

Indice

1	INTRODUZIONE GENERALE	3
1.1	MEMORIA	4
1.2	CORTECCIA PERIRINALE	5
1.2.1	<i>Struttura e connessioni</i>	5
1.2.2	<i>Corteccia peririnale e memoria</i>	6
1.3	PLASTICITA' SINAPTICA.....	10
1.4	PROTEIN KINASI M ζ (PKM ζ)	15
1.5	SCOPO DELLO STUDIO	18
2	MATERIALI E METODI	19
2.1	ELETTROFISIOLOGIA	20
2.1.1	<i>Animali</i>	20
2.1.2	<i>Preparazione di fettine di corteccia peririnale e ippocampo</i> :.....	20
2.1.3	<i>Extracellular Field Recording</i>	21
2.1.4	<i>Agenti farmacologici</i>	24
2.2	BIOLOGIA MOLECOLARE.....	25
2.2.1	<i>Western Blot</i>	25
3	RUOLO E REGOLAZIONE DI PKMζ NELLA PLASTICITÀ SINAPTICA IN CORTECCIA PERIRINALE DI ADULTO	27
3.1	RISULTATI.....	30
3.1.1	<i>Induzione di LTP in corteccia peririnale di ratto adulto</i>	30
3.1.2	<i>La LTP in corteccia peririnale dipende dalla sintesi di nuove proteine</i>	30
3.1.3	<i>Ruolo di PKMζ nel mantenimento della LTP nella corteccia peririnale dell'adulto</i>	31
3.1.4	<i>Attività di PKMζ su pathways non potenziate</i>	32
3.1.5	<i>Ruolo di PKMζ nel depotenziamento sinaptico</i>	32
3.1.6	<i>Ruolo di PKMζ nel depotenziamento sinaptico in presenza dell'antagonista dei recettori NMDA per il glutammato, D-AP5</i>	33
3.1.7	<i>Ruolo di PKMζ nell'induzione di LTD nella corteccia peririnale di ratti adulti</i> 34	
3.1.8	<i>Effetto dell'inibizione sequenziale di PDK-1 e PKMζ sul mantenimento della LTP</i>	35
3.2	DISCUSSIONE.....	45

4	RUOLO DI PKMζ NELLA PLASTICITÀ SINAPTICA NELLA CORTECCIA PERIRINALE DURANTE IL NEUROSVILUPPO	50
4.1	INTRODUZIONE.....	51
4.2	RISULTATI.....	53
4.2.1	<i>Attività di PKMζ in pathway depotenziate in corteccia peririnale di P14.</i>	<i>53</i>
4.2.2	<i>Attività di PKMζ nel de-depotenziamento in corteccia peririnale di P14.</i>	<i>54</i>
4.2.3	<i>Ruolo di PKMζ nella trasmissione sinaptica in corteccia peririnale di P35.</i>	<i>55</i>
4.3	DISCUSSIONE	60
5	REGOLAZIONE DI PKMζ NELLA CORTECCIA PERIRINALE DURANTE IL NEUROSVILUPPO	64
5.1	RUOLO DI PI3K E mTOR NELLA REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI PKM ζ	65
5.1.1	<i>Introduzione</i>	<i>65</i>
5.1.2	<i>Risultati.....</i>	<i>67</i>
5.1.3	<i>Discussione</i>	<i>77</i>
5.2	RUOLO DEI RECETTORI METABOTROPICI DEL GLUTAMMATO DI GRUPPO I NELLA REGOLAZIONE DI PKM ζ DURANTE IL NEUROSVILUPPO.	80
5.2.1	<i>Introduzione</i>	<i>80</i>
5.2.2	<i>Risultati.....</i>	<i>82</i>
5.2.3	<i>Discussione</i>	<i>91</i>
6	DISCUSSIONE GENERALE	93
6.1	DISCUSSIONE GENERALE	94
7	BIBLIOGRAFIA	99

1 INTRODUZIONE GENERALE

1.1 Memoria

Per memoria si intende quella funzione cerebrale superiore che permette l'immagazzinamento, la ritenzione ed il richiamo di informazioni acquisite durante l'esperienza.

La memoria viene suddivisa in diversi tipi, ciascuno dipendente da specifici circuiti neurali. Classicamente, si parla di memoria Dichiarativa e di memoria Non Dichiarativa (Mesulam, 1998). La memoria dichiarativa si suddivide a sua volta in Semantica ed Episodica. La memoria Semantica e' quella deputata ad immagazzinare fatti relativi al mondo circostante, mentre la memoria Episodica si riferisce al ricordo di esperienze personali (Tulving et al. 1988). Per memoria non dichiarativa, invece, si intende la memoria inconscia di procedure acquisite, nonche' la memoria emozionale (Mesulam, 1998).

E' stata dimostrata l'importanza di una particolare regione del cervello, il lobo temporale mediale (Medial Temporal Lobe, MTL) nei processi di memoria (Burwell and Amaral, 1998a,b). Questa regione cerebrale e' coinvolta anche nella memoria di riconoscimento, in un particolare tipo di memoria costituita dall'identificazione di un evento (o di un oggetto) e del suo riconoscimento come "familiare" (Brown and Aggleton, 2001).

Due strutture in particolare sono storicamente ritenute importanti per la memoria di riconoscimento, ossia ippocampo ed amigdala (Eichenbaum 1999). Tuttavia, di recente grande attenzione e' stata posta su altre porzioni cerebrali, in particolare le regioni che circondano l'ippocampo, ossia la corteccia perinatale e le cortecce paraippocampale ed entorinale (Brown and Aggleton, 2001).

1.2 Corteccia peririnale

1.2.1 Struttura e connessioni.

La corteccia peririnale nel ratto comprende due sottili porzioni di corteccia (aree 35 e 36 di Brodmann) localizzate al di sopra ed al di sotto del solco rinale. La corteccia peririnale e' sovrastata in senso dorso/rostrale dalla corteccia associativa temporale, mentre ventro/caudalmente ad essa si localizza la corteccia entorinale. La corteccia peririnale e' inoltre contornata rostralmente dalla corteccia insulare e caudalmente dalla corteccia postrinale, che mostra delle somiglianze con la corteccia paraippocampale nei primati (Burwell et al, 1995).

L'area 35 di Brodmann e' localizzata lungo il margine inferiore del fondo del solco rinale, nella sua porzione ventrale; l'area 36, invece, e' una zona piu' ampia, situata piu' dorsalmente, che include gran parte del margine dorsale del solco rinale.

Queste due aree sono ulteriormente suddivise in altre 5 aree in base alle loro differenze citoarchitettoniche: Area 35 dorsale e ventrale, Area 36 dorsale, ventrale e posteriore. La porzione ventrale dell'area 35 occupa approssimativamente il margine ventrale del solco rinale, mentre la porzione dorsale occupa il fondo del solco. L'area 35 e' costituita da corteccia agranulare (manca lo strato granulare IV), mentre l'area 36 presenta uno strato IV a cellule diradate. Sempre nella stessa area, lo strato II e' caratterizzato da aggregati di cellule rotondeggianti di medie dimensioni o poligonali, frapposte alle quali si trovano cellule piramidali, via via piu' numerose procedendo caudalmente (Burwell , 2001)

Per quanto riguarda le sue funzioni, la corteccia peririnale puo' essere definite come una corteccia associativa, ricevente informazioni da tutte le modalita' sensoriali, oltre che da altre aree associative come la corteccia prefrontale e quella entorinale.

Secondo gli studi di Deacon et al, 1983 e Burwell and Amaral, 1998a,b, l'area 36 riceve afferenze dalla corteccia postrinale, entorinale, temporale e dall'area 35. L'area 35, a sua volta, riceve afferenze dalla corteccia postrinale (principalmente dalle aree olfattorie), insulare ed entorinale, nonché dall'area 36. Inoltre, in massima parte tramite connessioni con la corteccia postrinale, la corteccia peririnale, nel ratto, riceve numerose afferenze dalle regioni visive, olfattive, uditive e visuo-spaziali.

A sua volta, la corteccia peririnale invia proiezioni alla corteccia entorinale, alla quale risulta pertanto essere interconnessa. La corteccia entorinale fornisce la maggior parte degli impulsi corticali che raggiungono l'ippocampo (Burwell and Amaral, 1998a) e riceve da questo delle controproiezioni, chiudendo il circuito con la corteccia rinale.

1.2.2 Corteccia peririnale e memoria.

La corteccia peririnale è una struttura di fondamentale importanza nei processi di memoria e in particolare nel riconoscimento degli oggetti, come dimostrato in numerosi studi

1.2.2.1 Test comportamentali

I test comportamentali più usati si basano essenzialmente sulla capacità dell'animale da esperimento di riconoscere come "familiare" un oggetto esplorato in precedenza. Esistono due varianti: il "delayed matching" (DMS) ed il "delayed non-matching" (DNMS) (Mishkin and Delacour, 1975). Entrambi i test consistono essenzialmente di tre fasi: una prima fase di "presentazione" dell'oggetto, un intervallo di tempo di durata variabile ed infine la fase di test vera e propria. Durante la prima fase, all'animale viene presentato un oggetto che dovrà "esplorare" o spostare per ottenere una ricompensa. Al termine di questa fase, si lascia passare un intervallo di tempo variabile, seguito dall'ultima fase, in cui all'animale sono presentati una copia dell'oggetto già esplorato, considerato quindi "familiare", ed un nuovo oggetto. Nel test DMS,

l'animale dovrà riconoscere l'oggetto "familiare" per ottenere la ricompensa, mentre nel test DNMS, al contrario, otterra' la ricompensa se riconoscerà l'oggetto nuovo. Quest'ultimo test e' probabilmente il migliore per valutare la memoria di riconoscimento degli oggetti, in quanto nel DMS l'animale e' ricompensato se riconosce l'oggetto familiare, dunque coinvolge tanto la memoria di riconoscimento, quanto i processi di apprendimento associativo. Nel test DNMS, infatti, l'animale e' ricompensato se riconosce l'oggetto che, in precedenza, non aveva esplorato e che quindi non aveva associato alla ricompensa; pertanto, risulta coinvolta esclusivamente la memoria di riconoscimento dell'oggetto.

Un altro test largamente usato e' il riconoscimento "spontaneo" degli oggetti (Ennaceur and Delacour, 1988), che si fonda sulla preferenza innata dei ratti ad esplorare oggetti nuovi piuttosto che oggetti familiari. Questo test non prevede nessuna ricompensa per l'animale, bensì registra esclusivamente il tempo che il ratto spende nell'esplorare un nuovo oggetto, rapportandolo al tempo dedicato all'oggetto familiare. L'intervallo tra la fase di presentazione dell'oggetto e la fase di riconoscimento puo' essere allungato, aumentando di conseguenza il grado di difficoltà del test. Esistono inoltre diverse varianti; il ratto puo' dover semplicemente distinguere tra un oggetto familiare ed uno nuovo, oppure riconoscere cambiamenti spaziali (ossia se un oggetto e' stato spostato in uno spazio precedentemente vuoto) o cambiamenti d'oggetto (ossia se un oggetto e' stato cambiato di posto con un altro oggetto) (Dix and Aggleton, 1999).

1.2.2.2 Studi condotti tramite lesioni specifiche o incannulamento.

Numerosi studi sono stati condotti provocando lesioni corticali e valutando gli effetti di tali lesioni sulla memoria di riconoscimento degli oggetti tramite test DNMS (Ennaceur et al, 1996; Meunier et al, 1996; Nemanic et al, 2004; Buckley, 2005). Nei primati e' stato dimostrato che diverse regioni della

corteccia rinale contribuiscono alla memoria di riconoscimento, e cioè entorinale, peririnale e paraippocampale.

Lesioni selettive di queste regioni dimostrano che ognuna di esse ricopre un ruolo specifico nella memoria di riconoscimento. Lesioni della corteccia peririnale producono severi deficit nei test DNMS (Meunier et al., 1993;1996). Lesioni della corteccia entorinale producono solo deficit lievi e transitori (Meunier et al., 1993) mentre lesioni nella corteccia paraippocampale non hanno effetto nei test DNMS (Meunier et al., 1996). Analogamente, nel ratto lesioni della corteccia rinale in toto (Mumby and Pinel, 1994) o della sola peririnale (Wiig and Bilkey, 1994) producono severi deficit nei test DNMS e nel riconoscimento spontaneo degli oggetti (Ennaceur et al, 1996; Aggleton et al, 1997; Ennaceur and Aggleton, 1997; Bussey et al, 1999; Nemanic et al, 2004; Winters et al, 2004; Buckley 2005). Inoltre, e' stato dimostrato che lesioni della corteccia peririnale hanno effetti anche sulle memorie olfattiva, tattile e dell'appetito (Suzuki et al, 1993; Corodimas and Le Doux, 1995; Fortin et al, 2004).

L'importanza della corteccia peririnale in questo tipo di memoria appare molto maggiore di quella dell'ippocampo: lesioni dell'ippocampo, infatti, non modificano significativamente i test comportamentali di riconoscimento degli oggetti (Nemanic et al., 2004; Buckley, 2005). Tuttavia, danni ippocampali provocano deficit maggiori (rispetto a quelli indotti da lesioni della corteccia peririnale) nei test di memoria spaziale (Ennaceur et al, 1996; Murray et al., 1998; Aggleton et al, 2004; Winters et al, 2004; Murray et al., 2005). Cio' dimostra che l'interazione delle due strutture e' fondamentale in attivita' che richiedono sia la memoria spaziale sia la memoria di riconoscimento degli oggetti, in quanto lesioni dell'una o dell'altra struttura risultano in severi deficit ai test di riconoscimento dell'oggetto nello spazio (Gaffan and Parker, 1996; Bussey et al., 1999, 2000).

Inoltre, studi d'incannulazione della corteccia peririnale hanno migliorato la comprensione dei meccanismi alla base della memoria di riconoscimento. La somministrazione in loco, infatti, esclude il coinvolgimento di numerose altre strutture che potrebbe derivare invece dalla somministrazione sistemica delle sostanze in esame. Il coinvolgimento dei recettori dell'acido glutammico, sia

ionotropici sia metabotropici, e' stato accertato da diversi studi (Winters and Bussey, 2005; Barker et al, 2006a,b), ed anche il ruolo della trasmissione GABAergica e colinergica nella memoria di riconoscimento degli oggetti e' stata studiata, anche tramite test comportamentali (Warburton et al, 2003; Wan et al., 2004).

1.2.2.3 Immunoistochimica.

Utilizzando come modello la valutazione dell'espressione del gene c-fos, marker di attivazione neuronale, e' stato visto che nella corteccia peririnale l'attivazione di questo gene e' maggiore quando all'animale viene presentato un oggetto nuovo, rispetto a quando ne vede uno "familiare" (Zhu et al. 1995). Cio' non avviene allo stesso modo nell'ippocampo (Zhu et al, 1995).

Un'interessante variante di questo metodo consiste nel fare in modo che l'animale veda con un occhio un oggetto nuovo e con l'altro un oggetto familiare; in questo modo si puo' comparare l'attivita' di c-fos tra i due emisferi, minimizzando la variabilita' interindividuale. Studi condotti con questo metodo dimostrano che i neuroni della corteccia peririnale e della corteccia temporale mostrano un aumento nell'espressione di c-fos in risposta all'oggetto nuovo, cosa che non avviene in risposta all'oggetto familiare (Wan et al, 1999).

1.2.2.4 Trasduzione Virale

Infine, la corteccia peririnale e' stata studiata anche tramite tecniche di trasduzione virale. L'attivita' del fattore di trascrizione CREB e' stata impedita tramite l'induzione dell'espressione di una forma inattiva del CREB, il cui gene e' stato introdotto nel neurone grazie al virus. L'isoforma inattiva (dominante) del CREB dimerizza con il CREB nativo ma non e' in grado di legare il DNA. Cio' comporta: (i) deficit della memoria di ricognizione nei test comportamentali, (ii) blocco dell'LTP (iii) blocco dell'attivazione neuronale (Warburton et al, 2005).

1.3 PLASTICITA' SINAPTICA

Le sinapsi devono essere considerate elementi dinamici in grado di cambiare la propria struttura e le proprie funzioni in modo da adattarsi agli input che ricevono. Tali cambiamenti possono riguardare molteplici aree, ad esempio cambiamenti nell'espressione recettoriale, ma di base la plasticita' puo' essere considerata come un aumento (potenziamento) o una diminuzione (depressione) della trasmissione sinaptica. Generalmente, questi eventi si manifestano come cambiamenti nell'ampiezza dei potenziali postinaptici dipendenti dall'attivita' sinaptica stessa. Questo tipo di plasticita' puo' essere di durata variabile: a "breve termine" (da millisecondi a minuti) oppure a "lungo termine" (da ore a giorni).

In generale, si ritiene che la plasticita' prolungata sia alla base della capacita' del cervello di acquisire nuove informazioni (apprendimento) e conservarle nel tempo (memoria) (Bliss and Collingridge, 1993; Malenka and Bear, 2004).

La plasticita' a lungo termine, pertanto, viene comunemente suddivisa in LTP (Long-Term Potentiation) o LTD (Long-Term Depression). I miei studi si focalizzano in particolare sulla LTP.

La LTP e' caratterizzata da un incremento duraturo nella efficacia sinaptica, che puo' essere indotto tipicamente da una stimolazione ad alta frequenza (High Frequency Stimulation, HFS) di 100Hz ed e' ritenuta essere alla base dei cambiamenti che avvengono nel cervello durante l'apprendimento (Bliss and Collingridge, 1993).

La LTP e' stata studiata abbondantemente sulla regione CA1 dell'ippocampo, con attenzione sui vari meccanismi alla base di questo fenomeno nelle diverse sinapsi e su differenti circuiti cerebrali (Malenka and Bear, 2004).

La LTD (Long Term Depression), invece, e' in buona sostanza l'opposto dell'LTP, essendo caratterizzata da un decremento duraturo dell'efficacia sinaptica. Puo' essere indotta tramite stimolazioni a bassa frequenza (Low Frequency Stimulation). Simile alla LTD e' il processo di depotenziamento indotto su sinapsi in precedenza potenziate e pertanto mostranti LTP. Questo processo in sostanza annulla la LTP tramite la stimolazione a bassa frequenza.

Similmente, una LTD indotta primitivamente puo' essere annullata tramite stimolazione ad alta frequenza, un processo che prende il nome di de-depressione (Kemp and Bashir, 2001; Collingridge et al, 2004).

Queste alterazioni "bi-direzionali" e reversibili della risposta sinaptica, dunque, rendono possibile l'immagazzinamento dinamico delle informazioni neuronali (Collingridge et al., 2004).

L'induzione della LTP puo' essere bloccata antagonizzando i recettori NMDA, come dimostrato da studi condotti sulla regione CA1 dell'ippocampo (Collingridge et al, 1983); e' dunque intuibile che tali recettori ricoprono un ruolo primario in questo fenomeno.

Perche' si possa avere LTP e' necessario l'ingresso del Ca^{2+} all'interno della cellula, e cio' e' secondario all'attivazione degli NMDAR. Tali recettori sono inattivi quando i potenziali di membrana della cellula si trovano in una situazione di "riposo", in quanto il canale che essi formano e' bloccato dalla presenza di uno ione Mg^{2+} . Tuttavia quando il neurone viene depolarizzato, tipicamente in seguito all'azione dei recettori NMDA per il glutammato, lo ione Mg^{2+} si stacca dal canale, liberandolo e permettendo l'ingresso nella cellula di Na^{2+} e Ca^{2+} . Cio' provoca la corrente di Ca^{2+} necessaria all'induzione della LTP (Malenka and Bear., 2004).

Tra le proteine intracellulari fondamentali per questo processo, un ruolo di rilievo spetta di sicuro alla Protein Kinasi Ca^{2+} /calmodulina-dipendente di tipo II (CaMKII) (Lisman 2003). Durante l'attivita' sinaptica, questa proteina trasloca dal citoplasma e si lega ai recettori NMDA, dove rileva l'aumento

delle correnti di Ca^{2+} e provoca la cascata di signalling intracellulare coinvolte nell'espressione della LTP.

Molto importante sembra essere anche la Protein Kinasi A (PKA); essa e' necessaria per l'induzione della LTP nell'immediato sviluppo postnatale (Yasuda et al., 2003) ed inoltre blocca l'attivita' della Protein Fosfatasi 1 (PP1), inibitore di CaMKII, mantenendo l'attivazione della Kinasi (Brown et al., 2000).

I meccanismi post-sinaptici coinvolti nell'espressione della LTP NMDAR-dipendente sono principalmente due: l'aumento dei recettori AMPA nella sinapsi tramite meccanismi di "trafficking" e modificazioni degli stessi recettori AMPA tramite la fosforilazione della subunita' Glut1 (Malinow and Malenka, 2002; Malenka and Bear, 2004).

Tale fosforilazione si verifica in diversi siti della subunita' GluR1, ad opera della CaMK II e della PKC, e risulta in un aumento della conduttanza nei canali. CaMK II fosforila la Serina 831 durante la LTP (Barria et al, 1997). Tuttavia, nonostante topi knock-out per GluR1 non mostrino LTP, singole mutazioni di GluR1, come appunto la sostituzione della serina 831 con alanina, esitano solo in una lieve diminuzione della LTP (Lee et al., 2000).

Un altro sito di fosforilazione su GluR1 e' stato identificato nel residuo di Serina 818 (Boehm et al, 2006); la fosforilazione a questo livello aumenta la traslocazione in membrana di recettori AMPA contenenti GluR1.

Questo sito viene fosforilato in seguito alla stimolazione per l'induzione della LTP, e si suppone che la sua fosforilazione sia importante sia per lo stabilirsi della LTP, sia per facilitare l'interazione con proteine che mediano lo spostamento o l'ancoraggio dei recettori NMDA. (Boehm et al, 2006).

