico:

$$[\text{RNA}]_{260\text{ nm}} = A_{260\text{nm}} \times 40 (\mu\text{g/ml}) \times 100$$

Inoltre, per verificare l'assenza di contaminanti organici (per esempio il fenolo) e di contaminazioni proteiche, è stata effettuata anche una misurazione a 280 nm, alla quale assorbono gli aminoacidi aromatici (tirosina, fenilalanina e triptofano) delle proteine.

Un RNA privo di tali contaminanti presenta un rapporto $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ tra 1.7 e 2.0. L'analisi allo spettrofotometro non permette, invece, di verificare l'assenza di DNA genomico contaminante, in quanto questo assorbe alla stessa lunghezza d'onda dell'RNA, causando anche una sovrastima di quest'ultimo. Per questo è stata effettuata un'elettroforesi dei campioni su gel d'agarosio all'1% (caricando 1 µg di RNA). Infatti, il DNA genomico, per le sue elevate dimensioni, rimane intrappolato nei pozzetti del gel e si può distinguere dall'RNA, in quanto quest'ultimo migra nel gel. L'elettroforesi è stata effettuata in camere Mini-Sub Cell GT (BioRad) ad un voltaggio costante di 120 Volts per circa 20 minuti.

Tale analisi permette anche di controllare la qualità dell'RNA estratto. Questo presenta, all'analisi al transilluminatore ad UV (BioRad), 3 bande di RNA corrispondenti agli RNA ribosomali (rRNA) 28S, 18S e 5S. Un RNA di buona qualità

deve avere un'intensità della banda dell'rRNA 28S circa doppia di quella del 18S, mentre la banda relativa all'rRNA 5S è la meno intensa. Per contro, un RNA degradato presenta, oltre ad una maggiore intensità delle bande 5S e 18S, anche un segnale diffuso tra le bande (smear).

3.6 Retrotrascrizione dell'RNA cellulare

La reazione di retrotrascrizione è stata eseguita utilizzando il kit di retrotrascrizione "First Strand Synthesis System For RT-PCR" (Invitrogen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta, che prevede un volume finale di reazione di 20 µl in cui a 5 µg di RNA totale vengono aggiunti 1 µl di oligo(dT)₂₀ (50 µM), 1 µl di dNTP mix (10 mM) e 13 µl di acqua sterile distillata trattata con DEPC. La miscela viene quindi incubata per 5 minuti a 65°C per denaturare le strutture secondarie dell'RNA, quindi viene lasciata per 1 minuto in ghiaccio per permettere l'appaiamento dell'oligo-dT con l'RNA. Questi oligo-dT, che fungono da primer nella reazione di retrotrascrizione, si appaiano con le code di poliA dei trascritti, facendo in modo che la sintesi di cDNA coinvolga selettivamente solo gli mRNA, la cui quantità totale ammonta a circa 1,5-2% dell'RNA totale. A questo punto si aggiungono alla miscela di reazione, tenuta in ghiaccio, i seguenti reagenti:

1. 4 µl di 5X First-Strand Buffer
2. 1 µl di DTT 0,1 M
3. 1 µl di inibitore di RNasi RNaseOUTTM Recombinant RNase Inhibitor (40 U/ µl)
4. 1 µl di enzima SuperScriptTM III RT (200 unità/ µl)

La soluzione è stata poi incubata a 50°C per 60 minuti ed infine l'enzima viene inattivato scaldando a 70°C per 15 minuti.

Per quanto riguarda la retrotrascrizione di RNA per le analisi sui microRNA, sono stati utilizzati oligo random-primer invece che oligo dT, poiché i miR non

possiedono le code di poli-A a cui gli oligo dT si appaiano. Il protocollo seguito è stato il medesimo.

Alla fine della reazione di retrotrascrizione si ottiene un pool di cDNA da utilizzare nella fase successiva.

3.7 PCR Real-Time su mRNA e microRNA

La PCR Real Time (RT-PCR) permette di monitorare e quantificare il prodotto amplificato in tempo reale (real time, appunto), ad ogni ciclo, durante la fase esponenziale della reazione. Il principio della PCR Real Time è basato sull'amplificazione del cDNA d'interesse che viene quantificato grazie ad una molecola fluorescente che emette un segnale proporzionale al prodotto amplificato. Registrando la fluorescenza ad ogni ciclo è possibile controllare la reazione durante la fase esponenziale. Più alto è il numero di copie iniziali del template, minore è il ciclo a cui si osserverà un aumento della fluorescenza. Il CT (threshold cycle; ciclo soglia) è il parametro che definisce il numero di cicli necessari affinché la fluorescenza emessa superi il segnale di fondo ("baseline") e indica quindi l'inizio della fase esponenziale della reazione di PCR.

La PCR Real Time per la quantificazione di BDNF totale è stata eseguita usando la strumentazione Mx3005P™ (Stratagene). Per la rilevazione dell'amplificato è stato utilizzato il SYBR Green I, uno specifico marcatore per DNA a doppio filamento (dsDNA). Tale colorante è una cianina asimmetrica che lega la sequenza in corrispondenza del solco minore del dsDNA e la sua affinità di legame è 100 volte maggiore rispetto a quella del bromuro d'etidio. La fluorescenza del SYBR Green I legato al DNA è 1000 volte maggiore rispetto a quella evidenziabile quando il colorante è libero; quindi è un ottimo indicatore della quantità di prodotto accumulato durante la PCR. La sua emissione, che ha un massimo a 512 nm ed è quindi comparabile a quella della fluoresceina, avviene in seguito ad eccitazione per mezzo di una luce blu ad una lunghezza d'onda di 480 nm (Fig.13).

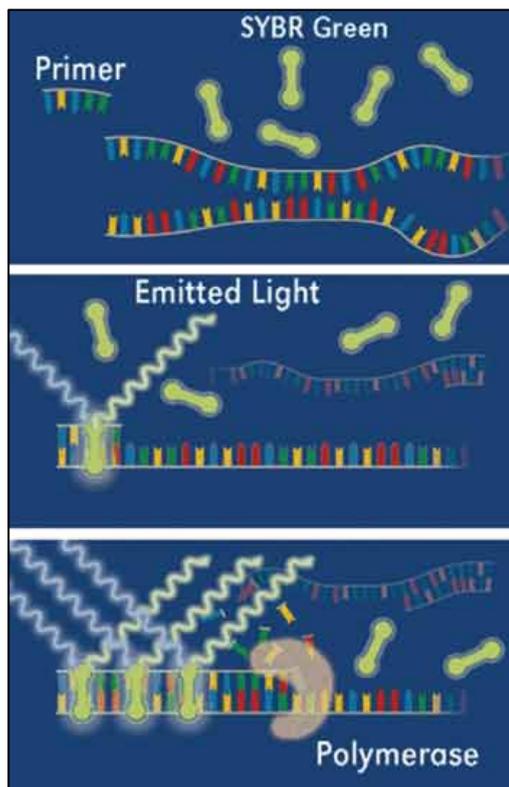


Figura 13: Principio di funzionamento del colorante fluorescente per RT-PCR SYBR[®] Green I.

Il volume totale di ciascuna reazione di Real Time PCR è di 20 µl contenenti:

1. 0,5 µl di cDNA;
2. 300 nM di ciascun primer (Primm srl) dell'mRNA di BDNF e 150 nM dei primer (Primm srl) della β-actina:

BDNF Senso - AAACATCCGAGGACAAGGTG

BDNF Antisenso - AGAAGAGGAGGCTCCAAAGG

β-actina Senso - CTCTTCCAGCCTTCCTTC

β -actina Antisenso - TGTTGGCGTACAGGTCTT

3. 10 µl di SYBR[®] Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems);
4. H₂O per portare a volume.

Le condizioni termiche del ciclo di amplificazione sono le seguenti:

1. 5 minuti a 95°C;
2. 40 cicli a 95°C per 30 secondi, 58°C per 30 secondi e 72°C per 45 secondi sia per BDNF che β-actina.

Infine, per confermare l'assenza di prodotti di amplificazione contaminanti o di dimeri formati dagli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione, è stata effettuata una curva di dissociazione. Se è presente un solo prodotto di amplificazione, si osserverà un calo brusco di fluorescenza alla temperatura di denaturazione del doppio filamento amplificato. Se, oltre al nostro prodotto, ve ne sono altri, si osserverà più di un calo del segnale fluorescente.

La quantificazione dei risultati ottenuti con la PCR Real Time è stata determinata con il metodo comparativo $\Delta\Delta CT$. Questo metodo implica il confronto dei valori di CT del campione da esaminare con quelli del controllo (nel nostro caso, le cellule U87 non trattate con il farmaco). I due valori di CT sono normalizzati secondo i valori di un gene housekeeping endogeno, nel nostro caso è stata utilizzata la β -actina.

Per quanto riguarda invece la quantificazione dei miR, è stata utilizzata la tecnica e i reagenti TaqMan[®] (Applied Biosystems).

La tecnica per RT-PC chiamata TaqMan[®] prende il nome dalle sonde TaqMan[®], copyright della ditta Applied Biosystems. Le sonde TaqMan sono oligonucleotidi più lunghi dei primer (lungi 20-30 basi con una T_m di 10°C più alta di quella dei primer) che contengono un colorante fluorescente sulla base al 5' (chiamato "reporter"), e un colorante silenziatore ("quencher"), tipicamente sulla base al 3'. Quando irradiato, piuttosto che emettere, il colorante fluorescente eccitato trasferisce energia alla vicina molecola di quencher (questo fenomeno è chiamato FRET= Fluorescence Resonance Energy Transfer). La stretta vicinanza del reporter e del quencher previene l'emissione di ogni fluorescenza quando la sonda è intatta. Le sonde TaqMan sono disegnate per appaiarsi ad una regione interna del prodotto di PCR. Quando la polimerasi duplica un template sul quale è legato una sonda TaqMan, l'attività 5' esonucleasica taglia la sonda. Ciò spegne l'attività del quencher ed il reporter comincia ad emettere una quantità di fluorescenza che aumenta ad ogni ciclo in maniera proporzionale alla percentuale di sonda tagliata. L'accumulo dei prodotti di PCR viene determinata dal monitoraggio dell'aumento della fluorescenza del reporter.