Per quanto riguarda il mantenimento dell'LTP, la maggior parte degli studi sembra essersi concentrata sulla fase iniziale, quella che dura 30-60 minuti dopo l'induzione, mentre meno si sa riguardo la fase tardiva della LTP e ai meccanismi che permettono a quest'ultima di durare per ore, giorni o addirittura settimane (Malenka and Bear, 2004). E' stato dimostrato che le fasi tardive della LTP richiedono la sintesi di nuove proteine e la trascrizione genica (Kelly et al., 2000; Bozon et al., 2003, Abraham and Williams, 2003;

Lynch, 2004; Miyamoto, 2006; Reymann and Frey, 2007). In particolare, Scharf et al (2002) hanno dimostrato che la somministrazione di Anisomicina (25 μ M), iniziata 20 minuti prima dell'induzione della LTP e continuata per i 15 minuti successivi, porta alla perdita del potenziamento, con ritorno ai valori di baseline, in circa un'ora.

Le molecole di signalling che sembrerebbero collegare l'induzione della LTP alla trascrizione di nuovi geni sono la Protein- Kinasi Calmodulino-dipendente di tipo IV (CaMK IV), la Protein Kinasi attivata da Mitogeni (MAPK) e la PKA, che induce infine la fosforilazione del fattore di trascrizione CREB (Lynch 2004; Warbuton et al, 2005; Miyamoto, 2006; Reymann and Frey, 2007). La fosforilazione di CREB puo' portare all'attivazione del gene c-fos (Ahn et al, 1998), il cui prodotto, Fos, rappresenta un marker accurato per i processi di memoria di riconoscimento (Warburton et al, 2003; Wan et al, 2004; Warburton et al., 2005). L'inibizione della fosforilazione di CREB nella corteccia peririnale, ottenuta mediante virus, blocca sia l'LTP sia la memoria di riconoscimento a lungo termine (Warburton et al., 2005). Altri studi hanno dimostrato che la fosforilazione di CREB e il mantenimento della LTP sono correlate alla memoria in altre regioni del cervello, come l'ippocampo (Pittenger et al, 2002; Reymann and Frey, 2007). Il legame tra LTP ed altri tipi di memoria, ad esempio quella spaziale (ippocampo) e della paura (amigdala) e' dimostrato in diversi lavori (Morris, 2003; Sigurdsson et al, 2007). E' stato inoltre visto che bloccando il trafficking dei recettori contenenti GluR1 nel 10, 20 % circa dei neuroni responsabili della plasticita' e' sufficiente per impedire la formazione della memoria (Morris et al, 1986; Rumpel et al., 2005).

L'isoenzima della PKC, Protein Chinasi M Zeta (PKM ζ) e la fosfatidil inositolo 3-fosfato kinasi (PI3K) sono implicate nello spostamento dei recettori NMDA contenenti GluR1 nelle sinapsi che hanno subito LTP, nonche' nel mantenimento della LTP (Ling et al, 2002, 2006; Sanna et al., 2002). L'iniezione di un inibitore della PKM nel giro dentato non blocca l'induzione della LTP; tuttavia l'inibizione della PKM ζ annulla la LTP quando effettuata 5 ore dopo l'induzione della stessa (Serrano et al., 2005). Il peptide inibitore, inoltre, annulla la LTP nell'ippocampo anche in vivo e provoca una perdita della memoria spaziale recente, indicando che il mantenimento della LTP puo'

essere alla base della memoria spaziale (Pastalkova et al, 2006). Questi studi, dunque, dimostrano che il ruolo della PKM è fondamentale nelle fasi tardive della LTP.

La LTP provoca anche cambiamenti a livello morfologico, quali crescita di nuove spine dendritiche, accrescimento di spine pre-esistenti e quindi della densità post sinaptica (PSDs) (Abraham and Williams, 2003; Matsuzaki et al, 2004). Anche la polimerizzazione del citoscheletro di actina appare essere importante per la LTP, in quanto alcuni studi dimostrano che nelle spine dendritiche l'LTP provoca l'inibizione della depolimerizzazione dell'actina (Kim and Lisman, 2001; Fukazawa et al., 2003).

Esiste anche una LTP NMDAR-indipendente, localizzata principalmente nelle Mossy Fibers dell'ippocampo (Nicoll and Malenka, 1995; Bortolotto et al, 2003). Il meccanismo alla base di questa particolare forma di LTP, ancor controverso, sembra essere legato all'incremento del Ca^{2+} intracellulare nel terminale presinaptico, conseguente all'attività sinaptica stessa (Nicoll and Malenka, 1995; Mellor and Nicoll, 2001). Altri studi, invece, mostrano che la LTP nelle Mossy-fibres può essere scatenata dall'incremento di calcio postinaptico, dovuto per esempio al rilascio di Ca^{2+} dai compartimenti intracellulari, successivo all'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato (mGluR) (Yeckel et al, 1999; Henze et al, 2000).

L'attivazione a livello presinaptico di recettori del Kainato, ed in particolare della subunità GluR5, è risultato importante per l'induzione della LTP nelle Mossy Fibres (Lauri et al, 2001; Bortolotto et al, 2003; Lauri et al, 2003). È stato proposto che l'influsso di calcio attraverso i recettori per il Kainato provoca un rilascio del Ca^{2+} dai compartimenti intracellulari, conducendo ad un rapido incremento nel rilascio di glutammato da parte dei terminali presinaptici e quindi nell'innesco dei meccanismi che inducono la LTP (Lauri et al, 2003). Inoltre, sembra che elevate concentrazioni di Ca^{2+} nella soluzione extracellulare possano portare all'ingresso di un quantitativo sufficiente di ioni Ca^{2+} all'interno della cellula, tramite i canali per il calcio di tipo L, portando alla formazione di LTP presumibilmente tramite l'interazione del Calcio con la PKA. Pertanto, anche la concentrazione extracellulare di

Ca²⁺ potrebbe influenzare l'induzione della LTP nelle Mossy Fibres (Lauri et al., 2003).

Il ruolo della PKA nell'induzione della LTP nelle Mossy Fibers e' stato oggetto di diversi studi (Malenka and Bear, 2004; Castillo et al, 1997; Sudhof, 2004), ma il meccanismo alla base rimane ancora poco chiaro.

1.4 Protein Kinasi M ζ (PKM ζ)

Tra le numerose proteine implicate in questo fenomeno, una in particolare, la Protein Kinasi M Zeta (PKM ζ) si è dimostrata cruciale per il mantenimento della LTP.

PKM ζ è un particolare sottotipo dell'isoforma ζ della Protein Kinasi C (PKC). La famiglia delle PKC, infatti, comprende tre gruppi: le PKC "Convenzionali" (α , β I, β II, γ), le "Nuove" (δ , ϵ , η , θ) e le "Atipiche" (ζ , ι/λ) (Nishizuka 1988, 1995). Le PKC "Convenzionali" sono attivate da secondi messaggeri quali Diacilglicerolo (DAG) e Ca²⁺; le PKC "Nuove" sono attivate solo dal DAG, mentre le "Atipiche" né dall'uno né dall'altro, e sono invece regolate da un diverso set di secondi messaggeri, comprendente Acido Arachidonico (Nakanishi and Exton, 1992), Fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato (Nakanishi et al., 1993) e Ceramide (Muller et al, 1995).

L'isoforma M della PKC ζ è composta unicamente dal dominio catalitico dell'enzima (**Figura 1.4.1**); pertanto, essendo priva del dominio regolatore, risulta essere costitutivamente attiva. È inoltre l'unico isoenzima della famiglia delle PKC a possedere una stabile isoforma di tipo M nell'Ippocampo (Sacktor et al, 1993; Naik et al, 2000). È inoltre espressa diffusamente nel tessuto cerebrale, ed è sintetizzata partendo da uno specifico mRNA che codifica esclusivamente per il dominio catalitico della proteina; contrariamente a quanto si riteneva in passato, dunque, essa non è semplicemente un prodotto di splicing (Hernandez et al., 2003). La sua sintesi è indotta da uno stimolo ad alta frequenza (Osten et al., 1996) ed è stato dimostrato che la sua

espressione aumenta durante il mantenimento della LTP (Sacktor et al., 1993).

L'importanza di questo enzima risiede nel fatto che è stato dimostrato essere necessario e sufficiente per il mantenimento della LTP (Ling et al., 2002, Serrano et al., 2005), mentre non sembra rivestire alcun ruolo nell'induzione della stessa. Infatti, l'inibizione di PKM ζ ad opera di uno pseudosubstrato inibitorio (ZIP) annulla un potenziamento già stabilito, ma non ha alcun effetto sull'induzione dello stesso, né sulle fasi precoci della LTP (Serrano et al., 2005). ZIP agisce ricostituendo il dominio catalitico, di cui PKM ζ è priva (**Figura 1.4.1**).

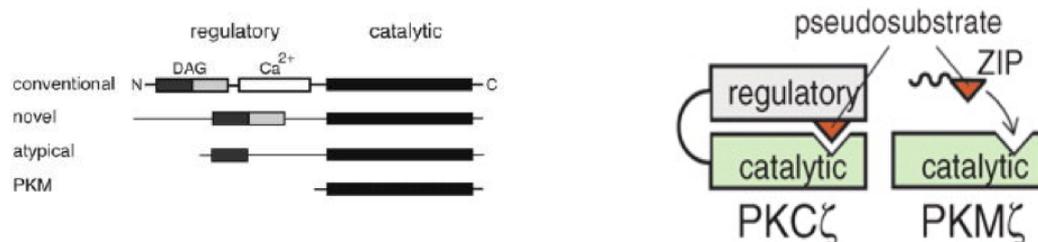


Figura 1.4.1: Sinistra: l'immagine mostra la struttura delle varie isoforme di PKC appartenenti a diverse famiglie. PKM ζ è costituita unicamente dal dominio catalitico di PKC ζ , pertanto è costitutivamente attiva (Naik et al., 2000). Destra: la figura mostra il sito di azione del peptide inibitore selettivo di PKM ζ , ZIP. ZIP è uno pseudo substrato che agisce ripristinando il dominio regolatore non presente in PKM ζ (Pastalkova et al., 2006).

In esperimenti condotti *in vivo*, è stato dimostrato che il peptide inibitore è in grado di annullare la LTP nell'ippocampo e provoca una perdita specifica della memoria spaziale recente (Pastalkova et al., 2006). Inoltre, il blocco di PKM ζ nella corteccia insulare provoca la cancellazione della memoria a lungo termine, in maniera apparentemente irreversibile (Shema et al., 2007).

Questi studi, dunque, dimostrano che il ruolo della PKM ζ è fondamentale nelle fasi tardive della LTP.

I meccanismi tramite i quali PKM ζ mantiene il potenziamento sinaptico sono ancora oggetto di studi. L'ipotesi al momento più accreditata è che l'enzima sia coinvolto nel trafficking dei recettori AMPA (Ling et al., 2006); recenti studi

inoltre dimostrano che tale trafficking è dipendente dall'interazione N-Ethylmaleimide-sensitive Factor/GluR2 (Yao et al., 2008). Inoltre, recenti studi suggeriscono che PKM ζ regoli il trafficking degli AMPA non favorendone l'inserzione in membrana, ma bloccandone la rimozione (Migues, Hardt et al. 2010).

Anche la regolazione dell'attività di PKM ζ resta ancora in attesa di conferma. La teoria al momento più accreditata è che la sintesi di PKM ζ sia regolata da diverse protein kinasi (PI-3-Kinasi, MAP Kinasi, Protein Kinasi A, CAM Kinasi); la proteina viene poi attivata tramite fosforilazione sul suo "activation loop" (pT410) da parte della Protein Kinasi-1 Fosfoinositide-dipendente (PDK1). Una volta fosforilata, e dunque attiva, PKM ζ dà origine ad un loop di feedback positivo che auto mantiene l'incremento della sua sintesi durante il mantenimento del potenziamento sinaptico (Kelly et al., 2007). In effetti, il meccanismo con cui PDK1 promuove l'attivazione di PKM ζ è leggermente diverso dal suo effetto sugli altri enzimi su cui agisce. PDK-1 è una serin/treonin kinasi, la cui attività è secondaria all'attività della PI-3-Kinasi. Essa attiva, fosforilandole, diverse kinasi, tra cui PKC; ha, dunque, un ruolo fondamentale nella regolazione di processi quali proliferazione cellulare, differenziamento ed apoptosi. La differenza nell'azione di PDK1 sulle PKC dotate di dominio regolatore, rispetto all'azione esercitata sulle "atipiche"; tra cui PKC ζ , consiste nel fatto che la fosforilazione dell'activation loop sulle PKC convenzionali le "predispongono" ad una piena attivazione conseguente alla cascata di secondi messaggeri, che eliminano l'inibizione dovuta al dominio regolatore (il quale le mantiene in una conformazione ancora inattiva, nonostante la fosforilazione sull'"activation loop"). PKC ζ , invece, una volta fosforilata è immediatamente attiva (meccanismo "on/off") (Le Good et al., 1998; Dong et al., 1999; Balendran et al., 2000a/b).

Recenti studi hanno dimostrato che l'attività di PDK1 può essere bloccata dal Celecoxib, un membro della famiglia dei Farmaci Antiinfiammatori Non Steroidei (FANS), più precisamente appartenente al gruppo dei Coxib, inibitori specifici dell'attività della Cicloossigenasi 2 (Cox2) (Arico et al., 2002; Kulp et al., 2004). Un altro composto, tuttavia, si è dimostrato capace di inibire

l'attivazione di PDK-1: l'acido 3-Idrossiantranilico (3HAA), un prodotto di ossidazione del triptofano. Esso lega PDK-1 nel suo binding site per l'ATP tramite legami idrogeno e blocca l'autofosforilazione in questo sito, essenziale per l'attività dell'enzima (Hayashi et al., 2007).

Un'altra via attraverso cui PKM ζ potrebbe mantenere alti i livelli della sua propria sintesi comprendono proteine note come "protein interacting with NIMA 1" (Pin-1). La sintesi di PLM ζ , infatti, è inibita da Pin-1. Pin-1 blocca la sintesi proteica nei dendriti, ma attività di signalling mediate dal glutammato, che inducono LTP e stimolano la formazione di memoria, inibiscono Pin-1, permettendo la sintesi proteica. La neo-sintetizzata PKM ζ , quindi, inibisce a sua volta Pin-1, auto-mantenendo la propria sintesi ed attività (Sacktor 2010; Westmark, Westmark et al. 2010). Inoltre, è stato proposto (Westmark, Westmark et al. 2010) che Pin1 normalmente blocchi la sintesi proteica tramite l'interazione con 4E-BPs. 4E-BPs sono fosforilate da mTOR in modo da rimuovere l'inibizione della sintesi proteica (Hoeffler and Klann 2010). Se PKM ζ mantiene elevati livelli di trasmissione sinaptica tramite la sintesi proteica, allora questo meccanismo probabilmente coinvolge processi mTOR-dipendenti.

1.5 Scopo dello studio

Date queste premesse, e dopo aver dimostrato che anche nella corteccia peririnale il mantenimento della LTP dipende dalla sintesi proteica, il mio lavoro si è dunque indirizzato allo studio, sempre tramite tecniche di elettrofisiologia (registrazione in field) del ruolo di PKM ζ nel mantenimento della LTP nella corteccia peririnale nell'adulto, nonché dei vari meccanismi alla base della regolazione dell'attività dell'enzima. Parallelamente, abbiamo studiato l'attività di PKM ζ durante il neurosviluppo, vagliandone gli effetti su animali più giovani, più precisamente a 14 (P14) e 35 giorni di vita (P35).

2 MATERIALI E METODI

2.1 Elettrofisiologia

2.1.1 Animali

Gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati condotti su fettine di corteccia peririnale ottenute da ratti maschi Dark Agouti (DA) adulti (7-15 settimane, 170-300 gr.), oppure a 14 o 35 giorni di vita post natale (P14 e P35, rispettivamente). Gli animali sono stabulati con un ciclo luce/buio di 12 ore, con la fase di buio fissata durante il giorno (dalle ore 9.00 alle ore 21.00).

2.1.2 Preparazione di fettine di corteccia peririnale e ippocampo:

Gli animali sono anestetizzati con una miscela gassosa contenente ossigeno ed isoflurano finché il riflesso di ammiccamento non fosse più evocabile. I ratti sono stati in seguito decapitati utilizzando una ghigliottina. Il cervello viene rapidamente rimosso ed immerso in liquido cerebrospinale artificiale (aCSF) freddo (composizione dell' aCSF, mM: NaCl, 125; KCl, 2; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 1; MgSO₄, 6; D-Glucosio, 10; pH 7.4). L' aCSF, sempre fresco, viene preparato prima dell'esperimento da uno stock 10X.

Il cervello è poi posizionato su carta da filtro e sottoposto ad un taglio lungo il solco sagittale mediale, utilizzando un bisturi, in modo da essere suddiviso nei suoi due emisferi. Un emisfero è riposizionato nell'aCSF freddo, mentre l'altro viene adagiato sulla faccia mediale per la dissezione. La maggior parte del lobo frontale è asportato tramite un taglio, angolato di circa 40°, lungo l'asse dorso-ventrale. Il cervelletto ed una porzione del lobo occipitale sono asportati tramite un secondo taglio, condotto con la stessa angolatura. L'emisfero è poi adagiato con la porzione caudale e fissato tramite un collante (cianoacrilato) su un supporto da microtomo; il tessuto è inoltre supportato medialmente da un blocco di Sylgard TM (elastomero di silicone). Il cervello viene in seguito tagliato coronalmente, utilizzando un microtomo, in fettine di 400µm di spessore. Le fettine includono le aree 35 e 36 di Brodmann (corteccia Peririnale), più le cortecce entorinale e temporale, che corrispondono ai livelli rostro-caudali da -3.80 a -5.80 mm dal Bregma, in accordo a quanto riportato nell'Atlante di

Paxinos e Watson (1998). Una volta tagliate, le fettine sono posizionate in un contenitore contenente aCSF ossigenato, a temperatura ambiente, e lasciate riposare per almeno un'ora prima di essere sottoposte alle procedure di registrazione.

Per quanto riguarda le fettine di ippocampo, gli emisferi cerebrali venivano incollati dal lato laterale ad un supporto da vibratomo e tagliati in modo da ottenere fettine parasagittali dello spessore di 400 μ m. Le fettine includono le aree ippocampali CA1, CA2 e CA3. Una volta tagliate, le fette venivano poste in un contenitore con aCSF ossigenato e mantenute a temperatura ambiente a riposare e riequilibrarsi per almeno un'ora prima dell'inizio delle registrazioni.

2.1.3 Extracellular Field Recording

2.1.3.1 Apparato e tecnica.

L'apparato (Rig) e' strutturato in modo da permettere un flusso costante di aCSF ossigenato all'interno della camera di registrazione. La camera di registrazione consiste in un vetrino coprioggetto posizionato tra un disco di metallo ed un disco di Perspex, sigillati tra loro tramite silicone. Le fettine di corteccia sono mantenute sempre nella medesima posizione da fili di Nylon fissati ad un supporto a forma di U, ottenuto intrecciando due pezzi di filo d'argento (0.55 mm di diametro).

Il liquido cerebrospinale, ossigenato (95% O₂/ 5% CO₂), mantenuto alla temperatura di 28° C \pm 1, viene incanalato in tubi di poliene (diametro interno, 1.4mm) tramite una pompa peristaltica, fino a gocciolare in una siringa da 2 ml che funge da reservoir. Nella siringa, l'aCSf viene nuovamente ossigenato per assicurare una saturazione costante. Il reservoir di aCSF fornisce un rifornimento costante alla camera di registrazione e d elimina inoltre le fluttuazioni di flusso dovute alla pompa peristaltica. Il volume di flusso e' fissato a 2-3 ml/minuto; l'aCSF in eccesso viene eliminato dalla camera di registrazione tramite una pompa di suzione, attraverso un ago. La camera di registrazione contiene circa 1.5-2 ml di liquido.

Direttamente al di sopra della camera di registrazione e' posizionato un microscopio (ingrandimento, 40X); gli elettrodi di stimolazione e l'elettrodo di

registrazione sono montati su supporti magnetici su una piattaforma di metallo, per evitare spostamenti degli stessi. Gli elettrodi di stimolazione sono posizionati ai due lati della camera di registrazione, mentre l'elettrodo di registrazione si trova davanti ad essa.

Tutti gli apparecchi elettrificati sono collegati ad una terra per eliminare interferenze.

Gli elettrodi di registrazione sono ottenuti da capillari di borosilicato (diametro esterno, 1.5mm; diametro interno, 0.86 mm). I capillari sono modellati in micropipette utilizzando un apposito macchinario. Le micropipette vengono poi riempite con aCSF utilizzando un ago sottile ed una siringa da 1 ml; tra l'ago e la siringa e' posizionato un filtro per evitare che qualsiasi particella estranea possa trovarsi all'interno della pipetta, disturbando il processo di registrazione. La pipetta e' montata ad un supporto, contenente al suo interno un filo d'argento clorurato, che funge da elemento di registrazione vero e proprio. Il tutto e' poi fissato ad un supporto, montato su un micromanipolatore.

L'elettrodo di registrazione e l'elettrodo di riferimento sono ottenuti tramite un filo d'argento (0.25 mm di diametro). Il filo viene clorurato tramite immersione overnight in comune ipoclorito di sodio. Questo processo serve a ridurre il rumore di fondo ed eventuali interferenze durante la registrazione. Il cloruro d'argento che si viene a creare, infatti, ha bassi potenziali redox, minimizzando in questo modo eventuali reazioni di ossidoriduzione che potrebbero verificarsi tra gli elettrodi metallici e il bagno di aCSF.

L'elettrodo di registrazione e' collegato ad un box di registrazione, mentre l'elettrodo di riferimento e' fissato lungo il perimetro della camera di registrazione e collegato a terra sempre per mezzo del box sopracitato.

Gli elettrodi di stimolazione sono ottenuti intrecciando due fili di nickel-cromo (diametro 0.05mm). Ogni elettrodo viene fatto passare in una pipetta di vetro, che funge da protezione all'elettrodo stesso, alla quale vengono fissati tramite Blue Tack TM. Gli elettrodi sono montati su supporti magnetici e collegati a unita' di stimolazione (una per ogni elettrodo) situate all'interno del rig.

2.1.3.2 Extracellular Field Recording: procedura, acquisizione e rielaborazione dei dati.

Viene posizionata una singola fettina nella camera di registrazione, curando che rimanga completamente sommersa dall'aCSF.

La pipetta di vetro contenente l'elettrodo di registrazione viene a sua volta riempita con aCSF e posizionata immediatamente al di sotto del solco rinale, tra gli strati corticali II/III, facendo in modo che la punta tocchi appena la superficie della fettina.

Gli elettrodi di stimolazione, invece, vengono posizionati (sempre all'interno della corteccia peririnale), uno in senso dorso-rostrale sul versante temporale (area 35/36) e l'altro in senso ventro-caudale sul versante entorinale (area 35/corteccia entorinale) del solco rinale. Gli elettrodi devono essere quanto piu' possibile equidistanti (circa 1-2 mm) dall'elettrodo di registrazione, che si trova nel mezzo.

Gli elettrodi vengono stimolati alternativamente ogni 15s (0.033Hz); viene calcolata la media di quattro fEPSPs (field excitatory postsynaptic potentials) consecutivi per ognuno dei due input. Per ottenere la risposta, si utilizza inizialmente un input di circa 20V, modulato per ottenere risposte con picchi di ampiezza di valore compreso tra -0.50 e -1.00 mV. L'intensita' di stimolazione viene poi diminuita fino ad ottenere un'ampiezza pari a circa il 65-70% della risposta massimale. Si determina un periodo di registrazione costante (baseline) di circa 60 minuti prima di procedere all'induzione dell'LTP. Un periodo prolungato di baseline si e' reso necessario per assicurarsi che la risposta fosse realmente stabile e costante.

Per quanto riguarda gli esperimenti condotti in ippocampo, l'elettrodo di registrazione viene posto in area CA1, e i due elettrodi di stimolazione sono posizionati in modo da stimolare uno le Shaffer Collateral e l'altro la Perforant Path.

L'LTP e' stata indotta negli esperimenti-pilota utilizzando due protocolli distinti: quattro impulsi da 100 Hz, della durata di un secondo ciascuno, somministrati o ogni 20 secondi oppure ogni 5 minuti, come descritto da Scharf et al, 2002. In seguito il primo protocollo e' stato abbandonato e la LTP e' sempre stata indotta con quattro stimolazioni somministrate ogni 5 minuti, in quanto quest'ultima procedura risulta essere la piu' adatta per studiare la fase tardiva della LTP. Il

periodo di registrazione e' stato prolungato per circa 6 ore dopo l'induzione della LTP (controlli). Il depotenziamento è stato indotto tramite protocolli di Low Frequency Stimulation (LFS) a 5 HZ (3000 stimoli in 10 minuti) negli esperimenti condotti su tessuti adulti, o 1Hz (900 stimoli, 15 minuti) quando gli esperimenti venivano condotti su P14.

Maggiori dettagli sui metodi sperimentali di registrazione verranno presentati insieme ai singoli esperimenti.

Al termine dell'esperimento, si procede ad un wash-out con aCSF non contenente Ca^{2+} . Cio' elimina la componente sinaptica della risposta e dunque permette l'esclusione della componente non-sinaptica dall'analisi dei picchi di ampiezza (fEPSP).

I dati ottenuti vengono registrati su un PC utilizzando il software Ltpm100 (Anderson and Collingridge, 2001), tramite il quale vengono anche, in seguito, rianalizzati e normalizzati rispetto ai valori della baseline. I dati vengono presentati graficamente come medie normalizzate \pm Errore standard (SEM). I valori sono espressi come relativi alla baseline e le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il paired student's t- test.

2.1.4 Agenti farmacologici

Soluzioni di stock sono state preparate dissolvendo le sostanze in ddH₂O, HCl o DMSO, in base a quanto ripostato sui datasheets di ciascun composto, aliquotate e conservate a -20°C. Tutte le soluzioni di stock sono state preparate \geq 100x la concentrazione finale necessaria.

I composti sono stati ottenuti dai seguenti fornitori:

Ascent Scientific, Bristol, UK

MPEP 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride.

Sigma-Aldrich, Poole, UK

HAA, 3-Hydroxyanthranilic acid.

Tocris, Bristol, UK

Anysomicin, AP5 *D*-2-amino-5-phosphonopentanoate, KU 0063794 *rel*-5-[2-[(2*R*,6*S*)-2,6-dimethyl-4-morpholinyl]-4-(4-morpholinyl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl]-2-methoxybenzenemethanol, LY294002 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4*H*-1-benzopyran-4-one hydrochloride, LY456236 6-Methoxy-*N*-(4-methoxyphenyl)-4-quinazolinamine hydrochloride, Rapamycin, Wortmannin, ZIP Zeta Inhibitory Peptide.

2.2 Biologia Molecolare**2.2.1 Western Blot.**

La corteccia peririnale e' stata preparata da ratti adulti e aPND14 e conservata congelata a -80°C. Il giorno dell'esperimento, campioni di tessuto congelato sono stati lisati in 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 buffer, ed e' stato aggiunto in cocktail di inibitori di proteasi (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA). La concentrazione proteica di ogni campione e' stata determinata via Bio-Rad Assay e aliquote da 50µg di ciascun campione sono state sottoposte a standard SDS-PAGE e corse su gel di poliacrilamide al 12%, che sono stati in seguito trasferiti su membrane di nitrocellulosa (Hybond-C Extra Amersham Bio). Le membrane sono state poi bloccate per 1h con TTBS buffer contenente latte in polvere al 5% (100mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4). Le membrane sono state infine incubate overnight a 4°C con un anticorpo policlonale anti-PKCζ (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) o con un anticorpo monoclonale anti-β-actina (1:5000, Sigma Aldrich, Gillingham, Dorset, UK). Le membrane sono state lavate tre volte con TTBS e poi incubate per 1h con anticorpi secondari accoppiati a perossidasi, anti-rabbit or anti-mouse IgG rispettivamente (1:10,000 Sigma Aldrich, Gillingham, Dorset, UK). Tutte le incubazioni con anticorpi sono state condotte in un buffer di TTBS e latte al 5%. Le membrane sono state infine sviluppate utilizzando BM Chemiluminescence

Western Blotting Substrate (Roche, Burgess Hill, West Sussex, UK). I dati ottenuti sono stati graficati come livelli di proteina (misurati alla densitometria) normalizzati per i rispettivi livelli di actina (proteina strutturale normalmente utilizzata come controllo).

3 RUOLO E REGOLAZIONE DI PKM ζ NELLA PLASTICITÀ SINAPTICA IN CORTECCIA PERIRINALE DI ADULTO

La funzione primaria della corteccia peririnale è nella memoria di riconoscimento degli oggetti. In seguito alla dimostrazione che vi è una risposta decrementale nei neuroni peririnale in seguito all'esposizione oggetti familiari (Brown e Xiang 1998), è stato proposto che i meccanismi che si basano su una depressione della trasmissione sinaptica nelle sinapsi di corteccia peririnale possano fornire un modello per comprendere come la corteccia peririnale sia coinvolta nel mantenimento della memoria di riconoscimento (Brown e Aggleton, 2001; Brown e Bashir, 2002). Pertanto, la maggior parte della ricerca si è focalizzata sui meccanismi LTD-simili nella corteccia peririnale, quindi molto meno interesse è stato generato, al contrario, nello studio della LTP in questa particolare regione del cervello. Nonostante in letteratura siano presenti lavori che confermano la possibilità di indurre LTP negli strati II/III della corteccia peririnale di ratti adulti (Ziakopoulos, Tillett et al 1999; Massey, Johnson et al 2004), i meccanismi alla base del mantenimento delle fasi tardive LTP non sono mai stati ampiamente indagati. Così, gli esperimenti che seguono mirano a stabilire se è possibile indurre una LTP stabile nella corteccia peririnale, della durata di più di 3 ore, e quali sono i meccanismi molecolari coinvolti nella manutenzione di questo potenziamento. È stato dimostrato in passato in diverse aree cerebrali (ippocampo) che una forte HFS è in grado di indurre una robusta LTP, e che questo potenziamento dipende da una continua sintesi proteica (Abraham e Williams 2003; Bozon, Davis et al 2003; Bozon, Kelly et al 2003; Lynch 2004; Miyamoto 2006). Nei primi esperimenti (Frey, Krug et al 1988; Abraham e Williams, 2003; Bozon, Davis et al 2003; Bozon, Kelly et al 2003; Lynch 2004; Miyamoto 2006) è stato dimostrato che un trattamento di 3 ore con Anisomicina (un potente inibitore della sintesi proteica) subito dopo la somministrazione di HFS provoca gradualmente la diminuzione del potenziale eccitatorio postsinaptico nell'ippocampo. Inoltre, (Scharf, Woo et al. 2002) Anisomicina blocca l'induzione di LTP se applicata da 30 minuti a 1 ora dopo la somministrazione di HFS in vitro. Lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato anche un protocollo particolare, chiamato

"Spaced" tetra-burst stimulation (4x100Hz trains somministrati a intervalli di 5 minuti), è in grado di indurre una LTP di maggiore durata, che sembra anche essere maggiormente dipendente dalla sintesi di nuove proteine (Scharf, Woo et al. 2002). Un crescente numero di lavori dimostra che l'isoforma costitutivamente attiva di PKC ζ , PKM ζ , è necessaria e sufficiente per il mantenimento (ma non l'induzione), della LTP, sia in vitro che in vivo (Sacktor, Osten et al. 1993; Serrano, Yao et al 2005;. Pastalkova, Serrano et al 2006;. Shema, Sacktor et al 2007;. Serrano, Friedman et al 2008). Al contrario, nessun ruolo per PKM ζ nell'induzione o il mantenimento di LTD è stato dimostrato; inoltre, la sintesi e l'attività di questa proteina sembrano essere down-regolate in seguito a LTD (Hrabetova e Sacktor 1996;. Osten, Hrabetova et al 1996; Hrabetova e Sacktor 2001). Inoltre, PKM ζ è nota per essere costitutivamente attiva, nel senso che non ha bisogno di nessuno dei secondi messaggeri richiesti dalle full-length PKCs per esercitare la loro funzione (Sacktor, Osten et al. 1993). Tuttavia, come molte altre PKCs full-length, PKM ζ necessita di essere fosforilata sul suo activation loop (T410), probabilmente dalla kinasi fosfoinositide-dipendente di tipo 1 (PDK1) (Kelly, Crary et al. 2007). Pertanto, le tematiche affrontate in questo lavoro sono (1) determinare che sia di fatto possibile indurre una robusta, stabile in LTP nella corteccia peririnale di ratto adulto, che si mantenga per almeno 5-6 ore (2) determinare se questa LTP è dipendente o no dalla sintesi proteica, (3) determinare il ruolo di PKM ζ nel mantenimento del potenziamento sinaptico nella corteccia peririnale; (4) definire se PKM ζ è in alcun modo coinvolta anche nella induzione e / o il mantenimento di LTD nella corteccia peririnale, (5) se è possibile modulare l'attività di PKM ζ , e di conseguenza il suo effetto sul mantenimento della LTP attraverso l'inibizione della PDK1.

3.1 Risultati

3.1.1 Induzione di LTP in corteccia peririnale di ratto adulto

Dopo una registrazione di base di 60 minuti, LTP è stata indotta in una pathway utilizzando una tetra "Spaced" tetra-burts stimulation (4x100Hz trains, durata 1s, all intervallo di 5 minuti tra le stimolazioni). Nessuna stimolazione di condizionamento è stata somministrata all'altra pathway, che è stata usata come controllo. I dati sono stati normalizzati ai valori di baseline dei 60 minuti che precedono la somministrazione del protocollo HFS. La **figura 3.1** e **3.2** mostrano che è possibile indurre una significativa LTP ($p < 0,05$), e il potenziamento rimane stabile per $> 5h$ dopo la somministrazione del protocollo di HFS ($126 \pm 4\%$ della baseline, $n = 4$).

3.1.2 La LTP in corteccia peririnale dipende dalla sintesi di nuove proteine

Dopo una registrazione di baseline di 60 minuti, LTP è stata indotta in una pathway utilizzando uno "Spaced" tetra-burts stimulation protocol (LTP: $135 \pm 6\%$ della baseline, $p < 0.05$, $n = 5$). Anisomicina $20\mu M$ è stata da 30 minuti prima ad 1 ora dopo l'induzione della LTP. Nessuna stimolazione è stata somministrata all'altra pathway, che è stato usata come controllo. I dati sono stati normalizzati ai 60 minuti di baseline che precedono la somministrazione del HFS. Le **figure 3.3** e **3.4** mostrano che l'anisomicina impedisce il mantenimento della LTP in corteccia peririnale ($102 \pm 5\%$ di base, $n = 5$), a conferma che il mantenimento della potenziamento richiede la sintesi di nuove proteine.

3.1.3 Ruolo di PKM ζ nel mantenimento della LTP nella corteccia peririnale dell'adulto.

Dopo un periodo di registrazione di baseline di circa 60 minuti, LTP viene indotta utilizzando il protocollo descritto in precedenza (LTP: $131 \pm 5\%$ della baseline, 60 min post HFS, $p < 0.01$, $n=7$). Il potenziamento così ottenuto viene registrato per le successive tre ore, dopodiché viene somministrato l'inibitore ZIP ($5\mu\text{M}$). Questa concentrazione di ZIP è stata scelta in quanto è quella che produce il massimo effetto inibitorio su PKM (Serrano et al., 2005). L'inibitore viene somministrato dopo 180 minuti dall'induzione della LTP in quanto ci permette di essere sicuri di trovarci sicuramente in fase di mantenimento del potenziamento. In seguito alla somministrazione di ZIP, si osserva un graduale ma rapido (120 minuti) ritorno ai valori di baseline nel pathway potenziato (**Figura 3.5 e 3.6**, $98 \pm 5\%$; $n=7$, $p<0.01$). L'induzione della LTP è visualizzata come frecce con la punta rivolta verso l'alto). L'altro pathway è utilizzato come controllo; ZIP dimostra di avere un piccolo, non significativo effetto anche sulla trasmissione sinaptica della pathway di controllo ($93 \pm 4\%$ of baseline, $P > 0.05$, $n = 7$).

Questi risultati ci permettono di affermare che, come nell'ippocampo, il mantenimento della LTP in corteccia peririnale è dipendente dall'attività di PKM ζ , poiché l'inibizione specifica di questa proteina è sufficiente per annullare il potenziamento sinaptico.

Un minimo effetto del composto si evidenzia però anche nel pathway di controllo, non potenziato, con una lieve diminuzione (non statisticamente significativa) della risposta (circa 15-20%). Per fugare il dubbio che tale effetto fosse dovuto ad un casuale, lieve potenziamento delle pathway di controllo in seguito all'induzione di LTP sull'altra pathway (contaminazione), ulteriori esperimenti si sono resi necessari.

3.1.4 Attività di PKM ζ su pathways non potenziate.

Per testare l'attività di PKM ζ in pathways non potenziate, ZIP 5 μ M è stato somministrato dopo 60 minuti di registrazione, utilizzati come baseline di riferimento. Anche in questo caso è stato possibile notare una lieve depressione della risposta sinaptica, ancora nell'ordine del 15-20% (**Figura 3.7**, pathway temporale: $89 \pm 2\%$ della baseline, $p > 0.05$; entorinale $88 \pm 2\%$ of baseline, $p > 0.05$, $n=4$). Questi dati confermano che l'inibizione di PKM ζ possiede un minimo effetto anche sulla trasmissione sinaptica di base. Una ipotesi che potrebbe spiegare questo effetto si fonda sul principio che PKM ζ è in grado di incrementare la trasmissione sinaptica aumentando il numero di recettori AMPA postsinaptici (Ling et al., 2006). Si può pertanto ipotizzare che PKM ζ possa essere coinvolta anche nella trasmissione sinaptica basale, modulando il trafficking costitutivo dei recettori AMPA (McCormack, Stornetta et al. 2006).

3.1.5 Ruolo di PKM ζ nel depotenziamento sinaptico.

Dopo aver dimostrato il ruolo cruciale di PKM ζ nel mantenimento della LTP, e posto che l'attività di questo enzima aumenta dopo induzione del potenziamento sinaptico, ci siamo domandati quale effetto un depotenziamento potrebbe avere sull'attività della kinasi.

Come mostrato in **figura 3.8** e **3.9**, in questi esperimenti l'induzione di LTP ($132 \pm 5\%$ della baseline, $p < 0.05$, $n=5$) in una delle pathways dopo una baseline di 60 minuti è stata seguita dalla somministrazione di un protocollo di depotenziamento (LFS, 5Hz) che riportava la trasmissione sinaptica a valori di baseline ($101 \pm 2\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n=5$). 180 minuti dopo l'induzione della LTD, è stato somministrato l'inibitore ZIP (5 μ M). Tuttavia, il composto non ha mostrato di avere alcun effetto sulla risposta sinaptica, suggerendo

una down-regulation dell'attività di PKM ζ in seguito al depotenziamento ($98 \pm 4\%$, $p > 0.05$, $n=5$).

Per quanto riguarda la seconda pathway, invece, dopo l'induzione della LTP ($128 \pm 5\%$ della baseline, $p < 0.01$, $n=5$), è stata diminuita l'intensità di stimolazione (freccia rivolta verso il basso) in modo da ottenere delle risposte sinaptiche di ampiezza simile a quelle del pattern depotenziato ($99 \pm 4\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n=5$), mantenendo però il potenziamento indotto dalla somministrazione del protocollo di LTP. In questo caso, ZIP si è dimostrato capace di ridurre l'ampiezza della risposta sinaptica ($65 \pm 5\%$ della baseline, $p < 0.01$ v baseline, $p < 0.001$ v la risposta misurata dopo al riduzione dell'intensità di misurazione, $p < 0.01$ v l'effetto di ZIP nel pathway depotenziato, $n=5$), dimostrando dunque che PKM ζ è ancora attiva.

3.1.6 Ruolo di PKM ζ nel depotenziamento sinaptico in presenza dell'antagonista dei recettori NMDA per il glutammato, D-AP5.

Nella corteccia peririnale, la LTD (e dunque il depotenziamento sinaptico) è dipendente dall'attivazione dei recettori NMDA e può essere bloccata dall'antagonista dei recettori NMDA, D-AP5 (Massey et al., 2004). Poiché abbiamo dimostrato che l'attività di PKM ζ è bloccata in seguito a depotenziamento, ci siamo chiesti quale potesse essere il comportamento dell'enzima quando il depotenziamento fosse inibito. Pertanto, come mostrato in **figura 3.10** e **3.11**, dopo l'induzione di LTP su una pathway (\bullet , $148 \pm 7\%$ della baseline, $p < 0.01$, $n=5$), il protocollo di depotenziamento è stato somministrato in presenza dell'antagonista NMDA, D-AP5 ($50 \mu\text{M}$, applicato 30 minuti prima della somministrazione della LFS fino alla fine del protocollo stesso). In questo caso, il depotenziamento è bloccato da D-AP5 ($148 \pm 8\%$ della baseline, $p < 0.01$ v baseline, $p > 0.05$ v LTP, $n=5$) e ZIP, somministrato sempre 180 minuti dopo l'induzione di LTP, è ancora capace di ridurre la risposta sinaptica ($102 \pm 2\%$ della baseline, $p < 0.001$ v LTP, $p > 0.05$ v baseline, $n=5$).

La pathway depotenziata, dunque, si comporta esattamente come la pathway di controllo (\circ), dove solo la LTP è stata indotta ($137 \pm 4\%$ della baseline, $p < 0.01$, $n=5$). Pertanto, se il depotenziamento è bloccato, l'attività di PKM ζ non è inibita e l'enzima è ancora attivo, potendo essere in seguito inibito da ZIP ($100 \pm 4\%$ della baseline, $p < 0.001$ v LTP, $p > 0.05$ v baseline, $p > 0.05$ v ZIP nell'altra pathway, $n=5$). Quindi la down regulation dell'attività della kinasi è determinata da un depotenziamento sinaptico effettivo e dalle modificazioni intracellulari che ne conseguono (ad esempio attivazione di determinate fosfatasi che potrebbero, direttamente o indirettamente, avere un effetto sullo stato di PKM ζ).

3.1.7 Ruolo di PKM ζ nell'induzione di LTD nella corteccia peririnale di ratti adulti.

Una volta stabilito il ruolo di PKM ζ nel mantenimento dell'LTP, e avendo dimostrato che la sua attività è inibita dalla somministrazione di un protocollo di depotenziamento, abbiamo voluto investigare sull'eventuale ruolo della kinasi nell'induzione di Long Term Depression (LTD), meccanismo ritenuto fondamentale nei processi di apprendimento in corteccia Peririnale (Brown and Aggleton, 2001). Come mostrato nella **figura 3.12** e **3.13**, Un protocollo di Low Frequency Stimulation (LFS) è stato somministrato dopo una baseline di 30 minuti nella pathway di controllo (\bullet) ottenendo LTD ($69 \pm 4\%$ della baseline, $p < 0.01$ v baseline, $n=5$). 30 minuti dopo, ZIP $5\mu\text{M}$ è stato perfuso nella camera di registrazione per 90 minuti, dopodiché lo stesso protocollo di LFS è stato indotto nell'altra pathway (\circ). Nonostante si noti una lieve, non significativa riduzione dell'ampiezza della risposta sinaptica (in entrambe le pathways) in seguito all'incubazione con ZIP (come osservato in precedenza, vedi punto 4), anche qui il protocollo di LFS si dimostra comunque in grado di indurre una riduzione dell'ampiezza della risposta sinaptica che si mantiene stabile per i successivi 30 minuti di registrazione (LTD) ($70 \pm 4\%$ della baseline, $p > 0.05$ v la pathway di controllo, $p < 0.01$ v baseline, $n=5$). Tali

evidenze permettono di concludere che la preventiva inibizione dell'attività di PKM ζ non influisce sulla possibilità di indurre LTD in corteccia peririnale di ratto adulto, né sull'ampiezza della depressione indotta (non c'è differenza tra l'LTD indotta in assenza di ZIP e quella indotta in sua presenza).