La reazione con sonde TaqMan utilizza parametri di reazione e condizioni di PCR universali. Poiché il taglio avviene solo se la sonda è ibridizzata al target, la fluorescenza rilevata origina solo da amplificati specifici. Il ciclo soglia o valore di Ct è il ciclo al quale si osserva il primo significativo aumento della fluorescenza. Il ciclo soglia si verifica quando il sistema di rivelazione inizia a captare un aumento nel segnale associato ad una crescita esponenziale dei prodotti di PCR durante la fase logaritmica-lineare.

Per la quantificazione dei miR è stato utilizzato un volume totale di 20 μ l costituito da:

1. mix TaqMan[®] (Applied Biosystems) 1X;
2. mix di probe (Applied Biosystems) specifici sia per miR 30a che U6 (vedi oltre);
3. 1,5 μ l di cDNA ottenuto con procedimento specifico per miR (vedi sopra).

Il termociclatore utilizzato è Mx3005P[™] (Stratagene). I campioni sono stati corsi in triplicato ed il profilo termico usato è: 95 °C per 10 minuti seguito da 40 cicli di 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 1 minuto.

I probe TaqMan utilizzati per quantificare l'espressione del miR sono quelli specifici per il miR d'interesse, ovvero miR-30a-5p, e per un altro miR (miR-U6), che è considerato un housekeeping poiché è costitutivamente espresso. Il termociclatore calcola automaticamente il rapporto tra i due miR, eliminando in questo modo l'errore di pipettaggio. Ognuno dei tre esperimenti indipendenti è stato quindi effettuato in triplicato e per entrambi questi miR.

Per analizzare i dati abbiamo usato la quantificazione relativa. Questo metodo descrive il cambiamento nell'espressione del gene target relativo a gruppi di controllo, come i campioni non trattati (Zhao S. and Fernald R.D., 2005). L'utilizzo della PCR Real Time per quantificare i cambiamenti relativi nell'espressione genica richiede determinate equazioni per analizzare correttamente i dati. Il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ può essere usato per calcolare i cambiamenti relativi nell'espressione genica tramite esperimenti di PCR Real Time quantitativa.

$$-\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{housekeeping}})_{\text{Tempo x}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{housekeeping}})_{\text{Tempo 0}}$$

Questa equazione si riferisce ad una efficienza del 100% della reazione di PCR, dove l'incremento del prodotto di PCR ad ogni ciclo è pari a 2. Ct è il ciclo-soglia, ed indica la frazione di ciclo alla quale la quantità di target amplificato raggiunge una soglia fissa. Cosicché $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indica la quantità di target, normalizzato rispetto ad un gene endogeno di riferimento e relativo ad un calibratore.

3.8 Saggio ELISA

I livelli di proteina BDNF nel terreno di coltura e nel lisato cellulare sono stati determinati utilizzando il DuoSet ELISA secondo le istruzioni della casa produttrice (R&D Systems, Europe, Ltd.). Questo kit ELISA è progettato per misurare BDNF maturo nel terreno di coltura cellulare. La minima quantità di proteina individuabile è < 4 pg/ml. Una micropiastra da 96 pozzetti è stata ricoperta con 100 µL per pozzetto di Capture Antibody diluito in PBS, dopo di che è stata incubata per tutta la notte a temperatura ambiente. Ogni pozzetto è stato poi lavato con un Buffer di lavaggio (400 µL) per tre volte. Successivamente sono stati aggiunti 300 µL di Reagent Diluent a ogni pozzetto e si è incubato a temperatura ambiente per un'ora. Dopo un ulteriore lavaggio sono stati aggiunti 100 µL di campione diluito in Reagent Diluent per pozzetto. Dopo un periodo di incubazione di due ore a temperatura ambiente è stato ripetuto il ciclo di aspirazione/lavaggio con Wash Buffer e sono stati aggiunti 100 µL del Detection Antibody, diluito in Reagent Diluent, a ogni pozzetto. La piastra è stata poi incubata due ore a temperatura ambiente e, dopo un lavaggio, sono stati aggiunti 100 µL di soluzione contenente Streptavidin-HRP a ogni pozzetto. Dopo un'ulteriore incubazione di venti minuti a temperatura ambiente, seguita da lavaggio, sono stati aggiunti 100 µL di Substrate Solution a ogni pozzetto. A questo punto la piastra è stata incubata per altri venti minuti a temperatura ambiente e sono stati aggiunti infine 50 µL di Stop Solution a ogni pozzetto. Il segnale fluorescente è stato misurato usando un lettore di micropiastre alla

lunghezza d'onda di 450 nm con una correzione della lunghezza d'onda a 540 nm per avere delle letture più accurate. I risultati sono stati normalizzati per la concentrazione delle proteine totali e quantificata con la metodica di Bradford con albumina serica bovina (BSA) come standard. Ogni misurazione è stata effettuata in duplicato ed espressa in pg/ml. La reattività con altre neurotrofine correlate (NGF, NT-3, NT 4/5) è stata meno del 3%.

Per studiare gli effetti dei SSRI su BDNF di origine gliale, è stata usata la linea cellulare di glioblastoma-astrocitoma umana U-87 trattata con paroxetina in un intervallo di tempo 0-48 ore per valutare le possibili differenze di espressione a livello proteico e di mRNA dopo trattamento farmacologico, così da determinare l'attività di questo farmaco anche su linee cellulari non neuronali. In più, poiché è stato recentemente scoperto che il gene *BDNF* potrebbe essere modulato a livello post-trascrizionale da una famiglia di piccoli mRNA endogeni chiamati microRNA (miRNA) (Mellios N. et al., 2008), è stata anche valutata attraverso la PCR Real Time l'espressione di uno di questi miRNA (miR-30a-5p) nella medesima linea cellulare durante il suo trattamento col farmaco.

RISULTATI

4.1 Scelta dell'intervallo di tempo del trattamento farmacologico

Per determinare il periodo di tempo in cui effettuare il trattamento con la paroxetina, è stata effettuata una curva di crescita delle cellule U-87 MG (Fig.14). Come si osserva dalla figura, le cellule vive entrano in fase di crescita esponenziale a 24 ore e rimangono in tale fase anche dopo 72 ore, senza però un sensibile aumento di percentuale di cellule morte. Per questo motivo si è deciso di iniziare il trattamento farmacologico a 24 ore dal piastramento delle cellule, protraendolo per le successive 24 ore, in modo da ricadere pienamente nella fase di crescita esponenziale.

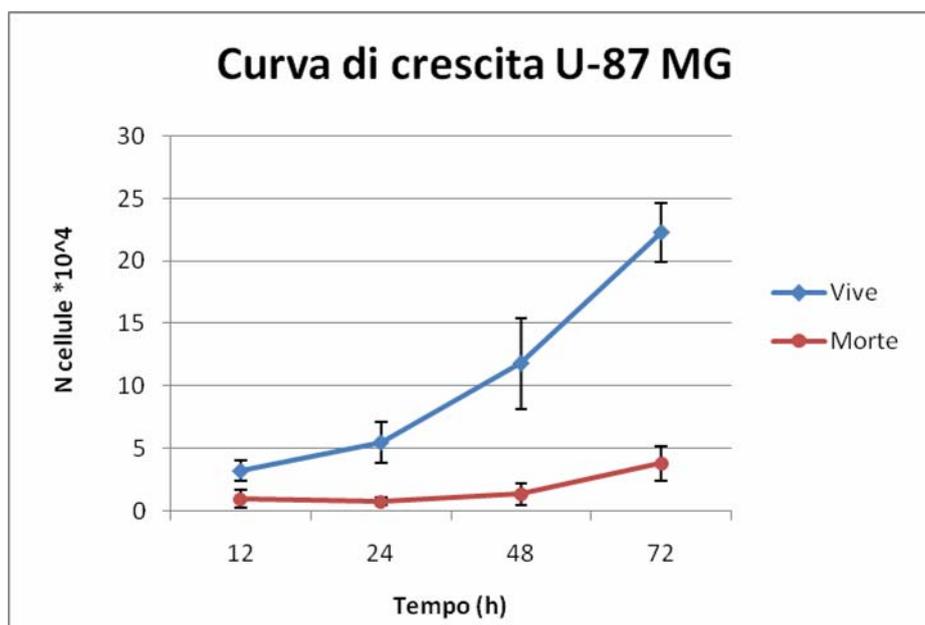


Fig. 14. Curva di crescita U87-MG. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. da tre esperimenti indipendenti.

4.2 Scelta della concentrazione del farmaco

Poiché il farmaco deve portare all'aumento di espressione di BDNF senza essere tossico per le cellule, è stato effettuato un saggio di vitalità cellulare per determinare la concentrazione di farmaco da utilizzare nel trattamento della linea cellulare. Come si osserva dalla figura n. 15, a concentrazioni uguali o superiori a 20 μM la paroxetina risulta essere tossica determinando la morte di circa il 50% delle cellule in coltura. Abbiamo così deciso di utilizzare una concentrazione inferiore di farmaco. In particolare, abbiamo trattato le cellule ad una concentrazione di paroxetina pari a 7 μM , in quanto questa risulta essere relazionabile alle concentrazioni raggiunte dal farmaco nel tessuto cerebrale durante il trattamento antidepressivo.

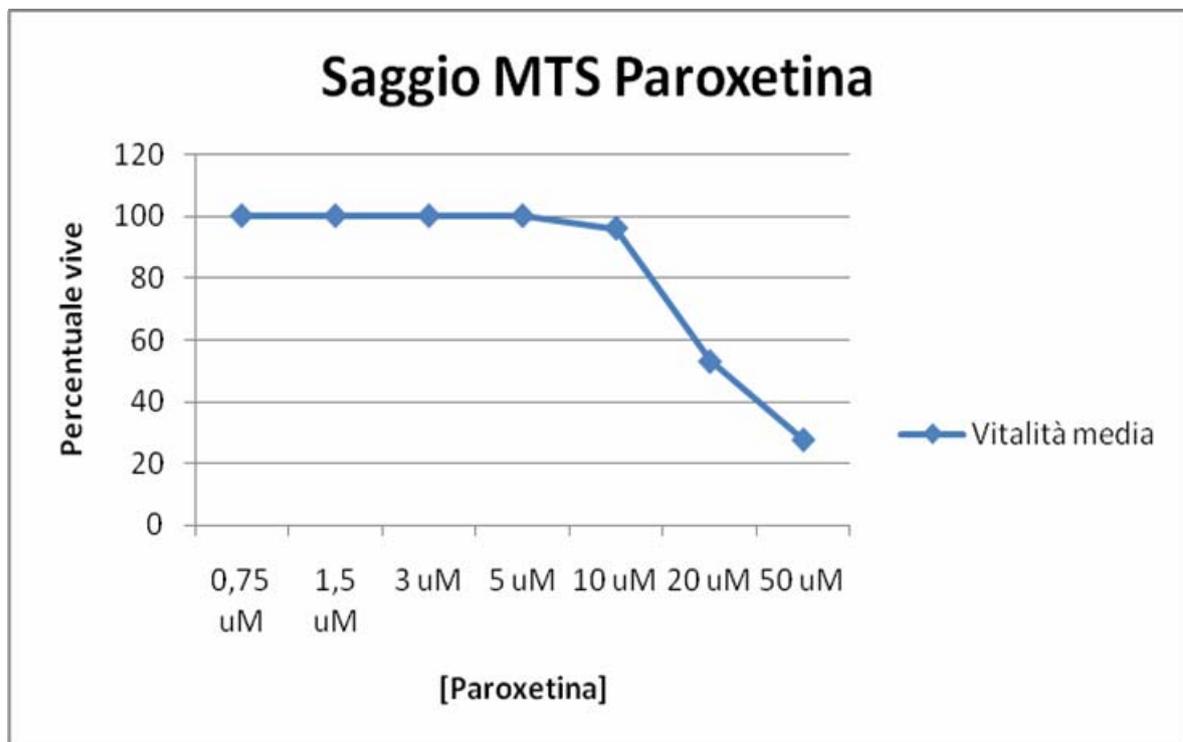


Fig. 15. Saggio MTS su U-87 MG con paroxetina.

4.3 Effetti della paroxetina sulla crescita cellulare

Per verificare che il farmaco non incida sulla crescita cellulare delle U-87 MG, abbiamo effettuato una curva di crescita delle cellule trattate con 7 μM di paroxetina. La curva di crescita risulta paragonabile a quella delle cellule non trattate sia per quanto riguarda le cellule vive che quelle morte, indicando che, alla concentrazione scelta, il farmaco non incide la crescita cellulare (Fig.16).

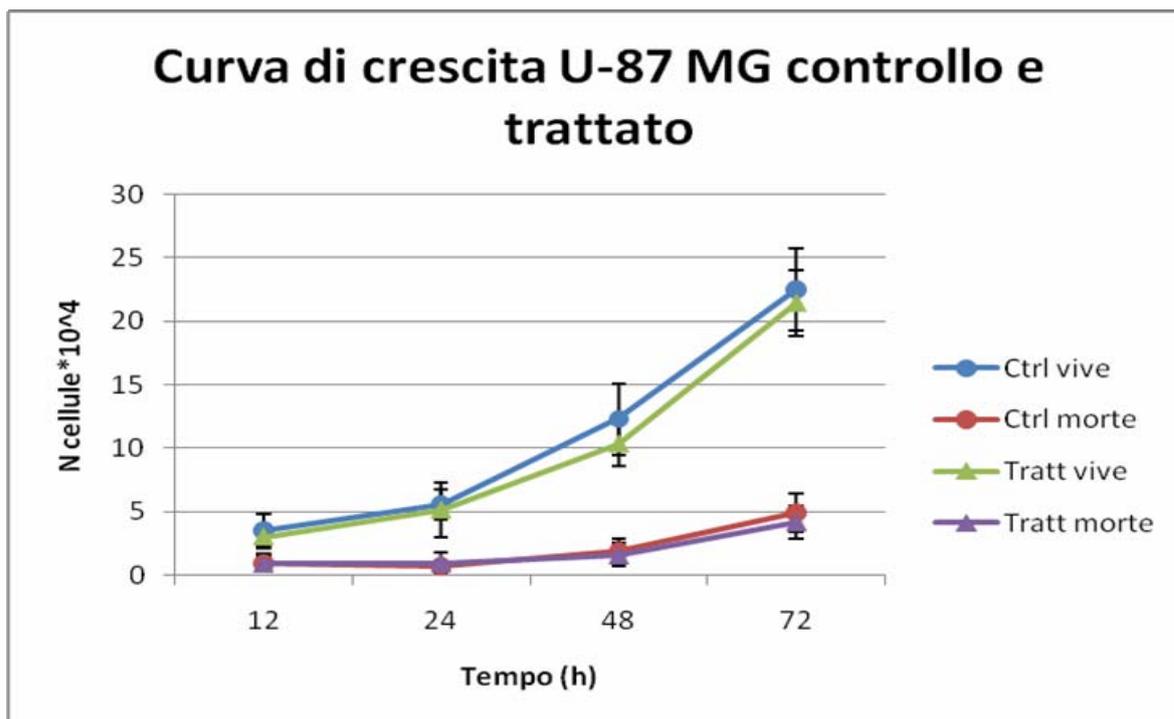


Fig. 16. Curva di crescita di cellule U87-MG trattate con paroxetina 7 μM e di cellule di controllo. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. da tre esperimenti indipendenti.

4.4 Espressione di BDNF dopo trattamento con paroxetina

Per verificare gli effetti della paroxetina sull'espressione di BDNF, le cellule sono state trattate per intervalli di tempo diverso (6, 12, 24 e 48 ore) con 7 μM di farmaco. L'RNA estratto da tali cellule è stato retrotrascritto ed il cDNA di BDNF è stato amplificato mediante PCR Real Time, paragonando i livelli di questo cDNA a quelli di cellule U-87 MG di controllo, cioè non trattate, incubate per gli stessi tempi.

Rapportando la quantità di BDNF nelle cellule trattate a quella nei controlli ai vari tempi, si evidenzia che il trattamento con paroxetina porta ad un precoce aumento dell'espressione di BDNF nelle prime 6 ore. Successivamente, la quantità di cDNA di BDNF torna ad essere simile a quella dei controlli, per poi diminuire leggermente, rispetto ad essi, intorno alle 24 ore. Alle 48 ore di trattamento si può notare un ritorno dell'espressione di BDNF ai livelli delle cellule di controllo.

Il trattamento con paroxetina sembra pertanto portare ad un significativo incremento nell'espressione di BDNF a tempi brevi (Fig.17).

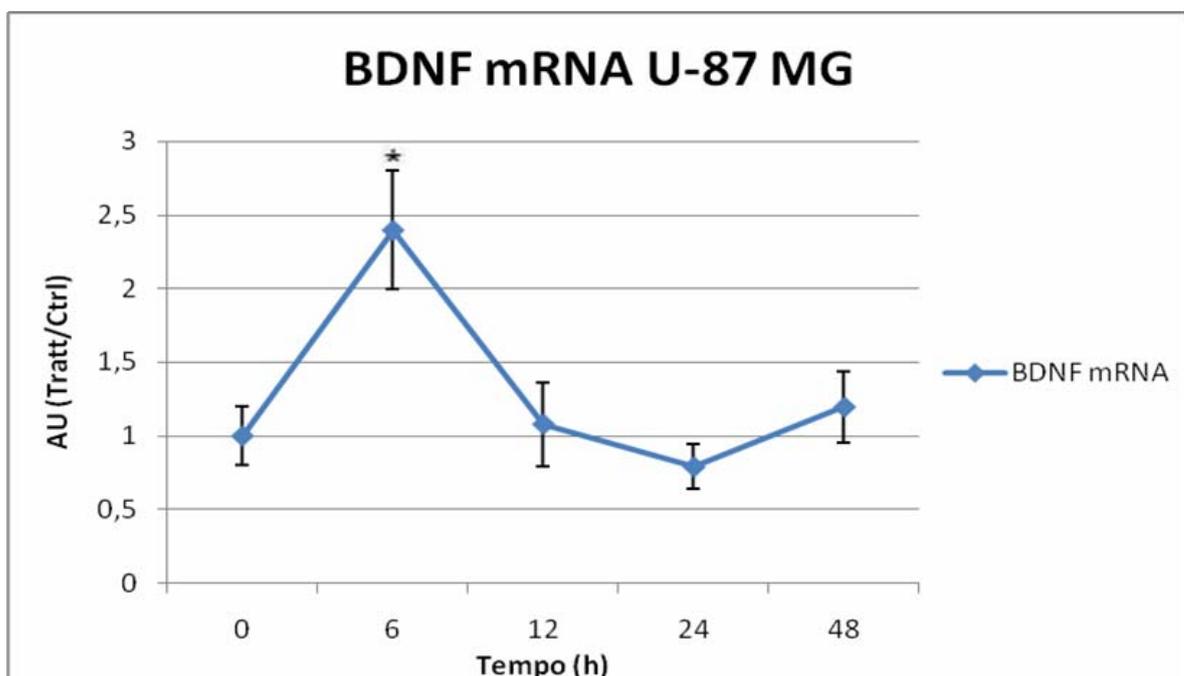


Fig. 17. Effetti del trattamento farmacologico sull'espressione di BDNF nella linea cellulare U-87 MG; (AU = Unità Arbitrarie). I dati sono espressi come media \pm S.E.M. da tre esperimenti indipendenti. Statistica: ANOVA; Bonferroni post-hoc test: * $p < 0,0001$.