3.1.8 Effetto dell'inibizione sequenziale di PDK-1 e PKM ζ sul mantenimento della LTP

Poiché PDK-1 è stato individuato come il fattore fondamentale in grado di permettere la piena attivazione di PKM ζ , ulteriori studi sono stati condotti per verificarne il ruolo nel mantenimento della LTP, in combinazione con l'inibitore selettivo di PKM ζ , ZIP. Per questo, l'acido 3-idrossi antranilico (3HAA) 100 μ M è stato somministrato 180 minuti dopo l'induzione della LTP in una pathway (**Figura 3.14 e 3.15**, $150 \pm 8\%$ della baseline, $p < 0.01$ v baseline, $n=6$), lasciando l'altra come controllo. Anche in questo caso, in presenza di 3HAA la risposta sinaptica torna gradualmente ai valori di baseline ($104 \pm 3\%$ della baseline, $p < 0.01$ v LTP, $p > 0.05$ v baseline, $n=6$); una volta raggiunti i valori di baseline, la successiva applicazione di ZIP 5 μ M non provoca ulteriore significativa diminuzione dell'ampiezza della risposta sinaptica ($99 \pm 5\%$ della baseline, $p > 0.05$ v 3-HHA, $n=6$). Tali risultati ci permettono di confermare il ruolo di PDK1 nel mantenimento della LTP e forniscono un'ulteriore indizio a supporto che tale effetto possa essere correlato all'attivazione di PKM ζ dipendente da PDK-1. Tuttavia, dal momento che PDK1 è attivo su una gamma molto ampia di target cellulari, questi esperimenti da soli non sono sufficienti a dimostrare che l'annullamento del potenziamento sinaptico avviene solo attraverso l'inibizione della PKM ζ . Altri meccanismi molecolari potrebbero essere coinvolti.

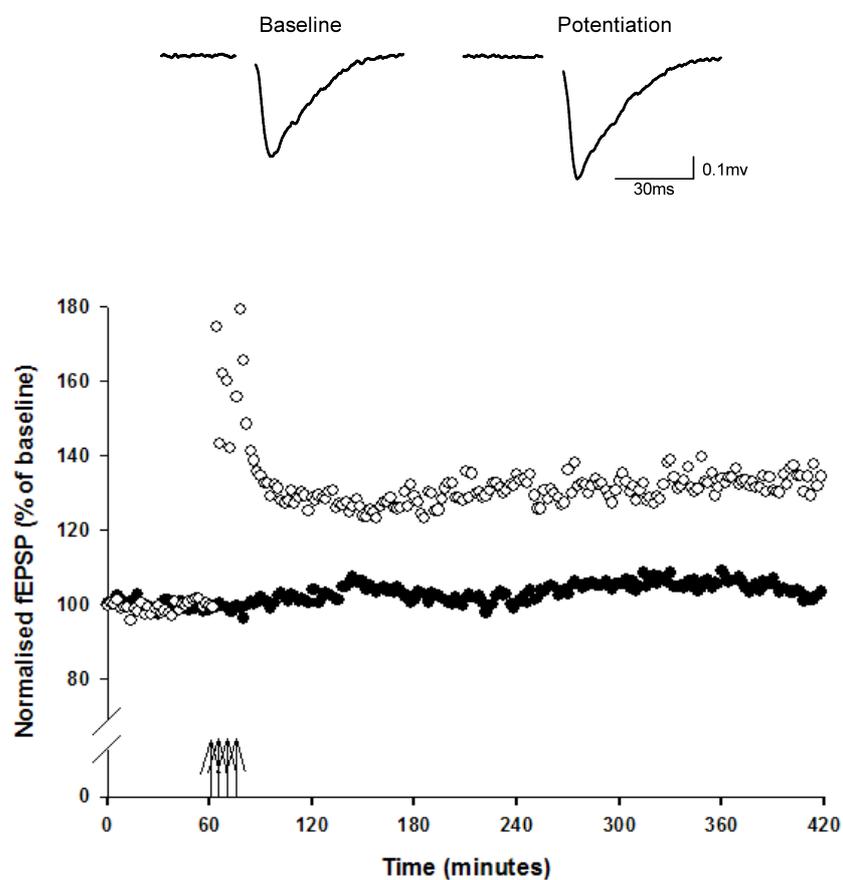


Figura 3.1 Singolo esperimento di induzione di LTP in corteccia peririnale di adulto. La pathway P0 (cerchi neri) e' usata come controllo. Un protocollo di "spaced" tetra-burst stimulation (4x100Hz, 5 minutes interburst interval) produce una consistente e stabile LTP (cerchi bianchi), che si mantiene per almeno 6 ore dalla sua induzione. Le frecce rivolte verso l'alto rappresentano il momento in cui lo stimolo e' stato somministrato. Le tracce mostrate in alto rappresentano un esempio di risposta sinaptica evocata, a livelli di baseline e potenziata.

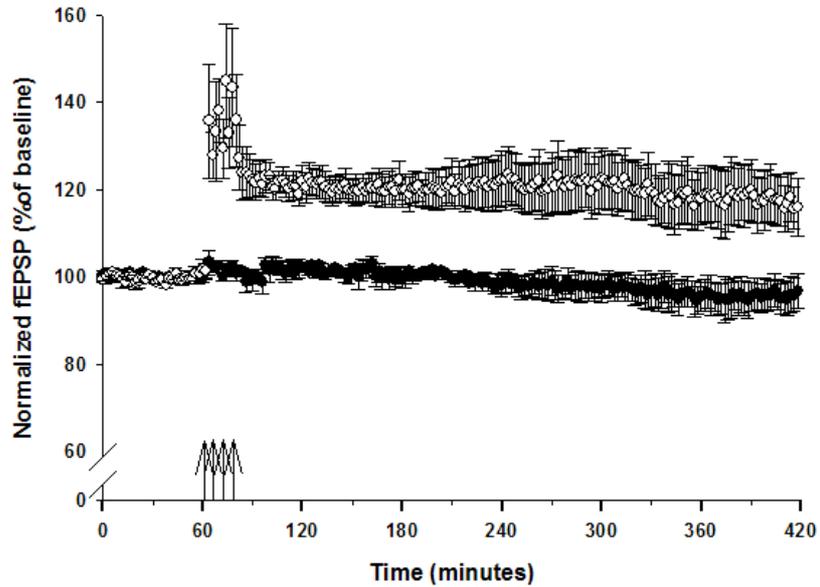


Figura 3.2 Dati totali per l'induzione di LTP nella corteccia peririnale di adulto il protocollo di spaced tetra bust stimulation (4x100Hz) induce una consistente e stabile LTP (cerchi bianchi, $126 \pm 4\%$ della baseline, $p < 0.05$, $n=4$). Il potenziamento dura per oltre 5 ore.

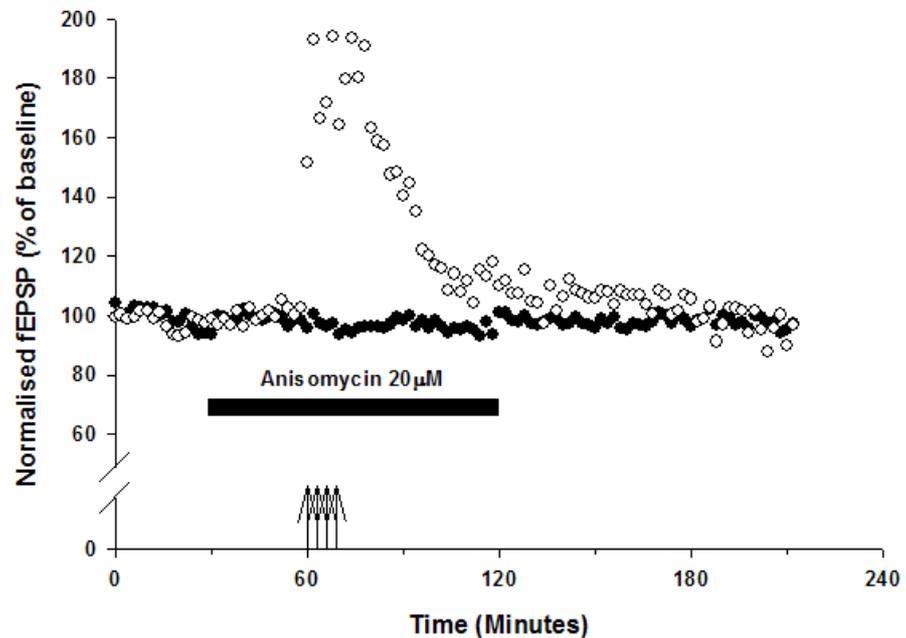


Figura 3.3 Singolo esempio dell'effetto di anisomicina su LTP in corteccia perinatale di adulto. L'incubazione con anisomicina 20 μ M blocca il mantenimento della LTP nella pathway P1 (cerchi bianchi). L'anisomicina non sembra avere effetto sulla pathway di controllo (cerchi neri).

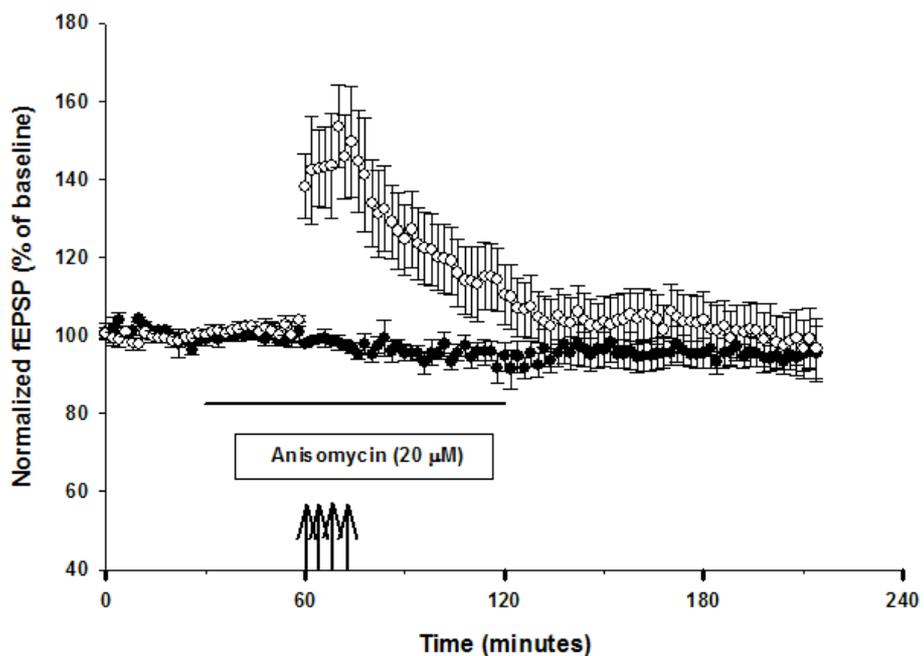


Figura 3.4 Dati totali sull'effetto di anisomicina su LTP nella corteccia perinatale dell'adulto L'incubazione con anisomicina 20 μ M blocca il mantenimento di LTP (cerchi bianchi, $102 \pm 5\%$ della baseline, $p > 0.05$ v baseline, $n=5$).

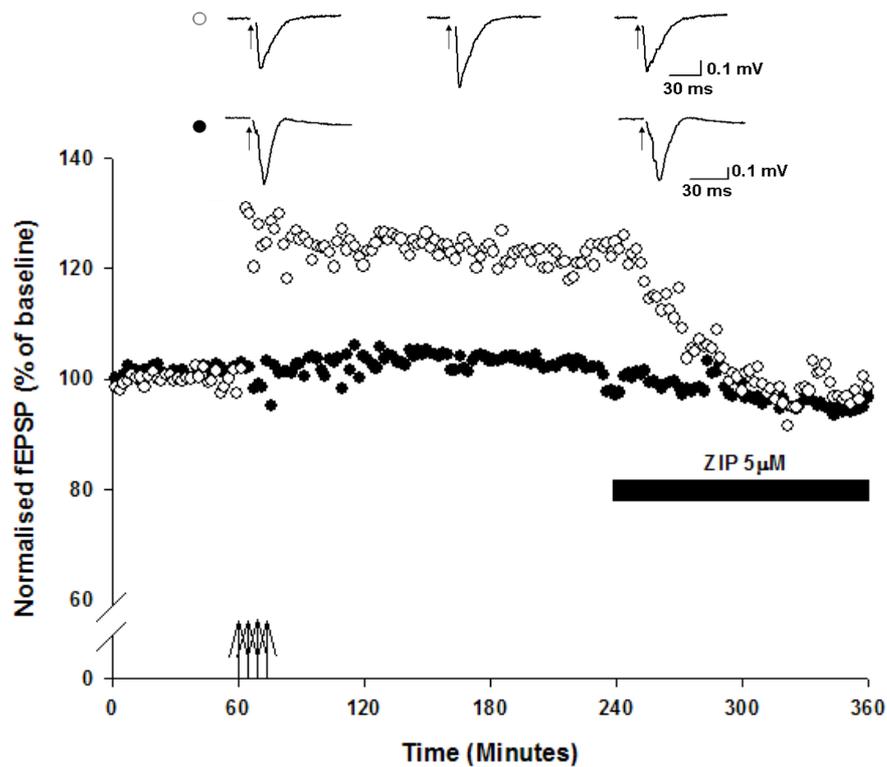


Figura 3.5 Singolo esperimento sull'effetto dell' inibizione di PKM ζ su LTP in corteccia perinatale di adulto L'applicazione dell'inibitore di PKM ζ , ZIP 5 μ M, annulla il mantenimento dell'LTP indotto da tetra-burst stimulation in P1 (cerchi bianchi). Le frecce all'insu' indicano il momento di somministrazione della HFS. ZIP mostra un piccolo effetto anche sulla pathway di controllo (P0, cerchi neri).

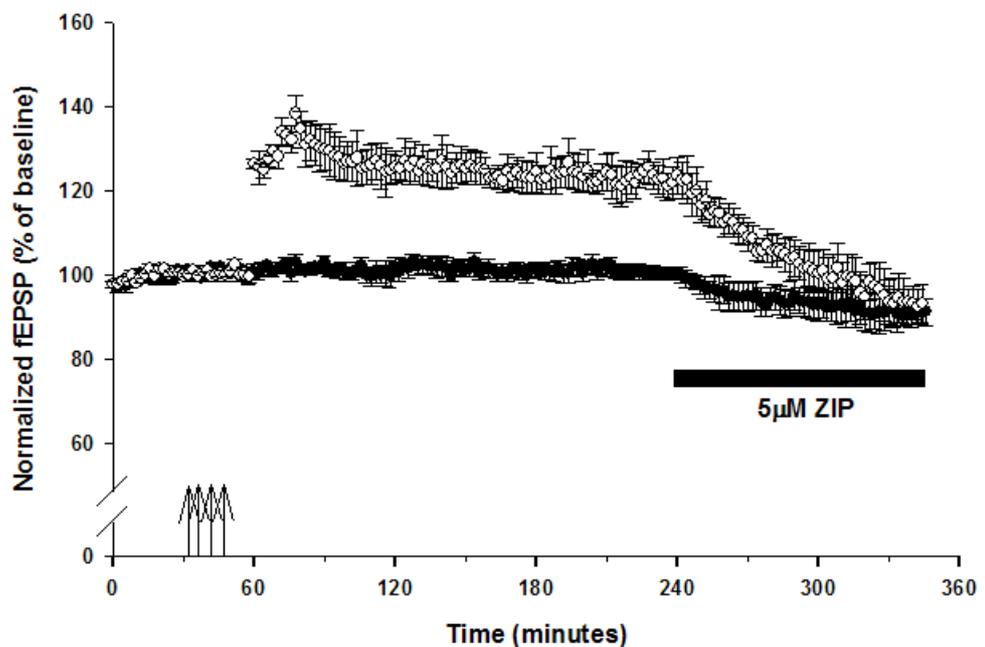


Figura 3.6 Dati totali sull'effetto dell' inibizione di PKM ζ su LTP in corteccia perinatale di adulto ZIP 5 μ M annulla completamente il mantenimento di LTP (cerchi bianchi, 98 ± 5 % della baseline, $p < 0.01$, $n = 7$) senza mostrare un effetto significativo sull'input di controllo (cerchi neri, 93 ± 4 % della baseline, $p > 0.05$).

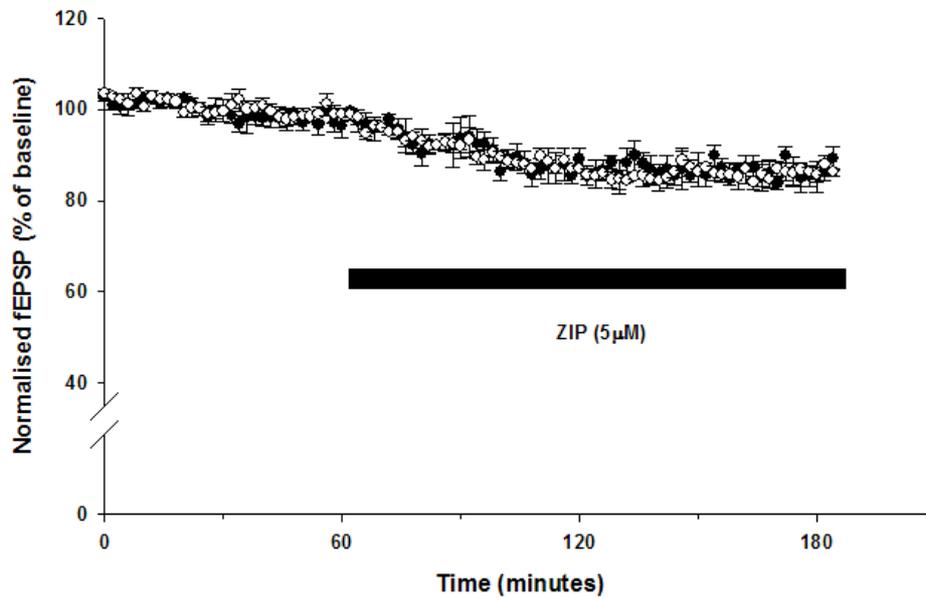


Figura 3.7 Dati totali sull'effetto dell'inibizione di PKM ζ sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di adulto ZIP 5 μ M produce una piccola, non significativa diminuzione della risposta sinaptica di base. Pathway temporale pathway (cerchi neri: $89 \pm 2\%$ della baseline, $p > 0.05$). Pathway entorinale (cerchi bianchi): $88 \pm 2\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n=4$).

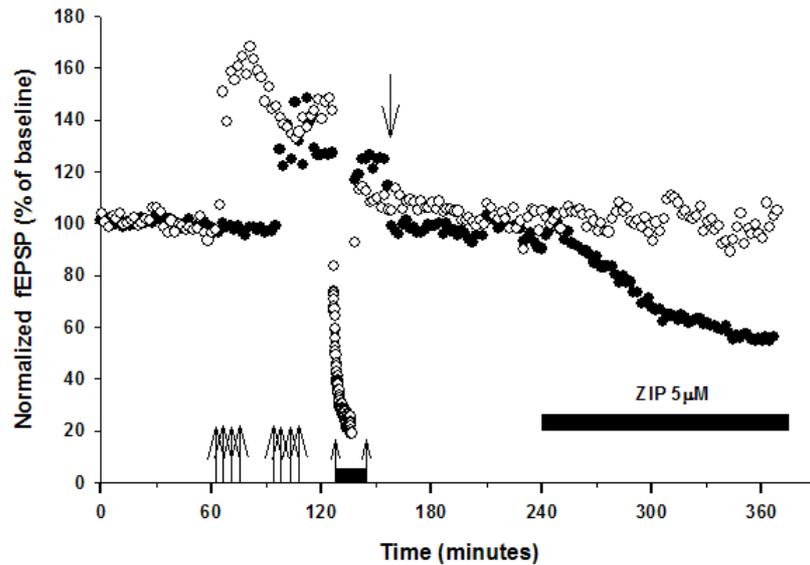


Figura 3.8 Singolo esperimento sull'effetto di ZIP nel depotenziamento in corteccia perinatale di adulto ZIP 5 μ M non ha effetto in una pathway depotenziata (P0, cerchi neri, HFS seguito da LFS) l'inibizione di PKM ζ deprime la risposta sinaptica in una pathway potenziata dove l'ampiezza della risposta sia stata diminuita da una riduzione dell'intensità di stimolazione (P0, cerchi bianchi). Le due frecce all'insù unite dal rettangolo nero rappresentano la LFS. La freccia rivolta all'ingiu' rappresenta la riduzione dell'intensità di stimolazione in P1.

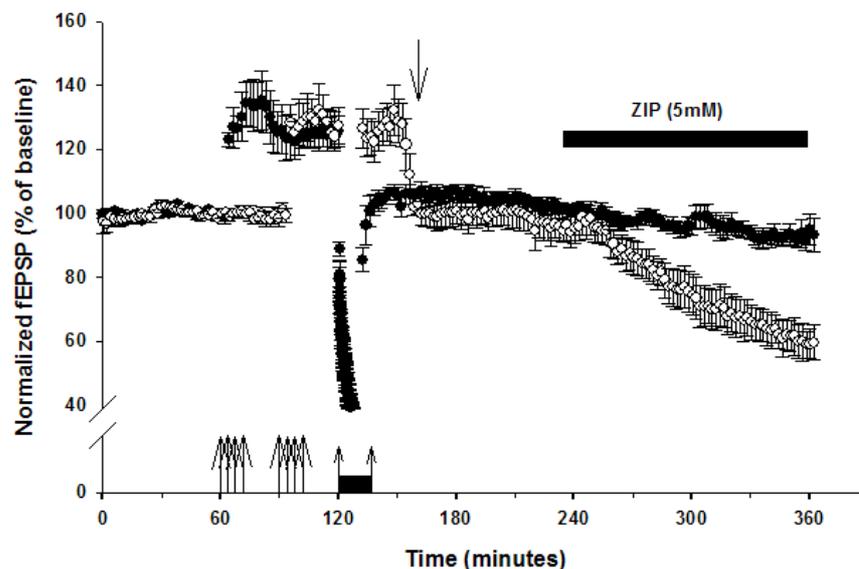


Figura 3.9 Dati totali sull'effetto di ZIP nel depotenziamento in corteccia perinatale di adulto ZIP 5 μ M non ha effetto su una pathway depotenziata (cerchi neri: $98 \pm 4\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n=5$). Dopo l'induzione di LTP nell'altro input (cerchi bianchi), l'ampiezza della risposta sinaptica è diminuita da una riduzione dell'intensità di stimolazione in modo da ottenere gli stessi valori dell'altro input. ZIP deprime significativamente questa pathway, ancora potenziata ($65 \pm 5\%$ della baseline, $p < 0.001$ v la risposta misurata dopo la riduzione dell'intensità di stimolazione).

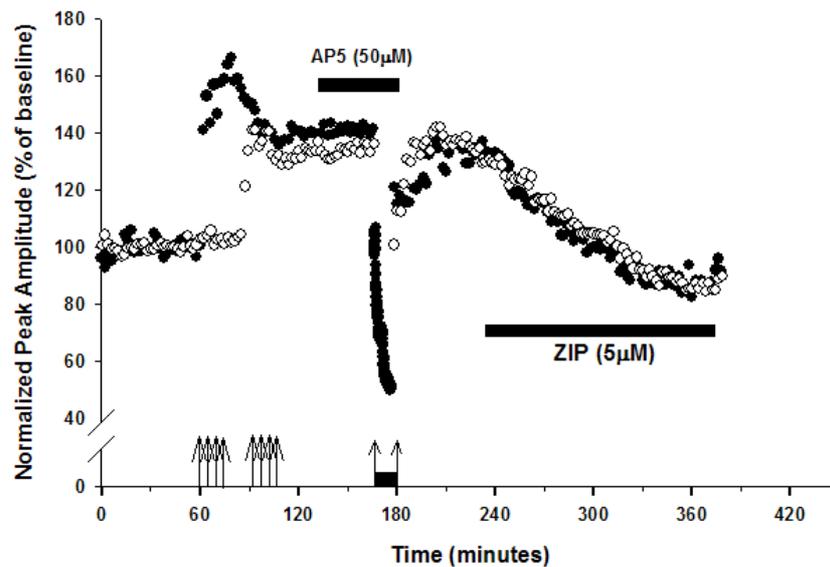


Figura 3.10 Singolo esperimento sull'effetto dell'inibizione di PKM ζ sul depotenziamento in presenza di AP5 in corteccia perinatale di adulto. Quando il depotenziamento è bloccato da AP5 (cerchi neri), ZIP determina una riduzione della risposta sinaptica simile a quella prodotta in una pathway potenziata (cerchi bianchi).

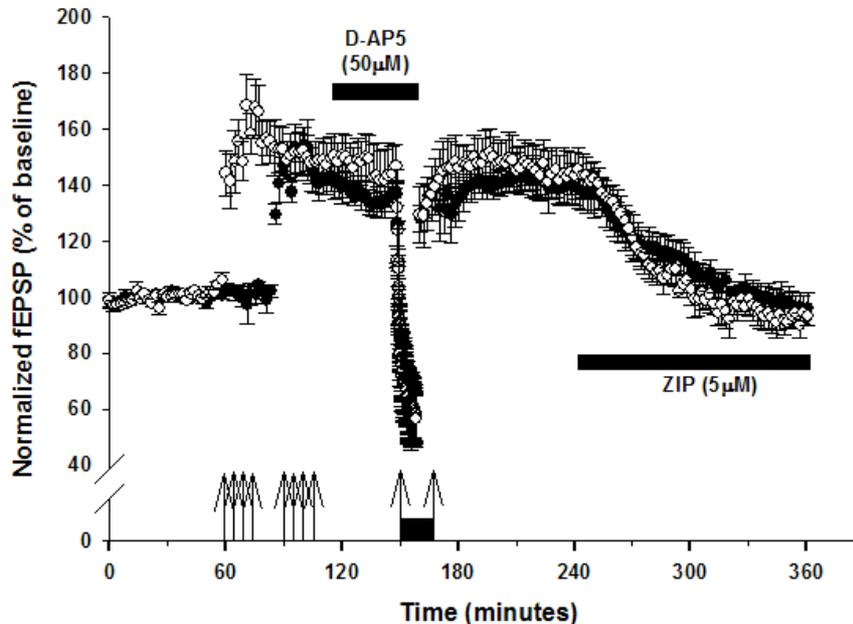


Figura 3.11 Dati totali dell'effetto dell'inibizione di PKM ζ sul depotenziamento in presenza di AP5 in corteccia perinatale di adulto. Quando il depotenziamento è bloccato da AP5 (cerchi neri), ZIP diminuisce la risposta sinaptica, riportandola a valori di baseline ($102 \pm 2\%$ della baseline, $p < 0.001$ v LTP, $p > 0.05$ v baseline, $n=5$). Sull'altro input (cerchi bianchi), l'applicazione di ZIP 3 ore dopo l'induzione di LTP annulla il potenziamento ($100 \pm 4\%$ of baseline, $p < 0.001$ v LTP, $p > 0.05$ v baseline, $p > 0.05$ v "LTD" input dopo l'applicazione di ZIP, $n=5$).

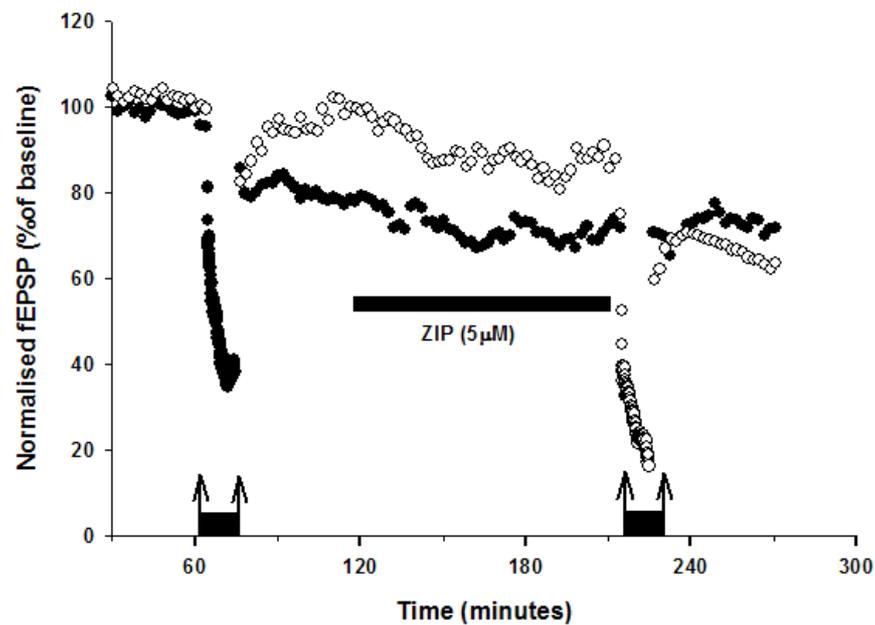


Figura 3.12 Singolo esperimento sull'effetto dell'inibizione di pKM ζ nell'induzione di LTD nella corteccia peririnale di adulto ZIP non ha effetto su una pathway depotenziata (cerchi neri). Una Pre-incubazione con ZIP non influisce sull'induzione di LTD (cerchi bianchi).

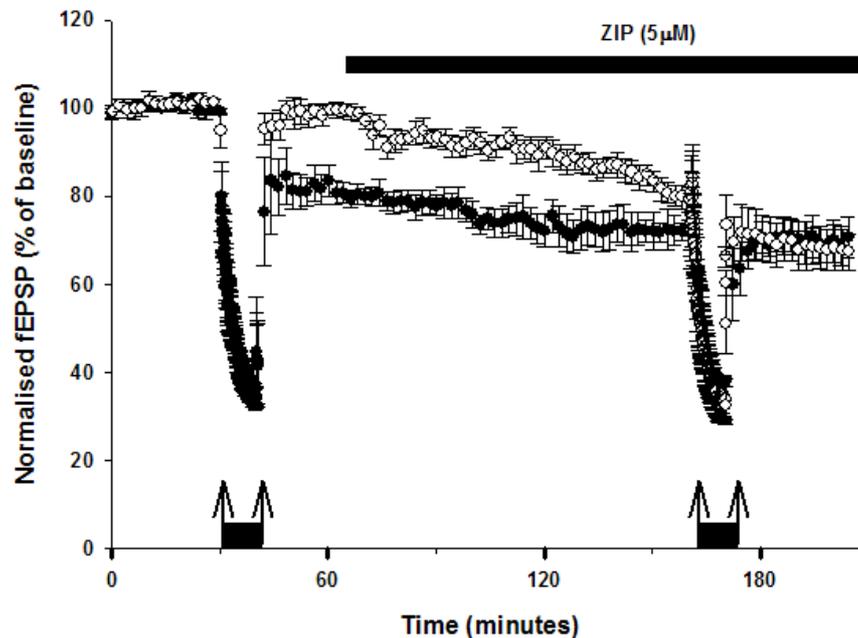


Figura 3.13 Dati totali sull'effetto dell'inibizione di pKM ζ nell'induzione di LTD nella corteccia peririnale di adulto L'inibizione di PKM ζ non ha effetto sull'induzione di LTD in corteccia peririnale (cerchi bianchi $69 \pm 4\%$ della baseline, $p < 0.01$ v baseline, $n=5$). Non c'è differenza d'ampiezza tra la depressione indotta da LFS in seguito a pre-incubazione con ZIP e la LTD ottenuta nella pathway di controllo (cerchi neri, $70 \pm 4\%$ of baseline, $p > 0.05$ v pathway sperimentale, $p < 0.01$ v baseline).

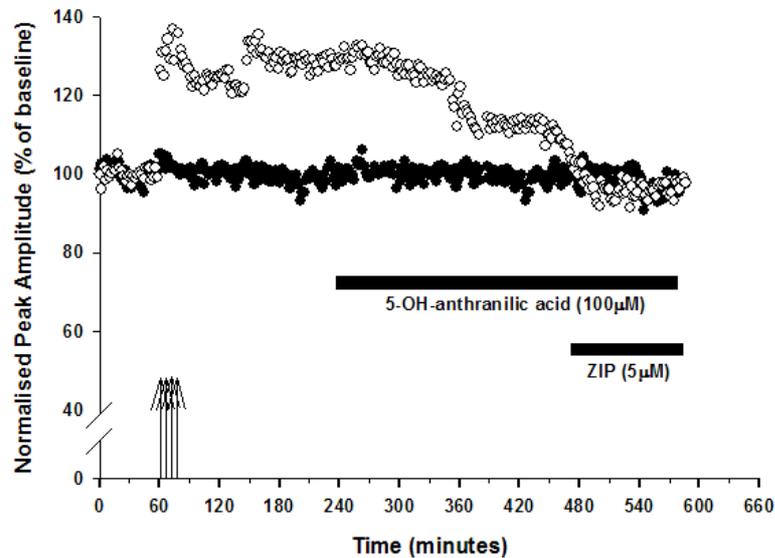


Figura 3.14 Singolo esperimento sull'effetto dell'inibizione di PDK1 su LTP in corteccia peririnale di adulto L'inibizione di PDK1 annulla la LTP lentamente ma competemente (cerchi bianchi). La successiva applicazione di ZIP non mostra alcun effetto sulla trasmissione sinaptica.

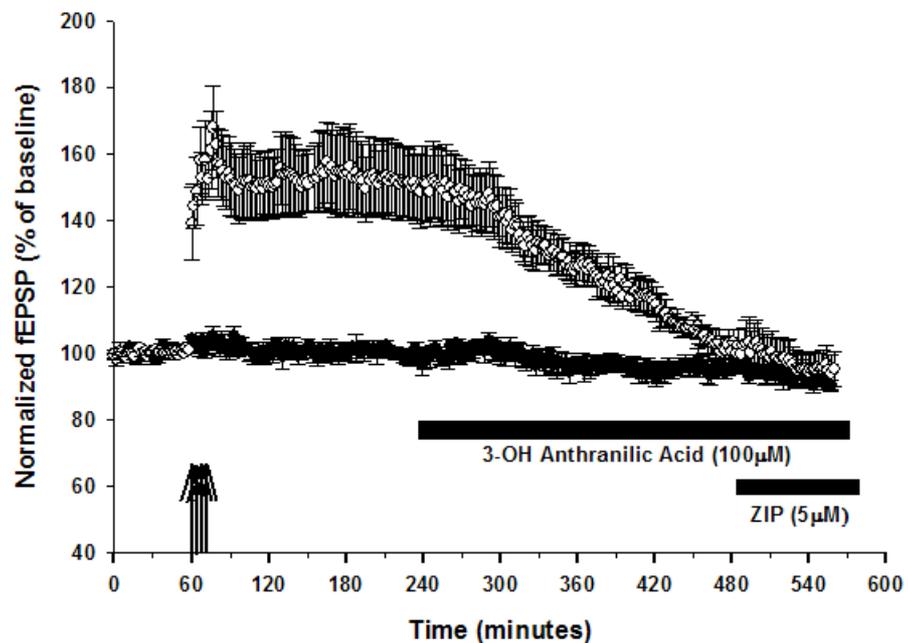


Figura 3.15 Dati totali per l'effetto dell'inibizione di PDK1 sulla LTP in corteccia peririnale di adulto L'inibizione di PDK1 annulla completamente la LTP (cerchi bianchi, $104 \pm 3\%$ della baseline, $p < 0.01$ v LTP, $p > 0.05$ v baseline, $n=6$). La successiva applicazione di ZIP non provoca ulteriori diminuzioni dell'ampiezza della risposta sinaptica ($99 \pm 5\%$ of baseline, $p > 0.05$ v 3-HHA, $n=6$). Nessuno dei due composti modifica sostanzialmente la trasmissione sinaptica nella pathway di controllo (cerchi neri)

3.2 Discussione

Questi risultati dimostrano che una tetra-burst stimulation è in grado di indurre una stabile e duratura LTP corteccia peririnale di ratti adulti. Il protocollo HFS utilizzato qui era una cosiddetta stimolazione "Spaced", che sembra produrre una LTP di più lunga durata e più dipendente dalla sintesi proteica (Scharf, Woo et al. 2002). Tuttavia, altri protocolli (ad esempio 4 stimoli a 100Hz, somministrati a intervalli di 30 secondi) sono in grado di indurre LTP in corteccia peririnale di adulto, senza differenze significative con l'LTP indotta dalla stimolazione "Spaced" (dati non riportati). Questi risultati sono interessanti, poiché la maggior parte degli studi finora si sono concentrati sui processi LTD nella corteccia peririnale, che sono alla base della memoria di riconoscimento. Pertanto, non si sa molto sui meccanismi di LTP nella corteccia peririnale.

Questi risultati mostrano anche che il mantenimento di LTP in corteccia peririnale di adulto sembra dipendere dalla sintesi di nuove proteine. L'applicazione di anisomicina, un potente inibitore della sintesi proteica, annulla completamente il potenziamento stabilito. Questi risultati sono perfettamente in linea con quanto è stato trovato in altre aree cerebrali, ad esempio l'ippocampo, in cui è possibile bloccare il mantenimento, ma non l'induzione di LTP mediante l'applicazione di anisomicina (Frey, Krug et al 1988; Scharf, Woo et al . 2002). In altre parole, ancora una volta, il mantenimento della LTP si basa sulla sintesi di nuove proteine (Kelly, Mullany et al 2000; Abramo e Williams, 2003; Lynch 2004; Miyamoto 2006; Reymann e Frey 2007). Tra le proteine che possono essere coinvolte nel mantenimento di LTP, un ruolo cruciale sembra svolto dalle kinasi, come la proteina kinasi C (PKC), CaM kinasi, MAP kinasi, PKA (Reymann, Frey et al 1988; Barria, Muller et al . 1997; Bozon, Kelly et al 2003; Lisman 2003; Warburton, Glover et al 2005; Miyamoto 2006)

Ci sono prove che PKM ζ svolga un ruolo cruciale nel mantenimento della LTP nell'ippocampo (Sacktor, Osten et al 1993; Serrano, Yao et al 2005.), e che

la formazione di nuove molecole di PKM ζ dipenda dalla sintesi di nuove proteine indotta da LTP (Osten, Valsamis et al. 1996). Questi risultati dimostrano che nella corteccia peririnale adulta, l'applicazione dell'inibitore selettivo di PKM ζ , ZIP, annulla completamente l'LTP, quando somministrato durante la fase di mantenimento (cioè 3 ore dopo l'induzione della LTP). Pertanto, in corteccia peririnale, così come in ippocampo, il mantenimento della LTP si basa sulla continua attività di PKM ζ . In contrasto con i lavori precedenti (Serrano, Yao et al. 2005), si osserva che ZIP produce un piccolo effetto non significativo anche sulla trasmissione sinaptica basale. Questa azione non è del tutto sorprendente, poiché è noto che PKM ζ mantiene LTP attraverso la regolazione del traffico di membrana dei recettori AMPA (Ling, Benardo et al 2006;. Yao, Kelly et al 2008;. Miguez, Hardt et al 2010).. Sebbene l'azione di PKM ζ è specifica per le sinapsi potenziate, non è del tutto improbabile che ci sia qualche piccolo effetto meno specifico anche sull'attività basale di alcune sinapsi non-potenziate. Vale a dire, PKM ζ potrebbe modificare il trafficking costitutivo dei recettori AMPA (McCormack, Stornetta et al. 2006). In alternativa, come suggerito dal prof. MW Brown, potrebbe anche essere che quella che noi consideriamo una risposta basale sinaptica della via neuronale, sia in realtà già potenziato, ad un certo livello. Dal momento che gli animali utilizzati in questo set di esperimenti sono adulti, non è improbabile che posseggano qualche ricordo codificato nella corteccia peririnale, il che significa che alcune sinapsi potrebbero essere già potenziate in una certa quantità, e quindi mostrare un aumento di attività del PKM ζ . Quando viene attivata, PKM ζ avvia un ciclo di feedback positivo di auto mantenimento della propria sintesi durante il mantenimento di LTP (Kelly, Crary et al. 2007), che dura finché dura la memoria. L'applicazione dell'inibitore ZIP, bloccando la PKM ζ attiva, a prescindere da quando la proteina è stata sintetizzata, può andare ad incidere sull'attività di dette sinapsi pre-potenziate.

Studi precedenti mostrano che, mentre la sintesi di PKM ζ dipende da LTP, PKM ζ è down-regolata in seguito a LTD (Hrabetova e Sacktor 1996; Osten,

Hrabetova et al 1996; Hrabetova e Sacktor 2001). Pertanto, l'inibizione di PKM ζ in una pathway depotenziata non dovrebbe mostrare alcun effetto sulla trasmissione sinaptica. Un effetto simile potrebbe essere ottenuto anche quando LTP (che induce PKM ζ) è seguita da LTD (che down-regola PKM ζ), un processo che riporta la risposta sinaptica a livelli di baseline. Questa ipotesi è confermata dai risultati riportati in figura 3.9, dove nessun effetto di ZIP è evidenziabile quando l'inibitore viene somministrato in una pathway depotenziata. Inoltre, questi risultati mostrano che l'effetto di inibizione PKM ζ non dipende dall'ampiezza della risposta sinaptica, misurata ma dal suo reale stato di potenziamento, e da diverse sottostanti modificazioni intracellulari. Infatti, quando l'ampiezza della risposta sinaptica potenziata è attivamente diminuita da una riduzione della intensità di stimolazione, ZIP è ancora in grado di ridurre la risposta sinaptica. Ciò accade perché, anche se le dimensioni della risposta sinaptica nella pathway potenziata sono della stessa ampiezza di quelle della pathway depotenziata, nel primo caso i meccanismi di mantenimento della LTP sono ancora attivi. Pertanto ZIP, inibendo la PKM ζ attiva, è in grado di produrre una diminuzione evidente della trasmissione sinaptica.