4.5 Effetti della paroxetina sull'espressione del miR che regola BDNF

È stato riportato in letteratura che il miR-30a-5p ha un effetto repressivo sulla traduzione del gene *BDNF*. Infatti questo miR ha una sequenza complementare ad un tratto dell'mRNA di BDNF, andando così a generare una sorta di silenziamento del gene e determinando una regolazione molto fine della produzione di proteina. Come si può osservare dalla figura n. 18, vi è un aumento

della produzione di miR-30a-5p a 6 ore di incubazione delle cellule con paroxetina, mentre a 12 ore si manifesta il picco di produzione. A 24 ore si osserva un suo drastico calo, che torna a livelli paragonabili all'mRNA maturo di BDNF (confronta con fig. 17).

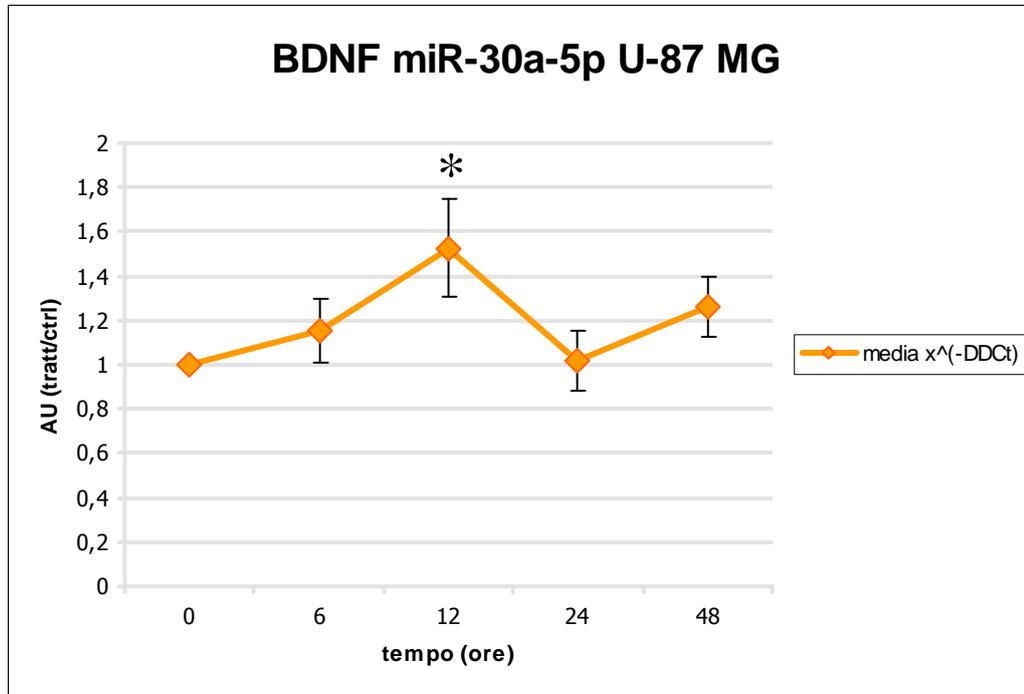


Figura 18. Rapporto tra miR-30a-5p rilevato con PCR Real Time delle cellule U87 MG trattate con paroxetina e cellule di controllo ai vari tempi. (AU = Unità Arbitrarie). I dati sono espressi come media \pm S.E.M. da tre esperimenti indipendenti. Statistica: ANOVA; Bonferroni post-hoc test: *p < 0,0001.

4.6 Produzione e rilascio di BDNF dopo trattamento con paroxetina

In accordo con i dati sull'espressione genica di BDNF, il test ELISA sui pellet cellulari delle U-87 MG mostra un effettivo aumento della produzione della proteina a livello intracellulare a breve termine. Infatti, dalle 6 alle 12 ore dopo il trattamento si osserva un aumento della proteina nelle cellule trattate rispetto a quelle di controllo. I livelli tornano simili a quelli delle cellule di controllo intorno alle 24 e 48 ore.

L'aumentata espressione genica della neurotrofina BDNF indotta dal farmaco risulterebbe pertanto nella successiva sintesi di BDNF a livello intracellulare (Fig.19).

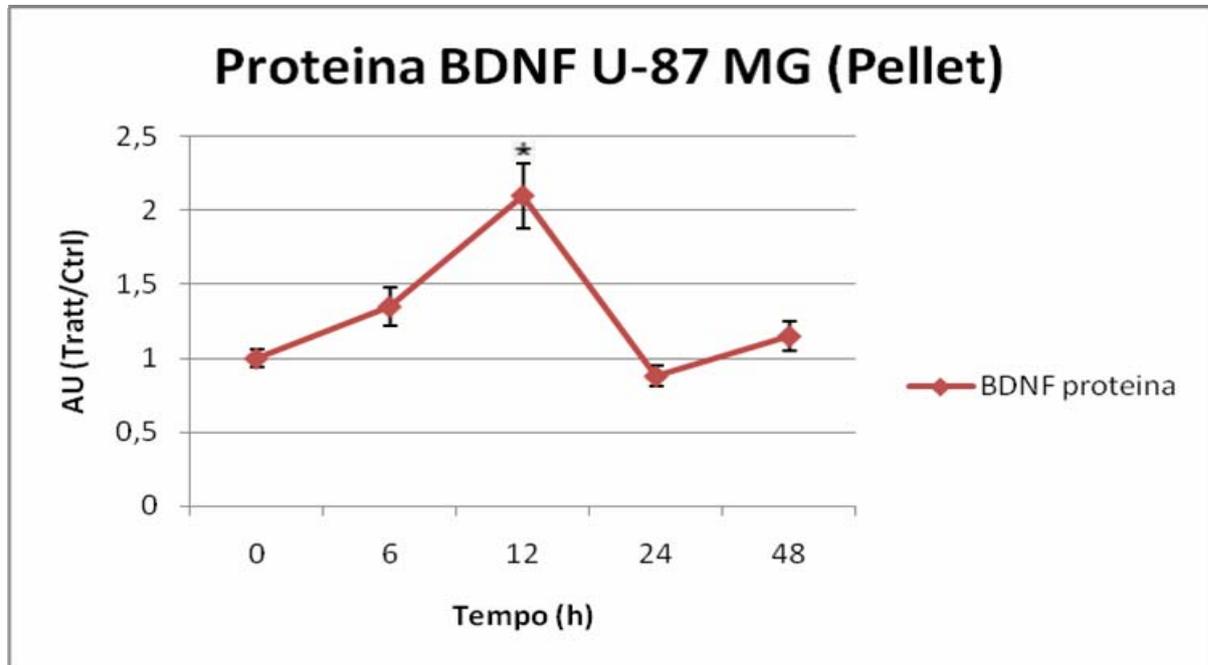


Fig. 19. Effetti del trattamento farmacologico sui livelli di proteina BDNF intracellulare; (AU = Unità Arbitrarie). I dati sono espressi come media \pm S.E.M. da tre esperimenti indipendenti. Statistica: ANOVA; Bonferroni post-hoc test: * $p < 0,0001$.

Siccome, però, BDNF è una proteina che viene secreta dalle cellule, sono stati anche confrontati i livelli di proteina rilasciata nel terreno di coltura. Come mostrato in figura 20, il trattamento con paroxetina induce la secrezione della proteina già dopo 24 ore dal trattamento, quando i livelli di proteina rilasciata dalle cellule di controllo non sono misurabili dal nostro saggio. A 48 ore è possibile misurare la proteina anche dal terreno di coltura delle cellule di controllo, ma in quello delle cellule trattate si può notare una quantità di proteina significativamente maggiore, indicando che il trattamento con paroxetina porta ad una più precoce e maggiore produzione di BDNF.