Ci sono numerosi lavori che dimostrano che PKM ζ è down-regolata nella LTD. LTD dipende dall'attività recettori NMDA (Dudek e Bear 1992; Mulkey e Malenka 1992; Wexler e Stanton 1993; Stanton 1996), quindi, se questi recettori sono bloccati dall'antagonista D-AP5, un protocollo di LFS non è in grado di produrre LTD (Massey, Johnson et al. 2004). Pertanto, il blocco di NMDA, non consentendo l'espressione di LTD, dovrebbe impedire la down-regulation di PKM ζ indotta dalla LFS. Per esaminare questa ipotesi, dopo l'induzione della LTP, le fette di corteccia peririnale di adulto sono state incubate con il D-AP5. La somministrazione di LFS su un percorso non è riuscita a indurre un depotenziamento; la successiva applicazione di ZIP riporta la risposta ai livelli di base. Questi risultati, quindi, suggeriscono che la somministrazione di LFS da sola non è sufficiente ad indurre l'attesa down-regulation dell'attività PKM ζ . I fenomeni di signalling intracellulare alla base del depotenziamento effettivo della risposta sinaptica (cioè l'attivazione della

proteina fosfatasi) sono obbligatori al fine di bloccare la sintesi / attivazione di PKM ζ . Una possibile spiegazione potrebbe essere che alcune protein fosfatasi possano bloccare l'attività di alcune proteine responsabili della sintesi / attivazione di PKM ζ , come ad esempio PDK1, (Kelly, Crary et al. 2007). Pertanto, se LFS, a causa del blocco AP5-dipendente dei recettori NMDA, non riesce ad attivare queste fosfatasi, le vie di segnalazione intracellulare che portano all'attivazione di PKM ζ sono ancora completamente funzionanti. Questo potrebbe spiegare i risultati osservati.

Inoltre, come mostrato nella Figura 3.9, poiché LTD down-regola l'attività di PKM ζ , l'applicazione della ZIP dopo LFS non ha alcun effetto sulla risposta sinaptica. Nonostante ciò non era chiaro se PKM ζ potesse avere qualche effetto l'induzione di LTD. Per esaminare questo punto, le fette sono state pre-incubate con ZIP per 90 minuti, poi LFS è stato somministrato. Come previsto, l'inibizione della PKM ζ non ha alcun effetto nella induzione di LTD. In effetti, secondo le conoscenze attuali, PKM ζ non sembra essere coinvolta in meccanismi LTD-simili. Inoltre, PKM ζ non è coinvolta nella induzione di LTP (Serrano, Yao et al. 2005), ma solo nel suo mantenimento. Pertanto, tutte le evidenze suggeriscono ancora una volta che l'up- o down-regulation dell'attività di PKM ζ sono secondarie all'induzione di LTP o LTD, e sono coinvolte solo nel mantenimento delle fasi tardive di tali processi.

Infine, l'ultima serie di esperimenti ha iniziato ad esaminare la regolazione dell'attività di PKM ζ . Anche se sembra essere universalmente accettato che PKM ζ , una volta attivato, auto-mantiene la propria attività attraverso un ciclo di feedback positivo, non si sa molto sui processi che portano all'attivazione di PKM ζ . La principale proteina coinvolta nella attivazione di PKM ζ è stata identificata in PDK1. PKC "convenzionali" e "nuove", infatti, sono innescate dalla fosforilazione ad opera di PDK1, e successivamente vengono pienamente attivate dalle cascate di signalling dei secondi messaggeri intracellulari. PKCS appartenenti al gruppo atipico, come PKC ζ , invece, sono immediatamente attivate dalla fosforilazione da parte di PDK1, in un modo

"on / off" (LeGood, Ziegler et al 1998;. Dong, Zhang et al 1999;. Balendran, Biondi et al 2000;. Balendran, Hare et al 2000). Pertanto, l'inibizione dell'attività PDK1 dovrebbe indirettamente bloccare l'attività di PKM ζ . L'applicazione di 3HAA annulla lentamente il mantenimento della LTP, e quando la risposta è di nuovo i valori di baseline, l'applicazione di ZIP non produce alcuna ulteriore calo nella risposta. Questi risultati, quindi, confermano la nostra ipotesi, ossia che l'inibizione di PDK1, impedendo la fosforilazione e quindi l'attivazione di PKM ζ , cancella la LTP. La mancanza di effetto di ZIP conferma questa ipotesi. 3HAA porta la risposta al basale più lentamente di ZIP. Questo può accadere perché l'effetto sul PKM ζ è indiretto, e richiede prima l'inibizione completa di PDK1 che, di conseguenza, non può fosforilare PKM ζ . Quindi, ci vuole più tempo per poter completamente bloccare l'intero processo. In ogni caso, anche se i risultati degli esperimenti sono coerenti con l'ipotesi, PDK1 è una proteina che agisce su molti processi intracellulari, come la crescita e proliferazione cellulare attraverso una cascata di signalling che coinvolge PI3K/Akt/mTOR (Bayascas 2008; Kawauchi, Ogasawara et al . 2009). Pertanto, non si può escludere che l'effetto osservato non si verifichi solo attraverso una inibizione diretta dell'attività PKM ζ , ma anche attraverso altri meccanismi (ad esempio attraverso l'inibizione di una sintesi proteica più ampia e meno specifica mTOR-dipendente).

4 RUOLO DI PKM ζ NELLA PLASTICITÀ SINAPTICA NELLA CORTECCIA PERIRINALE DURANTE IL NEUROSVILUPPO

4.1 Introduzione

La precedente serie di esperimenti ha dimostrato che possibile indurre LTP in corteccia peririnale di adulti, e che questa LTP può essere completamente annullata dall'inibizione di PKM ζ . È interessante notare che alcuni lavori realizzati in questo stesso laboratorio mostrano che negli animali giovani, cioè al quattordicesimo giorno post-natale (PND14 o P14), diversi protocolli di HFS (100 Hz, 1s) che di solito producono LTP in differenti aree del cervello (ippocampo) in età diverse, non riescono a indurre LTP in corteccia peririnale (osservazione King e Bashir, inedito). Anche protocolli che sono noti per indurre LTP in corteccia peririnale di adulti, come 4xHFS (Ziakopoulos, Tillett et al 1999; Massey, Johnson et al 2004.) o la "Spaced" tetra-burst stimulation (Scharf, Woo et al 2002). non hanno prodotto LTP in corteccia peririnale neonatale. Neppure due diversi protocolli di stimolazione theta burst sono stati efficaci nell'indurre la LTP (osservata da King e Bashir, inedito). Questo fenomeno può trovare due spiegazioni possibili. Una possibilità è che i meccanismi di LTP semplicemente non esistono in questa fase del neurosviluppo, quindi tutti i tentativi di indurre qualsiasi tipo di potenziamento a questa età risultano inefficaci. Una spiegazione alternativa è, al contrario, che i meccanismi alla base della espressione della LTP esistono, ma sono già completamente saturi, di conseguenza, l'induzione di LTP è occlusa. Per esaminare queste possibilità, LFS (1 Hz, 900 s) è stato somministrato per indurre LTD; la successiva somministrazione di HFS (100 Hz, 1s) ha determinato un potenziamento della trasmissione sinaptica, che ha riportato la risposta sinaptica ai livelli basali (osservato da King e Bashir, non pubblicato). Pertanto, queste osservazioni suggeriscono che meccanismi che portano ad un potenziamento a lungo termine esistono in corteccia peririnale neonatale, ma in condizioni basali questi meccanismi sono molto probabilmente saturi e un potenziamento di lunga durata della sinapsi è possibile solo se la saturazione è preventivamente revertita.

Dal momento che l'attività di PKM ζ è fondamentale per il mantenimento della LTP (Hrabetova e Sacktor 1996; Ling, Benardo et al 2002), se i meccanismi di LTP sono saturi in condizioni basali allora questo fenomeno potrebbe derivare da un'attivazione costitutiva della PKM ζ . Se questo è il caso, allora l'inibizione di PKM ζ dovrebbe deprimere la trasmissione sinaptica basale. Inoltre, se LTD annulla il mantenimento di LTP determinando una diminuzione dell'attività di PKM ζ , l'inibizione della PKM ζ non dovrebbe avere alcun effetto sulla trasmissione sinaptica successiva a LTD. Inoltre, quando una depressione LFS-indotta della trasmissione sinaptica è revertita dalla somministrazione di HFS (de-depressione), se questo meccanismo dipende dalla riattivazione di PKM ζ HFS-indotta, l'applicazione di ZIP dovrebbe diminuire di nuovo la trasmissione sinaptica. Inoltre, eravamo interessati a determinare, se possibile, un time-course per questi fenomeni durante le varie fasi di sviluppo neurologico. In altre parole, quando il cervello acquisisce la possibilità di esprimere LTP? Abbiamo testato queste ipotesi con la seguente serie di esperimenti.

4.2 Risultati

4.2.1 Attività di PKM ζ in pathway depotenziate in corteccia peririnale di P14.

La nostra ipotesi era che, in corteccia peririnale neonatale (P14), la trasmissione sinaptica basale è già impostata su livelli molto elevati, occludendo l'induzione sperimentale di qualsiasi ulteriore potenziamento. Se PKM ζ è coinvolta nel mantenimento di questi alti livelli di trasmissione di base, la sua inibizione dovrebbe portare ad una diminuzione della risposta evocata sinaptica, mentre nessun effetto deve essere osservato in una pathway completamente depotenziata.

Dopo una registrazione di baseline della durata di 30 minuti, tre LFS (1Hz) sono state somministrate nella stessa pathway a distanza di circa 15 minuti l'una dall'altra, in modo da ottenere una LTD saturata (nessuna differenza statisticamente significativa tra i valori registrati dopo il secondo train di LFS e il terzo) di notevole ampiezza (54 ± 4 % della baseline 30 min dopo l'ultima LFS, $p < 0.001$, $n = 7$; **Figura 4.1**). L'altra pathway è stata lasciata come controllo. La perfusione di ZIP 5 μ M è stata iniziata 40 minuti dopo l'ultimo train di LFS e l'esperimento è stato condotto a termine in presenza del composto.

I risultati dimostrano che ZIP non ha alcun effetto sulla pathway depotenziata (94 ± 9 % della risposta sinaptica alla fine dell'ultimo train di LFS; $p > 0.05$, $n = 7$) ma riduce significativamente l'ampiezza della risposta sinaptica nella pathway non depotenziata (53 ± 4 % della baseline baseline 90 min dopo l'applicazione di ZIP, $p < 0.001$).

Un'ulteriore interessante constatazione è che la diminuzione della risposta sinaptica nella pathway non depotenziata successiva all'applicazione di ZIP porta tali valori a coincidere con quelli ottenuti nella pathway completamente depotenziata.

La mancanza di effetto di ZIP sulla pathway depotenziata suggerisce che LTD è legata ad una forte inibizione della PKM ζ , attività-dipendente. Dal momento che questi risultati sono molto diversi da ciò che si osserva nell'adulto, abbiamo quindi deciso di misurare l'espressione di PKM ζ nella corteccia peririnale di neonati e adulti per determinare se esistono differenze nell'espressione di PKM ζ che potrebbero spiegare gli effetti diversi di ZIP sulla trasmissione sinaptica basale nei P14 e nell'adulto. I risultati ottenuti dimostrano che i livelli di PKM ζ sono significativamente più alti ($p < 0,01$) nella corteccia peririnale di P14 rispetto agli animali adulti (adulti: $100 \pm 7\%$, $n = 8$; P14: $154 \pm 9\%$, $n = 9$; **Inserto in Figura 4.1**). Questi risultati forniscono un maggiore sostegno alla nostra ipotesi che lo stato "potenziato" della trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale P14 potrebbe dipendere dall'aumentata espressione e / o attività di PKM ζ .

Questi risultati permettono pertanto di confermare il coinvolgimento di PKM ζ nel mantenimento degli elevati livelli di attività sinaptica riscontrabili nella corteccia peririnale di P14.

4.2.2 Attività di PKM ζ nel de-depotenziamento in corteccia peririnale di P14.

Come dimostrato in precedenza (osservazioni di R. King, dati non pubblicati) nella corteccia peririnale di P14 non è possibile indurre LTP ma è possibile ottenere il de-depotenziamento di una pathway in precedenza depotenziata, somministrando un normale protocollo per l'induzione di LTP. Pertanto abbiamo voluto studiare l'effetto dell'inibizione di PKM ζ in una pathway de-depotenziata in corteccia peririnale di P14.

Se i livelli elevati della trasmissione sinaptica basale sono mantenuti dall'attività dei PKM ζ , che è up- o down-regolata in seguito a HFS e LFS, rispettivamente (Hrabetova e Sacktor 1996), la sua inibizione per opera di ZIP dovrebbe essere in grado di diminuire l'ampiezza della risposta sinaptica.

Dopo una baseline di 60 minuti, una LFS e' stata somministrata in una pathway in modo da indurre un depotenziamento (**Figura 4.2** 74 ± 2 % of baseline, $p < 0.001$, $n = 4$) ed e' stata seguita, 30 minuti dopo, da HFS in modo da ottenere un de-depotenziamento (99 ± 8 % dell'originaria, pre-LTD baseline, 60 min post HFS; $p < 0.001$ v LTD, $p > 0.05$ v baseline, $n=4$); l'altra pathway e' stata lasciata come controllo.

180 minuti dopo il de-depotenziamento, la fetina e' stata perfusa con ZIP μM e l'esperimento e' stato condotto a termine in presenza del composto; in seguito all'inibizione di PKM ζ si evidenzia una simile diminuzione dell'ampiezza della risposta sinaptica in entrambe le pathways (controllo: 48 ± 3 % of baseline, $p < 0.01$; Pathway de-depotenziata: 50 ± 5 %; $n=4$; $p < 0.01$)

Pertanto, l'attività di PKM ζ si dimostra la stessa tanto in una pathway de-depotenziata quanto in una pathway di controllo, che noi ipotizziamo essere "naturalmente potenziata"; l'inibizione dell'attività della kinasi, infatti, provoca una riduzione dell'ampiezza della risposta sinaptica in ambo le pathways, e tale riduzione appare essere di simile entità in entrambe.

4.2.3 Ruolo di PKM ζ nella trasmissione sinaptica in corteccia peririnale di P35.

Considerando questi risultati, è stato interessante esaminare a che punto durante lo sviluppo, la corteccia peririnale acquisisce la capacità di produrre una "classica" LTP, o meglio, quando acquisisce l'abilità di passare da un "potenziamento saturo" già presenti alla baseline, ad una situazione in cui le sinapsi sono pronte per essere potenziate ancora una volta.

A questo punto il passo successivo è stato analizzare i meccanismi di plasticità sinaptica nella corteccia peririnale di ratti di età intermedia tra gli adulti ed i P14. Per esaminare la questione, abbiamo deciso di eseguire una serie di esperimenti su animali giovani, a 35 giorni post-natale (PND35 o P35). A questa età, infatti, i ratti sono già attivi e mostrano un vivace comportamento esplorativo.

In primo luogo, sono stati condotti degli esperimenti per essere sicuri che fosse possibile ottenere una robusta e stabile LTP in questi animali. Una volta dimostrato ciò, abbiamo testato l'attività di PKM ζ esattamente come era stato fatto per l'adulto.

Come mostrato in **figura 4.3**, dopo un periodo di registrazione di baseline di circa 60 minuti, una robusta LTP è stata indotta su una pathway utilizzando 4 stimoli a 100Hz (1 s) distanziati tra loro di 5 minuti ($148 \pm 5\%$ della baseline, $p < 0.001$, $n = 6$). La LTP è stata mantenuta per 180 minuti, dopodiché è stato somministrato ZIP (5 μ M). Anche in questo caso, come nell'adulto, ciò che si osserva è una rapida diminuzione della risposta sinaptica, con perdita completa del potenziamento e ritorno ai valori di baseline in circa 120 minuti ($100 \pm 2\%$; $n=6$; $p < 0.001$). ZIP non ha effetto sulla trasmissione sinaptica basale nella pathway di controllo transmission ($97 \pm 2\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n = 6$).

Queste osservazioni permettono di affermare che, almeno per quanto riguarda il potenziamento, già a 35 giorni il comportamento delle sinapsi in corteccia peririnale è simile a quello di sinapsi adulte. Ciò potrebbe essere messo in relazione con modificazioni sinaptiche post natali probabilmente dovute ai meccanismi di plasticità neuronale conseguenti allo sviluppo e all' "esperienza" (ad esempio, apertura degli occhi).

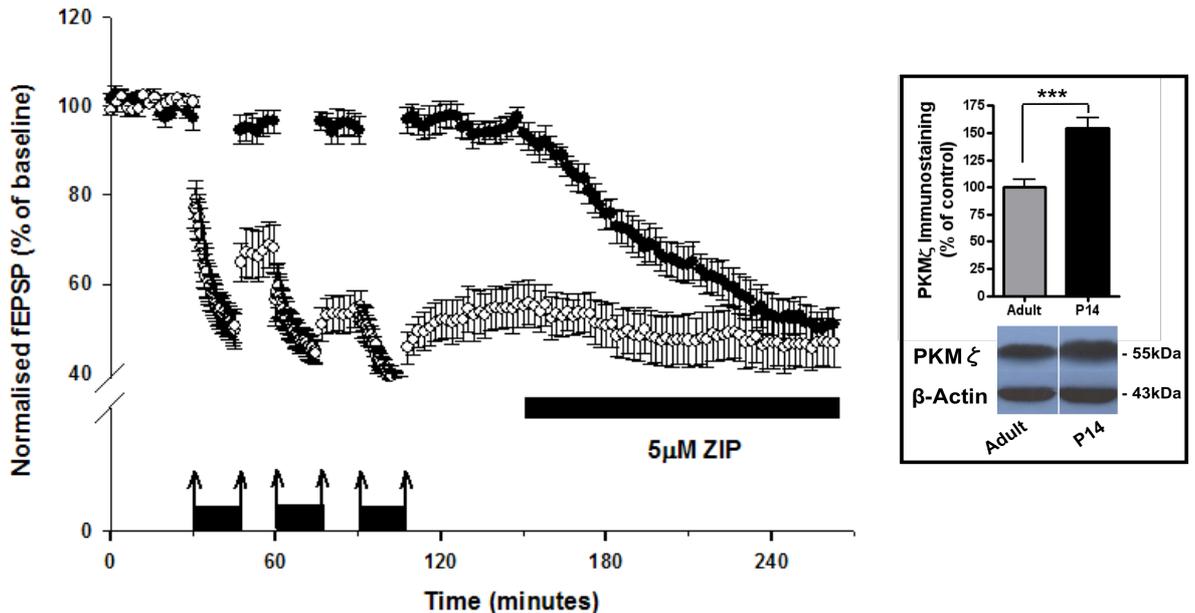


Figura 4.1 Effetto dell'inibizione di PKM ζ nella corteccia peririnale di P14

L'inibizione di PKM ζ produce un'a significativa diminuzione nella risposta sinaptica (cerchi neri, $53 \pm 4\%$ della baseline, $p < 0.001$ v baseline; $n=7$). Una volta ottenuta un depotenziamento saturo (cerchi bianchi $54 \pm 4\%$ della baseline, $p < 0.001$) la successiva applicazione di ZIP non mostra alcun effetto ($94 \pm 9\%$ compared to pre-ZIP level; $p > 0.05$). L'inserito mostra le differenze nell'espressione di PKM ζ nella corteccia peririnale di ratti P14 e adulti. L'istogramma (in alto) mostra che i livelli di PKM ζ sono significativamente (***) piú alti in corteccia peririnale di P14 che negli adulti (adults: $100 \pm 7\%$, $n=8$; P14: $154 \pm 9\%$, $n=9$). In basso, un esempio delle bande del western blot.

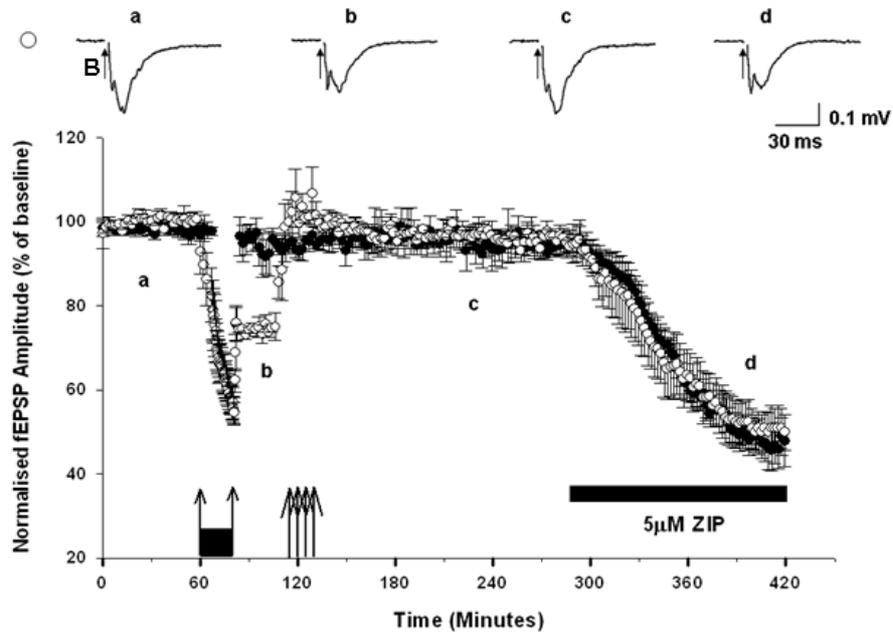


Figura 4.2 Effetto dell'inibizione di PKM ζ nel de-depotenziamento nella corteccia perinatale di P14 LFS induce una robusta LTD (cerchi bianchi $74 \pm 2\%$ della baseline, $p < 0.001$, $n=4$). Trenta minuti dopo l'induzione di LTD, la somministrazione di HFS induce uno stabile potenziamento ($99 \pm 8\%$ della baseline pre-LTD, 60 min post HFS; $p < 0.001$ v LTD, $p > 0.05$ v baseline). ZIP deprime la trasmissione sia nell' pathway potenziata ($50 \pm 5\%$ of baseline; $p < 0.01$) sia in quella di controllo (cerchi neri, $48 \pm 3\%$ della baseline, $p < 0.01$).