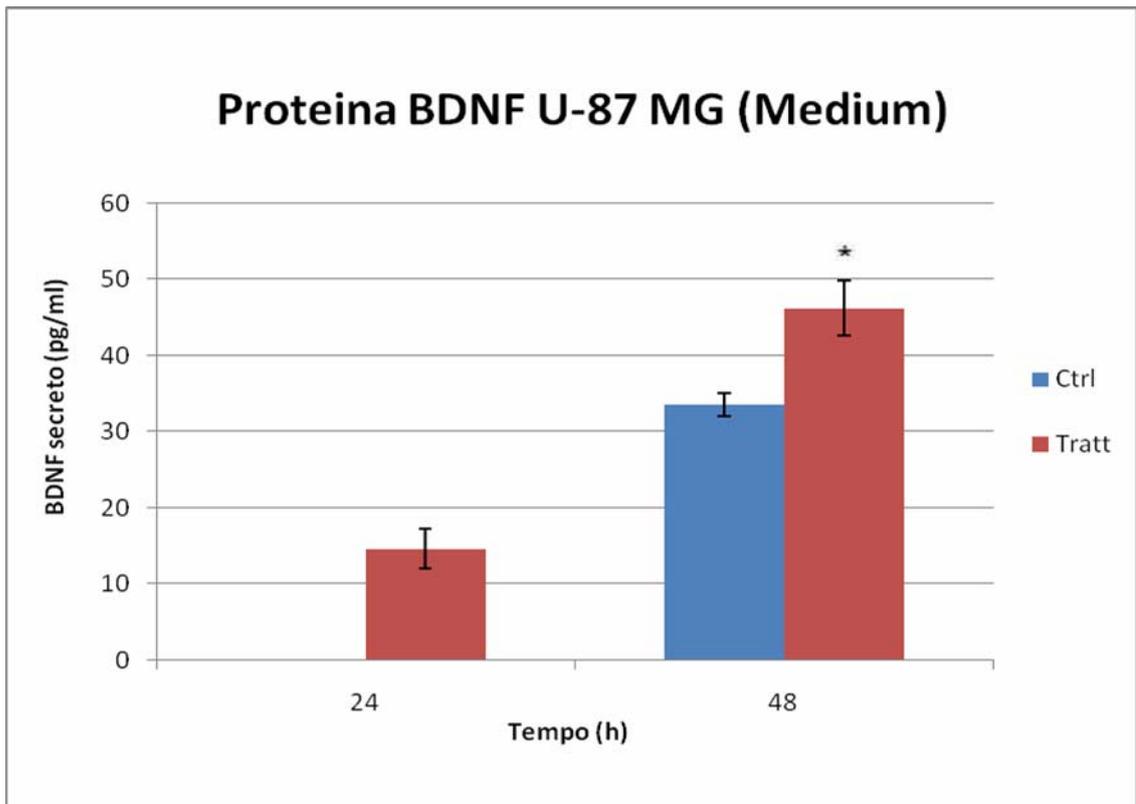


Fig. 20. Concentrazione della proteina BDNF nel terreno di coltura. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. da tre esperimenti indipendenti. Statistica: t-test (t di Student): * $p < 0,0001$.

DISCUSSIONE

Ormai da diversi anni il trattamento di pazienti depressi con farmaci antidepressivi ha portato ad ottimi risultati, provati dalla loro efficacia clinica. Nonostante molti di questi farmaci incrementino in maniera acuta i livelli delle monoamine, la loro efficacia non può essere dovuta esclusivamente alla loro azione sul sistema monoaminergico. I meccanismi terapeutici dell'azione degli antidepressivi rimangono infatti poco chiari (Altar C.A., 1999). La somministrazione cronica è comunque assolutamente necessaria per la cura del paziente depresso. Questo ha portato all'ipotesi che cambiamenti adattativi a lungo termine siano i meccanismi molecolari indotti dal trattamento antidepressivo. L'elevata e prolungata espressione di fattori neurotrofici in risposta al trattamento con farmaci antidepressivi potrebbe promuovere la sopravvivenza neuronale e la protezione dei neuroni dagli effetti dannosi dello stress. Le informazioni raccolte negli ultimi anni portano infatti a supporre che la depressione sia associata ad una perdita della plasticità della glia, dei neuroni e del supporto neurotrofico richiesto da queste popolazioni cellulari; i trattamenti con antidepressivi incrementerebbero la neurogenesi attraverso la produzione di fattori neurotrofici, i quali contrasterebbero gli effetti avversi della depressione (Malberg J.E. et al., 2000). Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) è la neurotrofina maggiormente espressa nel cervello dell'uomo (Tongiorgi E., 2008). Questo fattore neurotrofico, come molti altri, risulta essere in relazione con lo sviluppo e la plasticità neuronale. Durante lo sviluppo, BDNF supporta la sopravvivenza ed il differenziamento delle popolazioni neuronali del sistema nervoso periferico e centrale (Binder D.K., 2004). BDNF è quindi implicato nella fisiopatologia e farmacoterapia della depressione (Pittenger C. et al., 2008, Kozisek M.E. et al., 2008). L'espressione di questa neurotrofina e/o la sua funzione viene a diminuire nella depressione maggiore, così come in altre patologie neurodegenerative, o in seguito a stress, mentre è incrementata dagli antidepressivi. Un ruolo cruciale nelle patologie depressive potrebbe essere proprio

quello giocato dalle cellule gliali e dal loro ruolo di supporto ai neuroni, come suggerito dalla riduzione in numero di queste cellule in differenti patologie psichiatriche (Ongur D. et al., 1998, Rajkowska G. 1999, 2000). Studi *in vitro* hanno dimostrato che differenti farmaci antidepressivi sono effettivamente in grado di modulare l'espressione genica di BDNF su linee cellulari neuronali umane (Donnici L. et al., 2008). È stato altresì riportato che anche nelle linee di glioblastoma di ratto gli antidepressivi sono in grado di modulare l'espressione genica inducendo una maggiore produzione del fattore neurotrofico GDNF (Hisaoka K. et al., 2001), mentre non sono disponibili dati su linee cellulari non-neuronali di origine umana. I risultati del presente lavoro dimostrano che il trattamento con l'antidepressivo paroxetina incrementa il rilascio di BDNF come risultato dell'induzione dell'espressione dell'mRNA di BDNF e della sintesi della proteina da parte delle cellule U-87 MG, una linea cellulare a morfologia epiteliale derivante da un glioblastoma-astrocitoma di cervello umano. In particolare l'espressione genica di BDNF è incrementata con paroxetina, con un picco a 6 ore dall'inizio del trattamento, al quale segue la produzione della proteina ed il rilascio di quest'ultima nel mezzo di coltura a 48 ore dal trattamento. In più i nostri dati hanno dimostrato che il miR-30a-5p, recentemente descritto come un inibitore della sintesi post-trascrizionale di BDNF (Mellios N. et al., 2008), aumenta con l'aumento dell'mRNA di BDNF, suggerendo che la traduzione di questo gene possa essere regolata attraverso questo specifico miR.

Come è noto, le cellule gliali, le quali hanno soprattutto una funzione di supporto dei neuroni, non sono in grado di produrre serotonina, così come altri neurotrasmettitori. La paroxetina sembra pertanto capace di agire, oltre che sulle cellule neuronali, anche su quelle della glia attraverso una via alternativa, indipendente dal sistema monoaminergico. Sono stati identificati diversi fattori trascrizionali in grado di modulare l'espressione dell'mRNA di BDNF (Tardito D. et al., 2006). Questo gene, infatti, possiede diversi promotori, che presentano siti multipli per vari fattori di trascrizione (quali CREB, CaRF, ecc.), e che rispondono quindi a differenti cascate di segnalazione, attivate da flussi di calcio (cascate CaM chinasi), da AMP ciclico (cascata cAMP-PKA) e da fattori neurotrofici (cascata MAP-

Erk). Dal momento che, come si è visto, la serotonina non è coinvolta nella modulazione di questa neurotrofina da parte del farmaco nella linea gliale, sarà interessante chiarire i meccanismi molecolari che portano all'espressione di BDNF in seguito al trattamento con paroxetina, usando, ad esempio, inibitori del segnale di trasduzione intracellulare. Il chiarimento di questo meccanismo monoamino-indipendente sarà importante per determinare l'effettiva possibilità di azione dell'antidepressivo *in vivo* attraverso due differenti vie metaboliche, una dipendente dall'inibizione della ricaptazione della monoamina con il conseguente aumento della produzione del BDNF, e l'altra indipendente da questa via, che incrementa ulteriormente la produzione della neurotrofina. L'aumento dei livelli di BDNF in risposta al trattamento farmacologico potrebbe avere un effetto protettivo su vari circuiti neuronali in pazienti depressi, risultando particolarmente importante per la sopravvivenza o la funzione di neuroni compromessi dallo stress o da insulti di diversa natura. In questo la glia potrebbe giocare un ruolo cruciale producendo BDNF, in seguito all'azione del farmaco, in maniera elevata ed aumentando pertanto la biodisponibilità di questo fattore neurotrofico da parte delle cellule neuronali così come per le stesse cellule gliali. La comprensione dei meccanismi di azione della paroxetina a livello molecolare potrebbe effettivamente aprire la strada verso ulteriori target per nuovi farmaci antidepressivi.

BIBLIOGRAFIA

- Aliaga E., Carcamo C., Abarca J., Tapia-Arancibia L., Bustos G. (2000). Transient increase of brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in substantia nigra reticulata, after partial the nigrostriatal dopaminergic pathway, *Mol. Brain Res.* 79 150–155. [PMID: 10925152]
- Aloyz R., Fawcett J.P., Kaplan D.R., Murphy R.A., Miller F.D.. (1999). Activity dependent activation of TrkB neurotrophin receptors in the adult CNS. *Learn Mem*;6:216–31. [PMID: 10492004]
- Aloyz R.S., Bamji S.X., Pozniak C.D., Toma J.G., Atwal J., Kaplan D.R., Miller F.D. (1998). p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol.*;143(6):1691-703. [PMID: 9852160]
- Altar C.A., Di Stefano P.S. (1998). Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci.* 21 433–437. [PMID: 9786341]
- Altar CA. (1999). Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol* Feb;20(2):59-61. [PMID: 10101965]
- Atwal J.K., Massie B., Miller F.D., Kaplan D.R. (2000). The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and PI3-kinase. *Neuron* 27, pp. 265–277. [PMID: 10985347]
- Balkowiec A., Katz D.M. (2000). Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J. Neurosci.* 20, 7417–7423. [PMID: 11007900]
- Barde Y. A. (1990). The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res.* 2 237-248. [PMID: 2133291]

- Barde Y. A., Edgard D., Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549-553. [PMID: 7188352]
- Barker P.A. (1998) p75NTR: A study in contrasts. *Cell Death and Differ.* 5:346–356. [PMID: 10200483]
- Barker P.A., Barbee G., Misko T.P., Shooter E.M. (1994). The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J. Biol. Chem.* 269:30645–30650. [PMID: 7982984]
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell.* Vol. 116, 281-297, Jan 23. [PMID: 14744438]
- Benedetti M., Levi A., Chao M.V. (1993). Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:7859–7863. [PMID: 8356095]
- Benisty S., Boissiere F., Faucheux B., Agid Y., Hirsch E.C. (1998). trkB messenger RNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of Parkinsonian patients: an in situ hybridization study, *Neuroscience* 86 813–826. [PMID: 9692719]
- Berton O, Nestler EJ. (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.* Feb;7(2):137-51. Review. [PMID: 16429123]
- Bibel M., Hoppe E., Barde Y.A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* 18:616–622. [PMID: 9927421]
- Bilderback T.R., Gazula V.R., Lisanti M.P., Dobrowsky R.T. (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274:257–263. [PMID: 9867838]