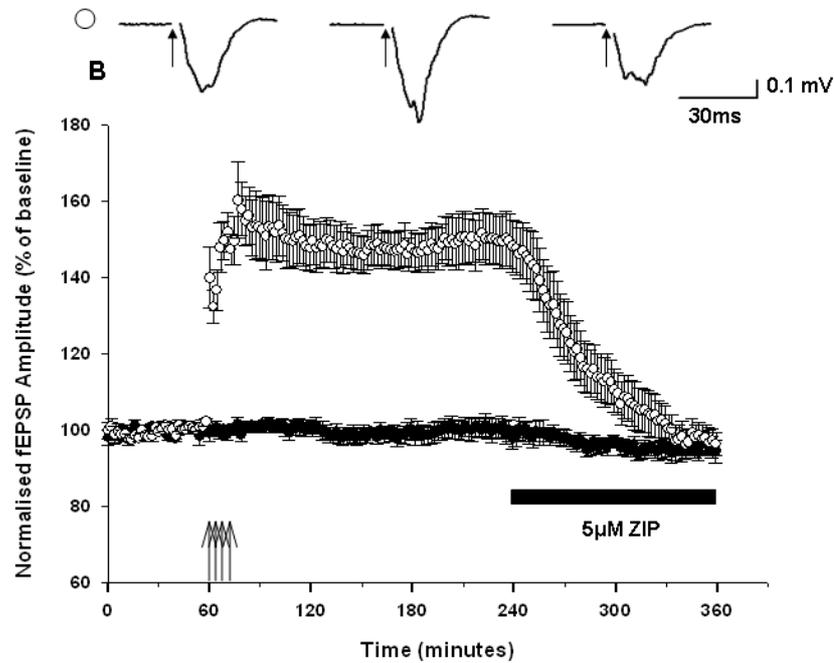


Figura 4.3 Effetto dell'inibizione di PKM ζ sulla LTP nella corteccia peririnale di P35 LTP e' facilmente indotta nella corteccia peririnale di P14 (cerchi bianchi $148 \pm 5\%$ della baseline, $p < 0.001$, $n = 6$) e l'inibizione di PKM ζ ad opera di ZIP $5\mu\text{M}$ annulla completamente l'LTP ($100 \pm 2\%$ of baseline, $p < 0.001$). ZIP non sembra avere effetto sulla baseline nella pathway di controllo (cerchi neri, $97 \pm 2\%$ della baseline, $p > 0.05$). In alto, tracce rappresentative delle risposte evocate.

4.3 Discussione

In contrasto con le osservazioni formulate nella corteccia peririnale adulta, negli animali giovani (P14), nessuno dei protocolli HFS noti per essere normalmente in grado di indurre LTP è efficace. Questi risultati sono abbastanza sorprendenti, visto che negli animali più giovani un più alto livello di plasticità è previsto, e che in altre aree cerebrali, cioè corteccia visiva e l'ippocampo, è relativamente facile indurre una robusta e stabile LTP utilizzando i comuni protocolli di HFS (Malenka and Bear 2004).

Una possibile spiegazione per spiegare il fatto che non è possibile ottenere LTP nella corteccia peririnale di P14 è che i meccanismi intracellulari che conducono al potenziamento della risposta sinaptica semplicemente non esistono, in questa fase di sviluppo neurologico. Un'ipotesi alternativa è che questi meccanismi sono presenti, ma sono già completamente saturi, quindi un potenziamento è possibile solo a seguito di una depressione della trasmissione sinaptica, un processo noto come de-depressione o de-potenziamento. Pertanto, questi risultati suggeriscono che la mancanza di LTP in neonatale corteccia peririnale può essere spiegata dalla presenza di meccanismi costitutivi LTP-simili responsabili di mantenere trasmissione basale in uno stato già potenziato nelle fasi precoci dello sviluppo. Le ragioni per cui la trasmissione sinaptica è mantenuta in uno stato potenziato non è noto ma questi meccanismi possono promuovere o stabilizzare le connessioni sinaptiche nella corteccia cerebrale immatura (Hua e Smith 2004; Cline e Haas 2008; Hanse, Taira et al 2009). Se meccanismi simili operano in altre regioni del cervello e in quali momenti durante lo sviluppo non è noto.

Poiché PKM ζ è sufficiente a mantenere LTP, e la trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di P14 sembra essere in uno stato già potenziato, PKM ζ è apparso come un obiettivo interessante da esaminare. I risultati mostrano, infatti, che l'inibizione della sua attività produce una forte

depressione nella trasmissione sinaptica. È interessante notare che le dimensioni di questa depressione corrispondono a quelle ottenute dopo l'induzione di una LTD completamente a. Come previsto, l'applicazione di ZIP non mostra alcun effetto sulla pathway depotenziata, probabilmente perché PKM ζ è stata down-regolata dai ripetuti train di LFS, come descritto in precedenza (Hrabetova e Sacktor 1996; Hrabetova e Sacktor 2001). Pertanto, questi risultati suggeriscono che PKM ζ è il principale responsabile per il mantenimento della trasmissione sinaptica basale in uno stato potenziato.

L'ipotesi che gli elevati livelli basali di trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale P14 sono mantenuti da meccanismi LTP-like, che dipendono dalle attività di PKM ζ , è rafforzata anche dalla constatazione che ZIP è in grado di diminuire la risposta sinaptica in una pathway de-depresso. In altre parole, se si considera la trasmissione sinaptica basale come "LTP", e la trasmissione sinaptica depressa come la trasmissione basale, la somministrazione di HFS produce una "nuova LTP", mantenuta tale da PKM ζ .

Questo fenomeno, a nostra conoscenza, si verifica solo nella corteccia peririnale in questa fase (P14 di sviluppo neurologico). In ippocampo di P14, infatti, è possibile indurre LTP abbastanza facilmente, e il potenziamento viene ripristinato mediante l'applicazione di ZIP (Serrano, Yao et al. 2005). Esperimenti in ippocampo P14 sono stati ripetuti come un controllo interno; HFS è in grado di indurre una robusta LTP, che si annulla con l'applicazione di ZIP (mostrato in **figura 4.3.1 e 4.3.2**). Inoltre, l'occlusione della LTP in corteccia peririnale avviene durante un periodo di tempo limitato, dal momento che è possibile indurre una robusta LTP in fettine di peririnale di animali a 35 giorni post-natale (P35). Pertanto, questa occlusione della induzione di LTP sembra essere specifica per una particolare regione del cervello (corteccia peririnale) in un momento particolare nel neurosviluppo (circa PND14).

I meccanismi che riducono il ruolo della LTP e PKM ζ durante lo sviluppo della corteccia peririnale non sono noti, ma potrebbero derivare da processi LTD-simili che sono alla base della memoria di riconoscimento visivo (Brown e Bashir 2002; Griffiths, Scott et al 2008).

L'inserimento dei recettori AMPA può essere importante per la stabilizzazione delle connessioni sinaptiche nel sistema nervoso centrale immaturo (Hua e Smith 2004; Cline e Haas 2008; Hanse, Taira et al 2009), ed è stato dimostrato che i meccanismi attraverso i quali PKM ζ sostiene l'LTP includono l'inserimento dei recettori AMPA nella membrana sinaptica (Yao, Kelly et al. 2008). Inoltre, PKM ζ ha recentemente dimostrato di essere importante per la stabilizzazione delle sinapsi della via retino-tettale nello *Xenopus* in via di sviluppo (Liu, Tari et al. 2009). Questi risultati mostrano che i meccanismi LTP-simili dipendenti da PKM ζ giocano un ruolo critico nel mantenimento della stabilità sinaptica durante lo sviluppo di centri superiori del sistema nervoso centrale dei mammiferi.

Riassumendo, l'ipotesi è che le sinapsi sono mantenute in un elevato livello di potenziamento da parte PKM ζ nei primi stadi di sviluppo neurologico. Questo fenomeno stabilizza le sinapsi giovani, "preparandole" a sviluppare meccanismi di plasticità differenti in seguito durante lo sviluppo. Vale a dire, i meccanismi LTD-like derivanti dall'esperienza, potrebbero portare la trasmissione sinaptica a uno stato in cui up- e down-regulation delle sinapsi sono possibili, permettendo quindi l'archiviazione delle informazioni nuove e altre forme di plasticità. Sarebbe interessante verificare se l'apertura degli occhi possiede alcun tipo di ruolo in questo processo; i P14, infatti, hanno ancora gli occhi chiusi, e ha senso che la corteccia peririnale, essendo coinvolta in memoria di riconoscimento, mostri fenomeni di plasticità sinaptica dipendenti da input ricevuti da corteccia visiva.

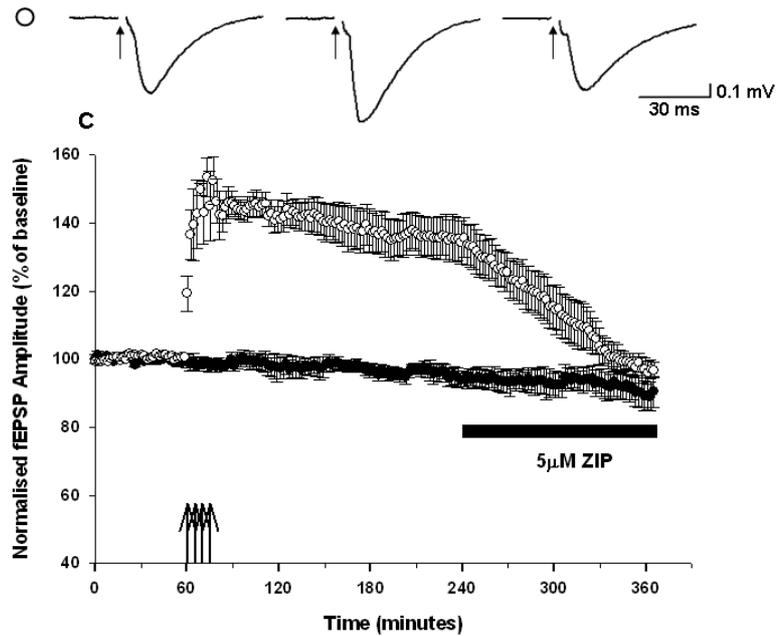


Figura 4.3.1 Effetto dell'inibizione di PKM ζ su LTP in P14 ippocampo (Peak Amplitude) LTP è facilmente indotta nell'ippocampo di P14 (cerchi bianchi: $141 \pm 5\%$ della baseline; $p < 0.01$; $n = 4$). L'inibizione di PKM ζ reverte completamente il potenziamento ($100 \pm 7\%$ of baseline, $p < 0.01$ v LTP) ma non ha effetto sulla trasmissione basale del controllo (cerchi neri $92 \pm 4\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n = 4$)

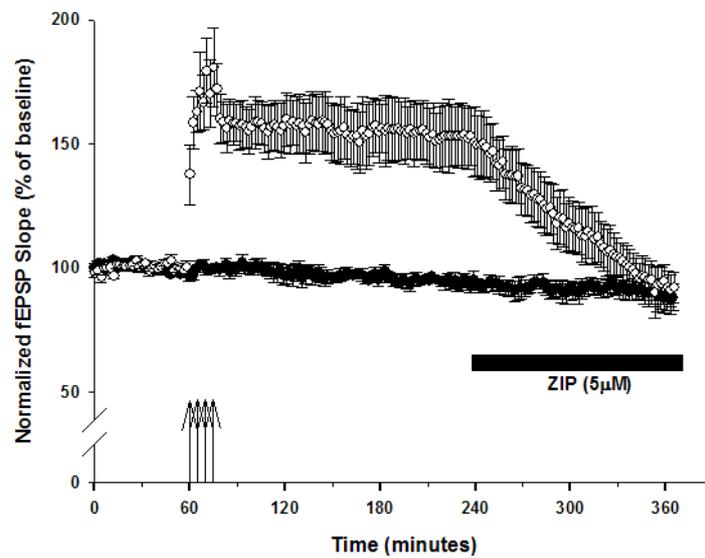


Figura 4.3.2 Effetto dell'inibizione di PKM ζ su LTP in P14 ippocampo (Slope) Le misurazioni delle variazioni della slope sono consistenti con le variazioni del picco di ampiezza della risposta. LTP è facilmente inducibile nell'ippocampo di P14 (cerchi bianchi: $157 \pm 9\%$ della baseline; $p < 0.01$; $n = 4$). L'inibizione di PKM ζ reverte completamente il potenziamento ($99 \pm 5\%$ della baseline, $p < 0.01$) ma non mostra effetti significativi sulla trasmissione basale nell'input di controllo (cerchi neri, $101 \pm 0.6\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n = 4$)

**5 REGOLAZIONE DI PKM ζ NELLA CORTECCIA PERIRINALE
DURANTE IL NEUROSVILUPPO**

5.1 Ruolo di PI3K e mTOR nella regolazione dell'attività di PKM ζ

5.1.1 Introduzione

Gli esperimenti finora condotti forniscono alcune buone evidenze che PKM ζ mantenga l'aumentata trasmissione sinaptica nella LTP. Tuttavia, i meccanismi sottostanti tramite i quali questo fenomeno si verifica non sono ancora noti.

Un possibile meccanismo comporta la regolazione tramite PKM ζ della sintesi proteica locale attraverso meccanismi di traslazione a livello dendritico (Westmark, Westmark et al. 2010). L'inizio della traslazione si basa, almeno in parte, sull'attivazione del mammalian target of rapamycin (mTOR), l'inibizione del quale impedisce la LTP (Hoeffer e Klann 2010). mTor è coinvolto in molti modi nella plasticità neuronale, inoltre possiede un ruolo cruciale nel mantenimento di LTP e memoria (Kelleher, Govindarajan et al 2004;. Helmstetter, Parsons et al 2008;. Klann e Sweatt 2008; Swiech, Perycz et al 2008;. Costa-Mattioli, Sossin et al 2009;. Richter e Klann 2009; Hoeffer e Klann 2010). Inoltre, la disregolazione di attività di mTOR è legata a diverse malattie cognitive, come la malattia di Alzheimer (Pei e Hugon 2008; Swiech, Perycz et al 2008; Ma, Hoeffer et al 2010), la sindrome da X fragile (Sharma, Hoeffer et al 2010), la sclerosi tuberosa (Ehninger, de Vries et al 2009;. Sampson 2009) e molte altre (Swiech, Perycz et al 2008;. Hoeffer e Klann 2010). E anche noto (Kelly, Crary et al. 2007) che l'inibizione di mTOR blocchi non solo il mantenimento della LTP, ma diminuisca anche la sintesi e l'attività di PKM ζ . Pertanto, per verificare se la trasmissione sinaptica basale nella corteccia peririnale di P14 è dipendente da meccanismi di traslazione proteica abbiamo studiato gli effetti sulla peririnale di inibitori di mTOR. E' stato suggerito (Westmark, Westmark et al 2010) che PKM ζ potrebbe mantenere la LTP tramite meccanismi di traslazione proteica, attraverso una cascate di signalling che coinvolgono la regolazione di Pin1 - una proteina che

interagisce con 4E-BP, e che di norma sopprime la traduzione proteica. 4E-BP sono fosforilati dagli mTOR per rimuovere l'inibizione all'inizio della traduzione (Hoeffler e Klann 2010). Se PKM ζ mantiene elevata la trasmissione sinaptica attraverso la traduzione delle proteine, è quindi probabile che coinvolga i processi di iniziazione della sintesi proteica mTOR-dipendenti.

Oltre a questo, abbiamo voluto esaminare un altro step fondamentale nella segnalazione intracellulare che puo' portare alla regolazione dell'attivita' di PKM ζ mediata da mTOR. E' noto che uno dei principali enzimi che svolgono un ruolo cruciale nel regolare l'attività di mTOR è la fosfoinositide-3-chinasi (PI3K) (Sabatini 2006; Tsokas, Ma et al 2007;. Gobert, Topolnik et al 2008. Costa-Mattioli, Sossin et al 2009;. Kawauchi, Ogasawara et al 2009). PI3K è anche coinvolta nella espressione e mantenimento di LTP (Horwood, Dufour et al 2006;. Karpova, Sanna et al 2006;. Tsokas, Ma et al 2007;. Gobert, Topolnik et al 2008;. Sui, Wang et al. 2008;. Bruel-Jungerman, Veyrac et al 2009), ed è a monte nella cascata di segnali che porta all'attivazione di PDK1 (Duronio 2008; Carnero 2009;. Costa-Mattioli, Sossin et al 2009; Kawauchi, Ogasawara et al. 2009; Carnero 2010; Hoeffler e Klann 2010), che si pensa sia fondamentale per fosforilare PKM ζ nel suo loop di attivazione, attivandola completamente (Kelly, Crary et al 2007). In particolare, PDK1 fosforila i loop di attivazione di PKC ζ in modo PI3-kinasi-dipendente (Le Good, Ziegler et al. 1998). Inoltre, l'inibizione della PI3K blocca il mantenimento di LTP e down-regola la sintesi di PKM ζ (Kelly, Crary et al. 2007). È interessante notare che è stato dimostrato che l'attivazione della PI3K è necessaria anche per l'inserimento in membrana dei recettori AMPA durante LTP in colture di neuroni dell'ippocampo (Man, Wang et al. 2003), che è anche il meccanismo attraverso il quale si pensa che PKM ζ mantenga la LTP (Ling, Benardo et al 2006;. Yao, Kelly et al 2008;. Miguez, Hardt et al 2010;. Sacktor 2010).

Pertanto, i seguenti gruppi di esperimenti sono volti a studiare il ruolo di mTOR e PI3K in plasticità sinaptica PKM ζ -dipendente nella corteccia peririnale nel corso dello sviluppo neurologico.

5.1.2 Risultati

5.1.2.1 Ruolo di mTOR nella trasmissione sinaptica basale

Come descritto in precedenza in questo capitolo, mTOR ha un ruolo cruciale nella regolazione della sintesi proteica. E' stato anche dimostrato che la sintesi proteica é necessaria per il mantenimento della LTP. Le nostre osservazioni precedenti ci hanno portato a pensare che nella corteccia peririnale neonatale (P14), la trasmissione sinaptica basale è completamente potenziato come se qualche meccanismo LTP-simile fosse alla base della trasmissione basale in questa fase. Se questo è vero, l'inibizione della sintesi proteica attraverso l'inibizione di mTOR dovrebbe diminuire la trasmissione sinaptica basale nella corteccia peririnale di P14. Per esaminare cio', dopo una registrazione di baseline di 40 minuti, rapamicina (5 micron) è stato applicata (**Figura 5.1.1**). L'inibizione di mTOR produce una depressione sostanziale della trasmissione basale nella corteccia peririnale di P14 (lato temporale: $73 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale: $74 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 6$). Tuttavia, nessun effetto dell'inibizione di mTOR mediante l'applicazione della rapamicina è stato osservato su fettine di peririnale da animali adulti (**Figura 5.1.2**: temporale: $98 \pm 3\%$ del valore basale, $p > 0.05$; entorinale $100 \pm 3\%$ basale, $p > 0.05$, $n = 4$). Questo risultato suggerisce che la continui meccanismi di sintesi proteica mantengono livelli basali di trasmissione sinaptica in P14, ma non nella corteccia peririnale adulta.

5.1.2.2 Effetto della inibizione mTOR sull'attività di PKM ζ in corteccia peririnale

La sintesi di nuove proteine mediata da mTOR mantiene alti livelli di trasmissione sinaptica e ci sono evidenze che anche la sintesi di PKM ζ a livello dendritico sia regolata da mTOR. Se questo è vero, l'inibizione

dell'attività di mTOR dovrebbe portare ad una inibizione indiretta di PKM ζ , mentre l'inibizione di PKM ζ dovrebbe occludere ogni successiva depressione della trasmissione sinaptica generata dalla successiva inibizione di mTOR.

Questo ultimo scenario è illustrato in **Figura 5.1.3**: dopo 1 ora di registrazione di baseline, ZIP è stato applicato in fette corteccia peririnale di ratti P14, seguita da 5 μ M rapamicina. La depressione di trasmissione determinata dall'inibizione di PKM ζ in corteccia peririnale di P14 occlude ogni successiva depressione della trasmissione sinaptica indotta da rapamicina (lato temporale: ZIP $55 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,001$; Rapamicina $52 \pm 3\%$ del valore basale, $p > 0,05$ v di ZIP; lato entorinale: ZIP $54 \pm 1\%$ del valore iniziale; Rapamycin $51 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0,05$ v di ZIP; $n = 4$). Questo risultato suggerisce che l'occlusione PKM ζ mantiene la trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di P14 attraverso, almeno in parte, la sintesi proteica mTOR-dipendente.

D'altra parte, l'applicazione di ZIP a seguito della depressione della trasmissione sinaptica da rapamicina (**Figura 5.1.4**) ha comportato una piccola ma significativa depressione della trasmissione sinaptica (lato temporale: Rapamicina $67 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,001$; ZIP $52 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,01$ V Rapamicina; lato entorinale: Rapamicina $66 \pm 2\%$ del valore basale, $p < 0,001$; ZIP $52 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,01$ V Rapamicina $n = 4$). La depressione prodotta da ZIP quando applicato dopo la rapamicina è stata inferiore alla depressione della trasmissione basale prodotta da ZIP da solo. Questo suggerisce che, sebbene PKM ζ mantenga la trasmissione basale attraverso la sintesi proteica mTOR-dipendente qualche ulteriore meccanismo può anche essere coinvolto.