- Bilderback T.R., Grigsby R.J., Dobrowsky R.T. (1997). Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J. Biol. Chem.* 272:10922–10927. [PMID: 9099750]
- Binder D.K., Scharfman H.E. (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. Sep;22(3):123-31. Review. [PMID: 15518235]
- Bramham C.R. (2007) Control of synaptic consolidation in the dentate gyrus: mechanisms, functions, and therapeutic implications. *Prog Brain Res.* 163:453-71. Review. [PMID: 17765733]
- Braun A., Lommatzsch M., Mannsfeldt A., Neuhaus-Steinmetz U., Fischer A., Schnoy N., Lewin G.R., Renz H. (1999). Cellular sources of enhanced brain derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*;21(4):537–46. [PMID: 10502564]
- Bresnahan P.A., Leduc R., Thomas L., Thorner J., Gibson H.L., Brake A.J., Barr P.J., Thomas G. (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol.*;111(6 Pt 2):2851-9. [PMID: 2269657]
- Brunello N. (2004) Serotonin-enhancing drugs. *Italian Journal of Psychopatology*. Vol. 10; Dec., Issue 4.
- Brunet A, Datta S.R., Greenberg M.E. (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-AKT signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, pp. 297–305. [PMID: 11399427]
- Canossa M., Griesbeck O., Berninger B., Campana G., Kolbeck R., Thoenen H. (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13279–13286. [PMID: 9371837]

- Carmignoto G., Pizzorusso T., Tia S., Vicini S. (1997). Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex. *J. Physiol.* 498 (Part 1), 153–164. [PMID: 9023775]
- Castrén E. (2005) Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci.* Mar;6(3):241-6. Review. [PMID: 15738959]
- Castrén E., Thoenen H., Lindholm D. (1995). Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus, *Neuroscience* 64: 71–80. [PMID: 7708216]
- Chen B., Dowlatshahi D., MacQueen G.M., Wang J.F., Young L.T. (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication, *Biol. Psychiatry* 50 260–265. [PMID: 11522260]
- Cohen S., Levi-Montalcini R., Hamburger V. (1954) A nerve growth-factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct;40(10):1014-8. [PMID: 16589582]
- Collin C., Vicario-Abejon C., Rubio M.E., Wenthold R.J., McKay R.D., Segal M. (2001). Neurotrophins act at presynaptic terminals to activate synapses among cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*;13:1273–82. [PMID: 11298787]
- Connor B., Dragunow M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain, *Brain Res. Rev.* 27 1–39. [PMID: 9639663]
- Connor B., Young D., Yan Q., Faull R.L., Synek B., Dragunow M. (1997). Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*;49(1/2):71–81. [PMID: 9387865]

- Coulson E.J., Reid K., Barrett G.L., Bartlett P.F. (1999). p75 neurotrophin receptor-mediated neuronal death is promoted by Bcl-2 and prevented by Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 274:16387–16391. [PMID: 10347198]
- Danzer S.C., Crooks K.R., Lo D.C., McNamara J.O. (2002). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures. *J Neurosci*;22:9754–63. [PMID: 12427830]
- Darlington C.L. (2005). Astrocytes as targets for neuroprotective drugs. *Curr Opin Investig Drugs.* Jul;6(7):700-3. Review. [PMID: 16044665]
- De Vane C.L.. (2003). Pharmacokinetics, drug interactions, and tolerability of paroxetine and paroxetine CR. *Psychopharmacol Bull*;37(Suppl.1):29-41. [PMID: 14566199]
- Dechant G., Barde Y.A. (1997). Signaling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:413–418. [PMID: 10595871]
- Djalali S., Höltje M., Grosse G., Rothe T., Stroh T., Grosse J., Deng D.R., Hellweg R., Grantyn R., Hörtnagl H., Ahnert-Hilger G. (2005) Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *J Neurochem.* Feb;92(3):616-27. [PMID: 15659231]
- Dluzen D.E., Story G.M., Xu K., Kucera J., Walro J.M. (1999). Alterations in nigrostriatal dopaminergic function within BDNF mutant mice. *Exp. Neurol.* 160, 500–507. [PMID: 10619567]
- Dobrowsky R.T., Jenkins G.M., Hannun Y.A. (1995). Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem.*;270(38):22135-42. [PMID: 7673191]

- Dobrowsky R.T., Werner M.H., Castellino A.M., Chao M.V., Hannun Y.A. (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265:1596–1599. [PMID: 8079174]
- Donnici L., Tiraboschi E., Tardito D., Musazzi L., Racagni G., Popoli M. (2008). Time-dependent biphasic modulation of human BDNF by antidepressants in neuroblastoma cells. *BMC*. 10.1186/1471-2202-9-61. [PMID: 18601743]
- Dragunow M., Beilharz E., Mason B., Lawlor P., Abraham W., Gluckman P. (1993). Brain-derived neurotrophic factor expression after long-term potentiation. *Neurosci. Lett.* 160, 232-236. [PMID: 8247360]
- D'Sa C., Duman R.S. (2002). Antidepressant and neuroplasticity. *Bipolar disorders* 4, 183-194. [PMID: 12180273]
- Duman R.S., Vaidya V.A. (1998). Molecular and cellular actions of chronic electroconvulsive seizures. *J ECT* 14, 181-193. [PMID: 9773357]
- Duman R.S., Monteggia L.M. (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*. Jun 15;59(12):1116-27. Epub 2006 Apr 21. Review. [PMID: 16631126]
- Egan M.F., Kojima M., Callicott J.H., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu B., Weinberger D.R. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. Jan 24;112(2):257-69. [PMID: 12553913]
- Ehlers M.D., Kaplan D.R., Price D.L., Koliatsos V.E. (1995). NGF-stimulated retrograde transport of Trk A in the mammalian nervous system. *J. Cell Biol.* 130, pp. 149–156. [PMID: 7540615]
- Eide F.F., Vining E.R., Eide B.L., Zang K., Wang X.Y., Reichardt L.F. (1996). Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects

- on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci.* 16:3123–3129. [PMID: 8627351]
- Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Persson H., Lindvall O. (1991). Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 7, 165–176. [PMID: 1829904]
- Ernfors P., Merlio J.P., Persson H. (1992). Cells expressing mRNA for neurotrophins and their receptors during embryonic rat development. *Eur. J. Neurosci.* 4, 1140–1158. [PMID: 12106420]
- Ernfors P., Wetmore C., Olson L., Persson H., (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5, 511–526. [PMID: 2206535]
- Feinstein D.L., Larhammar D. (1990). Identification of a conserved protein motif in a group of growth factor receptors. *FEBS Lett.* 272:7–11. [PMID: 2172020]
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.*, 9, 102–114. [PMID: 18197166]
- Fritsch B., Silos-Santiago I., Bianchi L.M., Farinas I. (1997). The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. *Trends Neurosci.* 20, 159–164. [PMID: 9106356]
- Fujimura H., Altar C.A., Chen R., Nakamura T., Nakahashi T., Kambayashi J., Sun B., Tandon N.N. (2002). Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb. Haemost.* 87: 728-734. [PMID: 12008958]
- Gielen A., Khademi M., Muhallab S., Olsson T., Piehl F. (2003). Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-

- remitting multiple sclerosis patients. *Scand J Immunol*;57(5):493–7. [PMID: 12753507]
- Gilmor M.L., Owens M.J., Nemeroff C.B. (2002). Inhibition of norepinephrine uptake in patients with major depression treated with paroxetine. *Am J Psychiatry*.;159(10):1702-10. [PMID: 12359676]
- Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P. and Schier, A.F. (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, 308, 833–838. [PMID: 15774722]
- Griesbeck O., Canossa M., Campana G., Gartner A., Hoener M.C., Nawa H., Kolbeck R., Thoenen H. (1999). Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc. Res. Technol.* 45, 262–275. [PMID: 10383119]
- Halban P.A., Irminger J.C. (1994). Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* 299 (Pt 1), 1–18. [PMID: 8166626]
- Hamanoue M., Middleton G., Wyatt S., Jaffray E., Hay R.T., Davies A.M. (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci*.;14(1):28-40. [PMID: 10433815]
- Harter C., Reinhard C. (2000). The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell Biochem.* 34, 1–38. [PMID: 10808330]
- Hisaoka K., Nishida A., Koda T. (2001). Antidepressant drug treatments induce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) synthesis and release in rat C6 glioblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* 79, 25-34. [PMID: 11595754]

- Hock C., Heese K., Hulette C., Rosenberg C., Otten U. (2000). Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas, *Arch. Neurol.* 57 846–851. [PMID: 10867782]
- Hofer M., Pagliusi S.R., Hohn A., Leibrock J., Barde Y.A. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9, 2459–2464. [PMID: 2369898]
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature.* Mar 22;344(6264):339-41.[PMID: 2314473]
- Hokfelt T., Broberger C., Xu Z.Q., Sergeev V., Ubink R., Diez M. (2000). Neuropeptides-an overview. *Neuropharmacology* 39, 1337–1356. [PMID: 10818251]
- Horch H.W., Krüttgen A., Portbury S.D., Katz L.C. (1999). Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron.*;23(2):353-64. [PMID: 10399940]
- Howells D.W., Porritt M.J., Wong J.Y., Batchelor P.E., Kalnins R., Hughes A.J., Donnan G.A. (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol*;166(1):127–35. [PMID: 11031089]
- Hyman C., Hofer M., Barde Y.A., Juhasz M., Yancopoulos G.D., Squinto S.P., Lindsay R.M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350, 230–232. [PMID: 2005978]
- Hyttel J. (1994) Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol.* Mar;9 Suppl 1:19-26. Review. [PMID: 8021435]

- Isackson P.J., Huntsman M.M., Murray K.D., Gall C.M. (1991). BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron* 6, 937–948. [PMID: 2054188]
- Jones K.R. and Reichardt L.F. (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Oct;87(20):8060-4. [PMID: 2236018]
- Kaplan D. R., Miller F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10: 381-391. [PMID: 10851172]
- Karege F., Perret G., BondolW G., Schwald M., Bertschy G., Aubry J.M. (2002). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res.* 109 143–148. [PMID: 11927139]
- Katoh-Semba R., Takeuchi I.K., Semba R., Kato K. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J. Neurochem.* 69: 34–42. [PMID: 9202291]
- Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L., et al. (1999). Activated human T cells, B cells and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* 189: 865-870. [PMID: 10049950]
- Koppel I., Aid-Pavlidis T., Jaanson K., Sepp M., Pruunsild P., Palm K., Timmusk T. (2009) Tissue-specific and neural activity-regulated expression of human BDNF gene in BAC transgenic mice. *BMC Neurosci.*, Jun 25;10:68. [PMID: 19555478]
- Korte M., Carroll P., Wolf E., Brem G., Thoenen H., Bonhoeffer T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived

- neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8856–8860. [PMID: 7568031]
- Kozisek M.E., Middlemas D., Bylund D.B. (2008). Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther*, 117:30-51. [PMID: 17949819]
- Kuruvilla R., Ye H., Ginty D.D. (2000). Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons. *Neuron* 27, pp. 499–512. [PMID: 11055433]
- Lambert H.W. Weiss E.R., Lauder J.M. (2001). Activation of 5HT receptors that stimulate the adenylyl cyclase pathway positively regulates IGF-I in cultured craniofacial mesenchymal cells. *Dev Neurosci* 23: 70-77. [PMID: 11173928]
- Lang T., Bruns D., Wenzel D., Riedel D., Holroyd P., Thiele C., Jahn R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 20, 2202-2213. [PMID: 11331586]
- Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*;294(5548):1945-8. [PMID: 11729324]
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rådmark O., Kim S., Kim V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. Sep 25;425(6956):415-9. [PMID: 14508493]
- Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H., Barde Y.A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149-152. [PMID: 2779653]
- Leonard B.E. (2001). The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. May;25(4):767-80. [PMID: 11383977]

- Lessmann V. (1998). Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen. Pharmacol.* 31, 667–674. [PMID: 9809461]
- Lessmann V., Heumann R. (1998). Modulation of unitary glutamatergic synapses by neurotrophin-4/5 or brain-derived neurotrophic factor in hippocampal microcultures: presynaptic enhancement depends on pre-established paired-pulse facilitation. *Neuroscience* 86, 399–413. [PMID: 9881855]
- Levi - Montalcini R., Hamburger V. (1953). A diffusible agent of mouse sarcoma, producing of sympatetic-ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 123, 233-287.
- Li Y.X., Xu Y., Ju D., Lester H.A., Davidson N., Schuman E.M. (1998a). Expression of a dominant negative TrkB receptor, T1, reveals a requirement for presynaptic signaling in BDNF-induced synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10884–10889. [PMID: 9724799]
- Li Y.X., Zhang Y., Lester H.A., Schuman E.M., Davidson N. (1998b). Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18, 10231–10240. [PMID: 9852560]
- Liepinsh E., Ilag L.L., Otting G., Ibáñez C.F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 16:4999–5005. [PMID: 9305641]
- Lin R.Z., Chen J., Hu Z.W., Hoffman B.B. (1998). Phosphorylation of the cAMP response element-binding protein and activation of trascription by alphas adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273: 30033-30038. [PMID: 9792725]

- Lindholm D., Castren E., Berzaghi M., Blochl A., Thoenen H. (1994). Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain—implications for neuronal plasticity. *J. Neurobiol.* 25, 1362–1372. [PMID: 7852991]
- Lindvall O., Kokaia Z., Bengzon J., Elmer E., Kokaia M. (1994). Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci.* 17, 490–496. [PMID: 7531892]
- Liu Q.R., Walther D., Drgon T., Poleskaya O., Lesnick T.G., Strain K.J., de Andrade M., Bower J.H., Maraganore D.M., Uhl G.R. (2005). Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* Apr 5;134B(1):93-103. [PMID: 15666411]
- Luellen B.A., Bianco L.E., Schneider L.M., Andrews A.M. (2007) Reduced brain-derived neurotrophic factor is associated with a loss of serotonergic innervation in the hippocampus of aging mice. *Genes Brain Behav.* Jul;6(5):482-90. Epub 2006 Dec 6. [PMID: 17156118]
- Mack G.S. (2007). MicroRNA gets down to business. *Nat. Biotech.*; 25, 631–638 (1 June 2007). [PMID: 17557095]
- Maggirwar S.B., Sarmiere P.D., Dewhurst S., Freeman R.S. (1998). Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci.*;18(24):10356-65. [PMID: 9852573]
- Mahadeo D., Kaplan L., Chao M.V., Hempstead B.L. (1994). High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding: Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J. Biol. Chem.* 269:6884–6891. [PMID: 8120051]

- Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B., Alderson R.F., Wiegand S.J., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5, 501–509. [PMID: 1688327]
- Maisonpierre P.C., Le Beau MM., Espinosa R. 3rd, Ip NY., Belluscio L., de la Monte SM., Squinto S., Furth ME., Yancopoulos GD. (1991). Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics*. Jul;10(3):558-68. [PMID: 1889806]
- Malberg J.E., Eisch A.J., Nestler E.J., Duman R.S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 9104-9110. [PMID: 11124987]
- Malenka R.C., Nicoll R.A. (1999). Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 285, 1870–1874. [PMID: 10489359]
- Manji H.K., Moore G.J., Rajkowska G., Chen G. (2000). Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Mol Psychiatry*. Nov;5(6):578-93. [PMID: 11126389]
- Markstein R. Matsumoto M., Kohler C., Togashi H., Yoshioka M., Hoyer D. (1999). Pharmacological characterization of 5HT receptor positively coupled to adenylyl cyclase in the rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359: 454-459. [PMID: 10431755]
- Mazzoni I.E., Saïd F.A., Aloyz R., Miller F.D., Kaplan D. (1999). Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci.*;19(22):9716-27. [PMID: 10559381]
- McDonald N.Q., Hendrickson W.A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell.*;73(3):421-4. [PMID: 8490958]

- Mellios N., Huang H-S., Grigorenko A., Rogaev E. and Akbarian S. (2008). A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Human Molecular Genetics*, Vol. 17, No. 19. [PMID: 18632683]
- Merighi A. (2002). Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* 66, 161–190. [PMID: 11943450]
- Michalski B., Fahnstock M. (2003). Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*;111(1/2):148–54. [PMID: 12654514]
- Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Townsend M., Yoshii A., Sestan N., Rakic P., Constantine-Paton M., Horvitz H.R. (2004). Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol.* 5(9):R68. Epub 2004 Aug 31. [PMID: 15345052]
- Mogi M., Togari A., Kondo T., Mizuno Y., Komure O., Kuno S., Ichinose H., Nagatsu T. (1999). Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 270 45–48. [PMID: 10454142]
- Murer M.G., Yan Q., Raisman-Vozari R. (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 63, 71–124. [PMID: 11040419]
- Nakata K., Ujike H., Sakai A., Uchida N., Nomura A., Imamura T., Katsu T., Tanaka Y., Hamamura T., Kuroda S. (2003) Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. *Neurosci Lett.* 2003 Jan 30;337(1):17-20. [PMID: 12524161]
- Nanko S., Kunugi H., Hirasawa H., Kato N., Nabika T., Kobayashi S. (2003). Brain-derived neurotrophic factor gene and schizophrenia: polymorphism screening

- and association analysis. *Schizophr Res.* Aug 1;62(3):281-3. [PMID: 12837526]
- Nawa H. and Takei N. (2001). BDNF as an anterophin: a novel neurotrophic relationship between brain neurons. *Trends Neurosci.* 24 683–684. [PMID: 11718853]
- Nibuya M., Morinobu S., Duman R.S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci* 15: 7539–7547. [PMID: 7472505]
- Nibuya M. Nestler E.J., Duman R.S. (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J. Neurosci* 16: 2365–2372. [PMID: 8601816]
- Nibuya M., Morinobu S., Duman R.S. (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci.* Nov;15(11):7539-47. [PMID: 7472505]
- Ninkina N., Adu J., Fischer A., Pinon L.G., Buchman V.L., Davies A.M. (1996). Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons. *EMBO J.* 15:6385–6393. [PMID: 8978665]
- Numan S., Seroogy K.B. (1997). Increased expression of trkB mRNA in rat caudate-putamen following 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Eur. J. Neurosci.* 9 489–495. [PMID: 9104591]
- Ongür D., Drevets W.C., Price J.L. (1998) Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 27;95(22):13290-5. [PMID: 9789081]
- Oppenheim R.W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 453–501. [PMID: 2031577]

- Pan W., Banks W.A., Fasold M.B, Bluth J., Kastin A.J. (1998). Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 37: 1553-1561. [PMID: 9886678]
- Pandey S.C., Davis J.M., Pandey G.N. (1995) Phosphoinositide system-linked serotonin receptor subtypes and their pharmacological properties and clinical correlates. *J Psychiatry Neurosci.* May;20(3):215-25. [PMID: 7786883]
- Parain K., Murer M.G., Yan Q., Faucheux B., Agid Y., Hirsch E., Raisman-Vozari R. (1999). Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport* 10, 557–561. [PMID: 10208589]
- Patterson S.L., Abel T., Deuel T.A., Martin K.C., Rose J.C., Kandel E.R. (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16, 1137–1145. [PMID: 8663990]
- Patterson S.L., Grover L.M., Schwartzkroin P.A., Bothwell M. (1992). Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9, 1081–1088. [PMID: 1463608]
- Paul J., Gottmann K., Lessmann V. (2001). NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *NeuroReport* 12, 2635–2639. [PMID: 11522939]
- Pawson T., Nash P. (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev*, 14: 1027-1047. [PMID: 10809663]
- Perkins, D.O., Jeffries, C.D., Jarskog, L.F., Thomson, J.M., Woods, K., Newman, M.A., Parker, J.S., Jin, J. and Hammond, S.M. (2007). MicroRNA

expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol.*, 8, R27. [PMID: 17326821]

Pezet S., McMahon S.B. (2006). Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci.*;29:507-38. Review. [PMID: 16776595]

Phillips H.S., Hains J.M., Armanini M., Laramée G.R., Johnson S.A., Winslow J.W. (1991) BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*. Nov;7(5):695-702. [PMID: 1742020]

Pittenger C., Duman R.S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacol*, 33:88-109. [PMID: 17851537]

Poduslo J.F., Curran G.L. (1995). Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Molecular Brain Research* 36: 280-286. [PMID: 8965648]

Poo M.M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 24–32. [PMID: 11253356]

Presley J.F., Cole N.B., Schroer T.A., Hirschberg K., Zaal K.J., Lippincott-Schwartz J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389, 81–85. [PMID: 9288971]

Radka S.F., Holst P.A., Fritsche M., Altar C.A. (1996). Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res.*;709(1):122-301. [PMID: 8869564]

Rajkowska G. (2000). Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry*. 2000 Oct 15;48(8):766-77. [PMID: 11063973]

- Rajkowska G., Miguel-Hidalgo J.J., Wei J., Dilley G., Pittman S.D., Meltzer H.Y., Overholser J.C., Roth B.L., Stockmeier C.A. (1999). Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry*. 1999 May 1;45(9):1085-98. [PMID: 10331101]
- Rocamora N., Welker E., Pascual M., Soriano E. (1996). Upregulation of BDNF mRNA expression in the barrel cortex of adult mice after sensory stimulation. *J. Neurosci.* 16, 4411–4419. [PMID: 8699252]
- Rodriguez-Tébar A., Dechant G., Barde Y.-A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4:487–492. [PMID: 2157470]
- Roseboom P.H, Klein D.C. (1995). Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 47: 439-449. [PMID: 7700241]
- Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L, Miller JA, Welcher AA. (1995). Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein Expr Purif.*;6(4):465-71. [PMID: 8527932]
- Saha R.N., Liu X. and Pahan K. (2006). Up-regulation of BDNF in Astrocytes by TNF- α : A Case for the Neuroprotective Role of Cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol.* Sep;1(3):212-22. Epub 2006 May 16. [PMID: 18040799]
- Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R., Arancio O., Belzung C., Hen R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. Aug 8;301(5634):805-9. [PMID: 12907793]

- Schildkraut J.J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. Nov;122(5):509-22. [PMID: 5319766]
- Schinder A.F., Berninger B., Poo M. (2000). Postsynaptic target specificity of neurotrophin induced presynaptic potentiation. *Neuron* 25, 151–163. [PMID: 10707980]
- Schinder A.F., Poo M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 23, 639–645. [PMID: 11137155]
- Schneider R., Schweiger M. (1991). A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene*.;6(10):1807-11. [PMID: 1656363]
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M. and Greenberg, M.E. (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439, 283–289. [PMID: 16421561]
- Schuman E.M. (1999). Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 105–109. [PMID: 10072368]
- Schwarz D.S., Hutvagner G., Haley B., Zamore P.D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell.* Sep;10(3):537-48. [PMID: 12408822]
- Seidah N.G., Benjannet S., Pareek S., Chrétien M., Murphy R.A. (1996) Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.* Feb 5;379(3):247-50. [PMID: 8603699]
- Sen S., Duman R., Sanacora G. (2008) Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry*. Sep 15;64(6):527-32. Epub 2008 Jun 24. [PMID: 18571629]

- Shelton D.L., Sutherland J., Gripp J., Camerato T., Armanini M.P., Phillips H.S., Carroll K., Spencer S.D., Levinson A.D. (1995). Human trks: Molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J. Neurosci.* 15:477–491. [PMID: 7823156]
- Shimada A., Mason C.A., Morrison M.E. (1998). TrkB signaling modulates spine density and morphology independent of dendrite structure in cultured neonatal Purkinje cells. *J Neurosci*;18:8559–70. [PMID: 9786964]
- Shimizu E., Hashimoto K., Okamura N., Koike K., Komatsu N., Kumakiri C., Nakazato M., Watanabe H., Shinoda N., Okada S., Iyo M. (2003). Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*;54(1):70–5. [PMID: 12842310]
- Siegel G.J., Chauhan N.B. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res. Rev.* 33 199–227. [PMID: 11011066]
- Soilu-Hänninen M., Ekert P., Bucci T., Syroid D., Bartlett P.F., Kilpatrick T.J. (1999). Nerve growth factor signaling through p75 induces apoptosis in Schwann cells via a Bcl-2-independent pathway. *J. Neurosci.* 19:4828–4838. [PMID: 10366617]
- Tapia-Arancibia L., Rage F., Givalois L., Arancibia S. (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Frontiers in neuroendocrinology* 25, 77-107. [PMID: 15571756]
- Tardito D., Tiraboschi E., Kasahara J., Racagni G., Popoli M. (2006). Reduced CREB phosphorylation after chronic lithium treatment is associated with down-regulation of CaM kinase IV in rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol.* Aug;10(4):491-6. Epub 2006 Aug 21. [PMID: 16923323]

- Tongiorgi E. (2008) Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neurosci Res.* Aug;61(4):335-46. Epub 2008 May 4. Review. [PMID: 18550187]
- Tsai S.J., Cheng C.Y., Yu Y.W., Chen T.J., Hong C.J. (2003) Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and major depressive disorders, symptomatology, and antidepressant response. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2003 Nov 15;123B(1):19-22. [PMID: 14582140]
- Tsankova N.M., Berton O., Renthal W., Kumar A., Neve R.L., Nestler E.J. (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci.* Apr;9(4):519-25. Epub 2006 Feb 26. [PMID: 16501568]
- Urfer R., Tsoulfas P., O'Connell L., Shelton D.L., Parada L.F., Presta L.G. (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J.* 14:2795–2805. [PMID: 7796806]
- Urfer R., Tsoulfas P., O'Connell L., Hongo J. A., Zhao W., Presta L. G. (1998). High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem,* 273: 5829-5840. [PMID: 9488719]
- Venero J.L., Vizuete M.L., Revuelta M., Vargas C., Cano J., Machado A. (2000). Upregulation of BDNF mRNA and trkB mRNA in the nigrostriatal system and in the lesion site following unilateral transection of the medial forebrain bundle, *Exp. Neurol.* 161 38–48. [PMID: 10683272]
- Walton M., Woodgate A.M., Muravlev A., Xu R., During M.J., Dragunow M. (1999). CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J. Neurochem.* 73, pp. 1836–1842. [PMID: 10537041]

- Wang, G., van der Walt, J.M., Mayhew, G., Li, Y.J., Zuchner, S., Scott, W.K., Martin, E.R. and Vance, J.M. (2008) Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am. J. Hum. Genet.*, 82, 283–289. [PMID: 18252210]
- Wang, W.X., Rajeev, B.W., Stromberg, A.J., Ren, N., Tang, G., Huang, Q., Rigoutsos, I. and Nelson, P.T. (2008) The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1. *J. Neurosci.*, 28, 1213–1223. [PMID: 18234899]
- Watson F.L., Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA. (2001). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat. Neurosci.* 4, p. 4. [PMID: 11544482]
- Watson F.L., Heerssen HM, Moheban DB, Lin MZ, Sauvageot CM, Bhattacharyya A, Pomeroy SL, Segal RA. (1999). Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand–receptor complex. *J. Neurosci.* 19, pp. 7889–7900. [PMID: 10479691]
- White F.A., Silos-Santiago I., Molliver D.C., Nishimura M., Phillips H., Barbacid M., Snider W.D. (1996). Synchronous onset of NGF and TrkA survival dependence in developing dorsal root ganglia. *J Neurosci.*;16(15):4662-72. [PMID: 8764654]
- Wiegmann K., Schütze S., Machleidt T., Witte D., Krönke M. (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78:1005–1015. [PMID: 7923351]
- Xu B., Gottschalk W., Chow A., Wilson R.I., Schnell E., Zang K., Wang D., Nicoll R.A., Lu B., Reichardt L.F. (2000). The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term

- potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J Neurosci*;20:6888–97. [PMID: 10995833]
- York R.D., Molliver D.C., Grewal S.S., Stenberg P.E., McCleskey E.W., Stork P.J. (2000). Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol. Cell. Biol.* 20, pp. 8069–8083. [PMID: 11027277]
- Yuste R., Bonhoeffer T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*;24:1071–89. [PMID: 11520928]
- Zafra F., Hengerer B., Leibrock J., Thoenen H., Lindholm D. (1990). Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.* 9, 3545–3550. [PMID: 2170117]
- Zhang Y., Moheban D.B., Conway B.R., Bhattacharyya A., Segal R.A. (2000). Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J. Neurosci.* 20, pp. 5671–5678. [PMID: 10908605]
- Zhao S., Fernald R.D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.* Oct; 12(8): 1045-62. [PMID: 16241897]