Per rafforzare ulteriormente questi risultati, questa ultima serie di esperimenti è stata ripetuta utilizzando un altro inibitore di mTOR, KU0063794. Questo composto è un inibitore molto potente e selettivo di mTOR (Garcia-Martinez, Moran et al. 2009). Dopo 1 ora di registrazione di base da P14 corteccia

peririnale, 1 μ M KU0063794 è stato applicato bagno, seguito da ZIP. I dati totali (**figura 5.1.5**) mostrano che KU0063794 produce una significativa riduzione della trasmissione sinaptica basale, simile a quella prodotta da rapamicina (lato temporale: $72 \pm 2\%$ del valore basale, $p < 0.01$; entorinale laterale $69 \pm 2\%$ basale, $p < 0,01$). La seguente applicazione di ZIP (5 μ M) produce una ulteriore piccola ma significativa depressione della trasmissione sinaptica (lato temporale: ZIP $54 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0,01$ V KU0063794; lato entorinale: ZIP $51 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,01$ V KU0063794; $n = 4$). È anche interessante notare che la combinazione di questi farmaci determina una depressione totale della trasmissione sinaptica dello stesso ampiezza della depressione prodotta mediante l'applicazione di ZIP da solo. Nessun effetto derivante dall'inibizione di mTOR da parte di KU0063794 può essere osservato nella corteccia peririnale di ratti adulti (**Figura 5.1.6**: lato temporale: $100 \pm 4\%$ del valore basale, $p > 0.05$; lato entorinale $102 \pm 4\%$ del valore basale, $p > 0,05$, $n = 3$).

5.1.2.3 Ruolo di PI3K in basale trasmissione sinaptica

La fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) svolge un ruolo importante nella regolazione di mTOR (Sabatini 2006; Tsokas, Ma et al 2007;.. Gobert, Topolnik et al 2008; Costa-Mattioli, Sossin et al 2009.). Inoltre, PI3K è coinvolta nella espressione e mantenimento di LTP (Horwood, Dufour et al 2006;.. Karpova, Sanna et al 2006;.. Tsokas, Ma et al 2007;.. Gobert, Topolnik et al 2008;.. Sui, Wang et al . 2008). Per queste ragioni, abbiamo pensato che fosse un importante obiettivo da indagare al fine di chiarire ulteriormente i meccanismi alla base della trasmissione sinaptica potenziata che abbiamo osservato in corteccia peririnale di P14. Per indagare questo punto, dopo una baseline di 40 minuti l'inibitore "classico" di PI3K (wortmannin 400nm) è stato perfuso nella fetta. I dati mostrati in **Figura 5.1.7** mostrano che wortmannin è in grado di diminuire significativamente la trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14 (temporale: $61 \pm 4\%$ di base, $p < 0,001$; entorinale $64 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 5$). Nessuna differenza è stata osservata tra le due pathway ($p >$

0,05). Wortmannin non diminuisce la trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di ratti adulti (**Figura 5.1.8**: lato temporale: $107 \pm 4\%$ del valore basale, $p > 0.05$; lato entorinale $107 \pm 2\%$ del valore basale, $p > 0.05$, $n = 3$. Nessuna differenza tra le due pathway). Questi risultati confermano che PI3K è in qualche modo coinvolta nel mantenimento della trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di P14, ma non nell'adulto, presumibilmente attraverso l'inibizione della sintesi delle proteine mTOR-mediata.

5.1.2.4 Effetto della inibizione PI3K sull'attività di PKM ζ in corteccia peririnale

Poiché PI3K è importante per mantenere alti livelli di trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14, possibilmente attraverso la sintesi proteica mTOR-mediata, e mTOR sembra essere coinvolto nella regolazione dell'attività di PKM ζ , è stato interessante indagare se l'inibizione della PI3K poteva incidere in alcun modo sull'attività di PKM ζ in corteccia peririnale di P14. Per fare ciò, dopo 40 minuti di registrazione di baseline, un potente inibitore selettivo di PI3K, LY294002 $50\mu\text{M}$, è stato infuso nella fettina, seguito da ZIP. I dati in **Figura 5.1.9** mostrano che LY294002 produce una significativa riduzione della trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14 (lato temporale: $63 \pm 0,5\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale $63 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 4$). ZIP, applicato dopo che la risposta sinaptica si è nuovamente stabilizzata, produce una ulteriore piccola, ma significativa diminuzione di ampiezza della fEPSP (lato temporale: $53 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0.01$ v LY294002; lato entorinale $52 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0,01$ v LY294002). Nessuna differenza è stata trovata tra le due pathway ($p > 0,05$). È importante notare che l'inibitore selettivo di PI3K, LY294002, produce una diminuzione nella risposta sinaptica della stessa entità di quella prodotta da wortmannin. LY294002 non mostra alcun effetto sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di ratti adulti (**Figura 5.1.10**: temporale: $108 \pm 3\%$ del valore basale, $p > 0.05$;

entorinale $106 \pm 3\%$ del valore basale, $p > 0,05$). Questi risultati suggeriscono che PI3K è coinvolta nel mantenimento della risposta basale potenziata in corteccia peririnale di P14 (ma non di adulto), controllando in qualche modo l'attività di PKM ζ , possibilmente attraverso la regolazione di mTOR. Una spiegazione alternativa è che PI3K modula l'attività dei PKM ζ agendo sulla attivazione di PDK1.

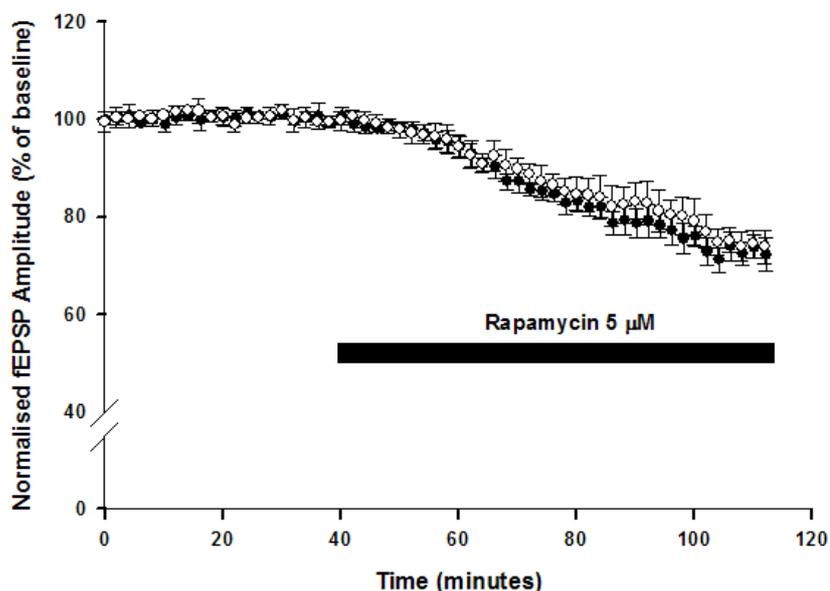


Figura 5.1.1 Effetto di Rapamicina sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia perinatale di P14 L'inibizione di mTOR produce una sostanziale depressione della trasmissione basale (temporale, cerchi neri: $73 \pm 3\%$ della baseline, $p < 0.001$; entorinale, cerchi bianchi: $74 \pm 3\%$ della baseline, $p < 0.001$, $n=6$).

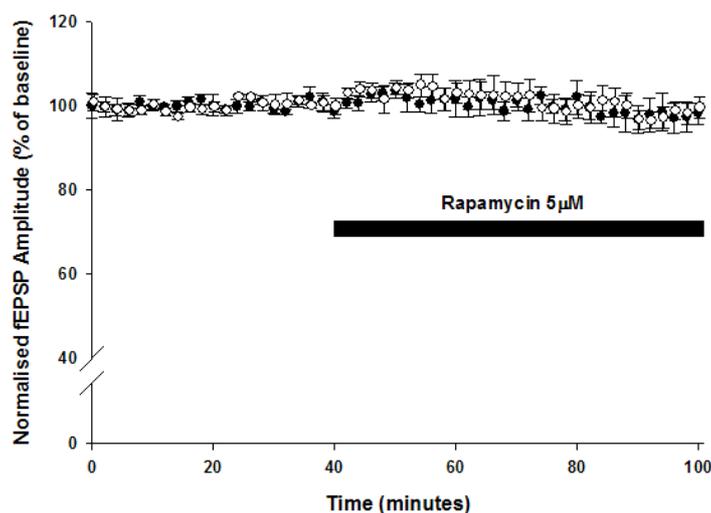


Figure 5.1.2 Effetto di rapamicina sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia perinatale di adulto L'inibizione di mTOR tramite l'applicazione di rapamicin non dimostra di aver effetto sulla trasmissione sinaptica in fettine di perinatale di animali adulti (lato temporale, cerchi neri: $98 \pm 3\%$ della baseline, $p > 0.05$; lato entorinale, cerchi bianchi: $100 \pm 3\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n=4$).

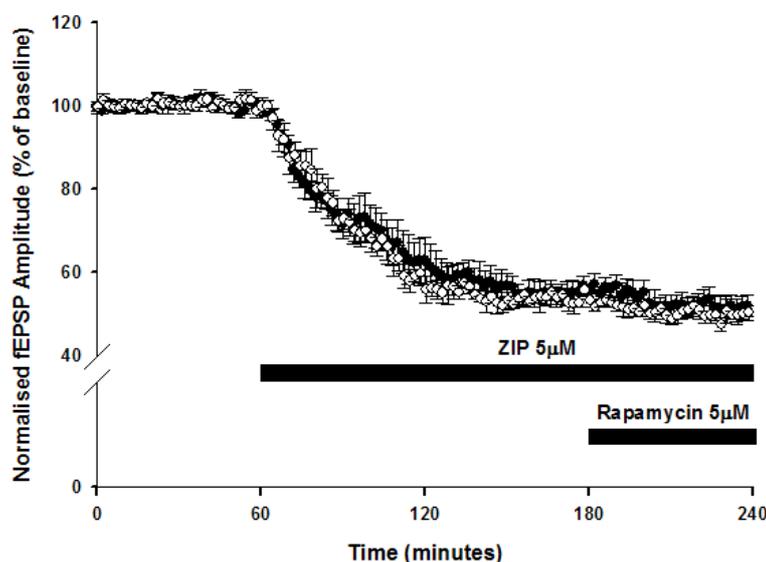


Figura 5.1.3 Effetto di ZIP seguito da Rapamycin sulla trasmissione sinaptica basale in P14. La depressione della trasmissione in corteccia peririnale di P14 mediante inibizione della PKM ζ occlude ogni successiva depressione della trasmissione sinaptica da rapamicina (lato temporale, cerchi neri: ZIP $55 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,001$; Rapamycin $52 \pm 3\%$ del valore basale, $p > 0,05$ v ZIP; lato entorinale, cerchi bianchi: ZIP $54 \pm 1\%$ del valore iniziale; Rapamycin $51 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0,05$ v ZIP; $n = 4$)

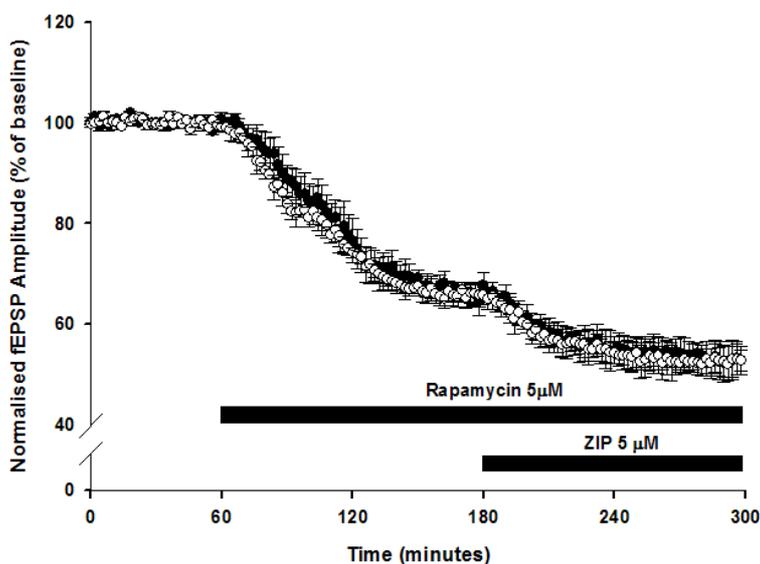


Figura 5.1.4 Effetto di rapamicina e zip sulla corteccia peririnale di P14. L'inibizione di mTOR produce una depressione sostanziale della trasmissione sinaptica basale in P14 (lato temporale, cerchi neri: $67 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale, cerchi bianchi: $66 \pm 2\%$ della baseline, $p < 0,001$, $n = 4$). La successiva inibizione di PKM ζ produce una piccola ma significativa riduzione della trasmissione sinaptica (lato temporale, ZIP $52 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,01$ v Rapamicina; lato entorinale ZIP $52 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,01$ v Rapamicina; $n = 4$)

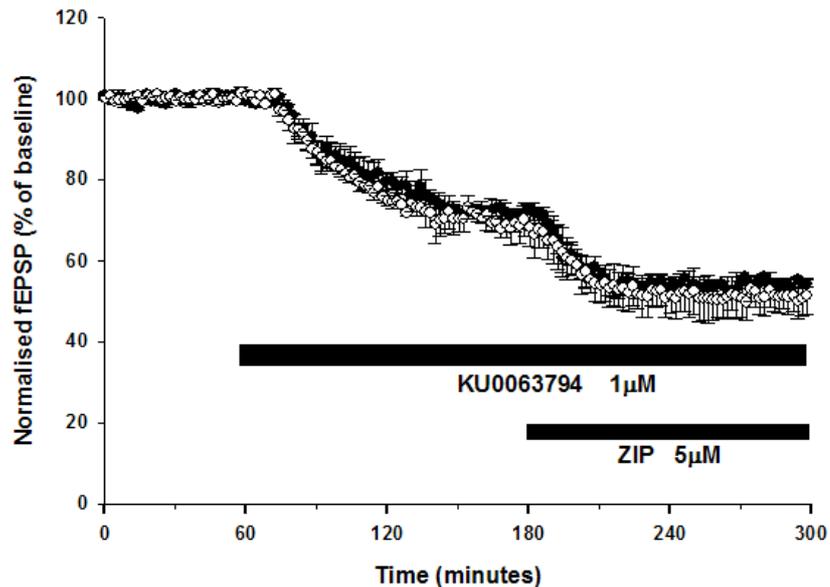


Figura 5.1.5 Effetto di KU0063794 e ZIP sulla corteccia perinatale di P14
 KU0063794 produce una significativa riduzione della trasmissione sinaptica basale, simile a quella prodotta da rapamicina (lato temporale, cerchi neri: $72 \pm 2\%$ del valore basale, $p < 0.01$; lato entorinale, cerchi bianchi $69 \pm 2\%$ del valore basale, $p < 0,01$). La successiva applicazione di ZIP produce una ulteriore depressione piccola ma significativa della trasmissione sinaptica (lato temporale: ZIP $54 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0,01$ v KU0063794; lato entorinale: ZIP $51 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,01$ v KU0063794; $n = 4$)

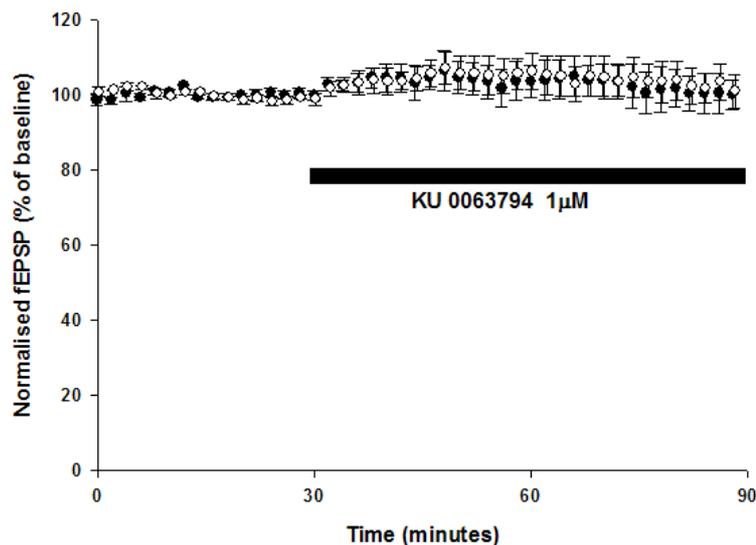


Figura 5.1.6 Effetto di KU0063794 su corteccia perinatale di adulto
 L'inibizione di mTOR indotta da KU0063794 non mostra nessun effetto sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia perinatale di ratti adulti (lato temporale, cerchi neri: $100 \pm 4\%$ del valore basale, $p > 0.05$; lato entorinale, cerchi bianchi $102 \pm 4\%$ del valore basale, $p > 0.05$, $n = 3$)

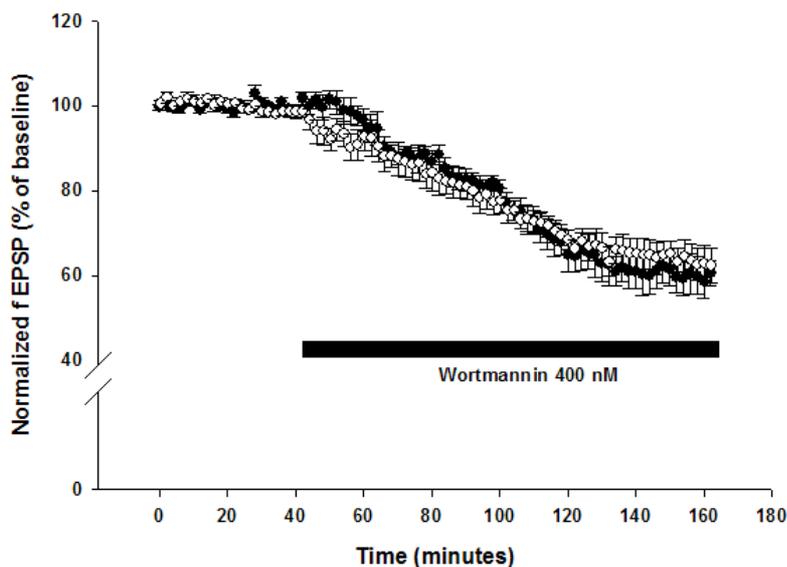


Figura 5.1.7 Effetto di Wortmannin sulla corteccia peririnale di P14
 Wortmannin è in grado di diminuire significativamente la trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14 (lato temporale, cerchi neri: $61 \pm 4\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale, cerchi bianchi $64 \pm 3\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 5$). Nessuna differenza è stata trovata tra le due pathways ($p > 0,05$).

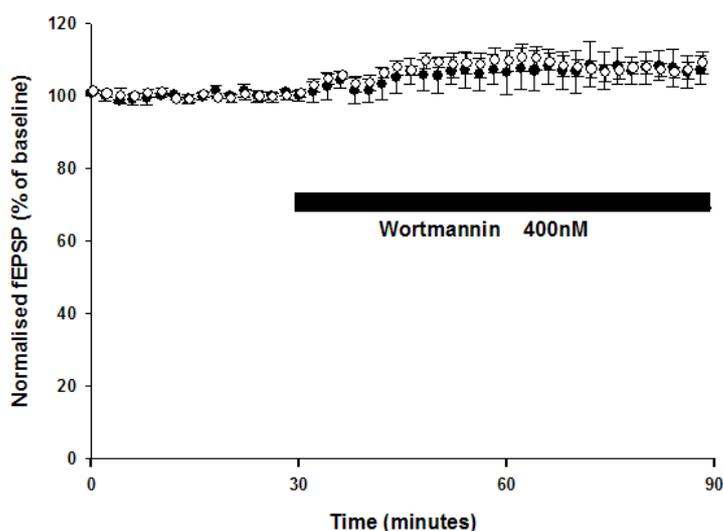


Figura 5.1.8 Effetto di Wortmannin sulla corteccia peririnale adulta
 L'inibizione di PI3K mediante l'applicazione di Wortmannin non mostra alcun effetto sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di ratti adulti (lato temporale, cerchi neri: $107 \pm 4\%$ del valore basale, $p > 0,05$; lato entorinale, cerchi bianchi $107 \pm 2\%$ del valore basale, $p > 0,05$, $n = 3$). Nessuna differenza è stata osservata tra le due pathways ($p > 0,05$).

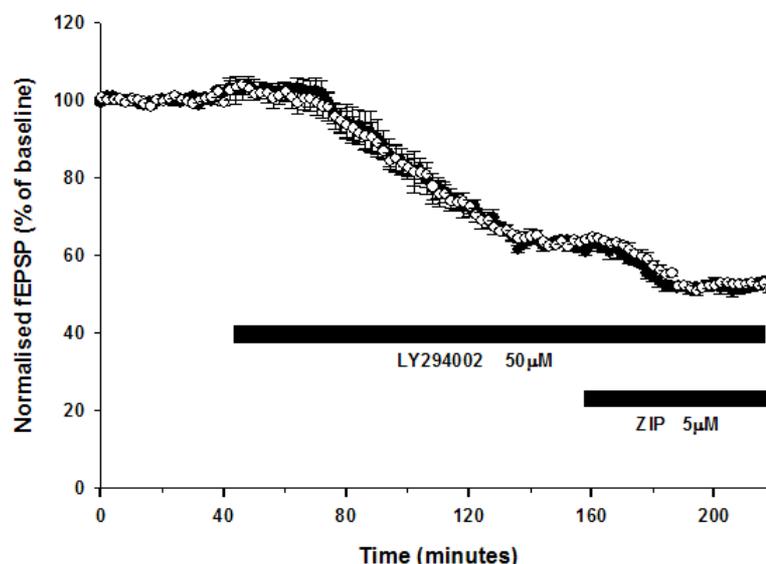


Figura 5.1.9 Effetto di LY294002 e ZIP su corteccia peririnale di P14
 LY294002 produce una diminuzione significativa della trasmissione sinaptica (lato temporale, cerchi neri: $63 \pm 0,5\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale, cerchi bianchi $63 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 4$). ZIP, applicato dopo che la risposta sinaptica si è nuovamente stabilizzata, produce una ulteriore piccola, ma significativa, diminuzione di ampiezza fEPSP (lato temporale: $53 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,01$ v LY294002; lato entorinale $52 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0,01$ v LY294002). Nessuna differenza è stata trovata tra le due pathways ($p > 0,05$).

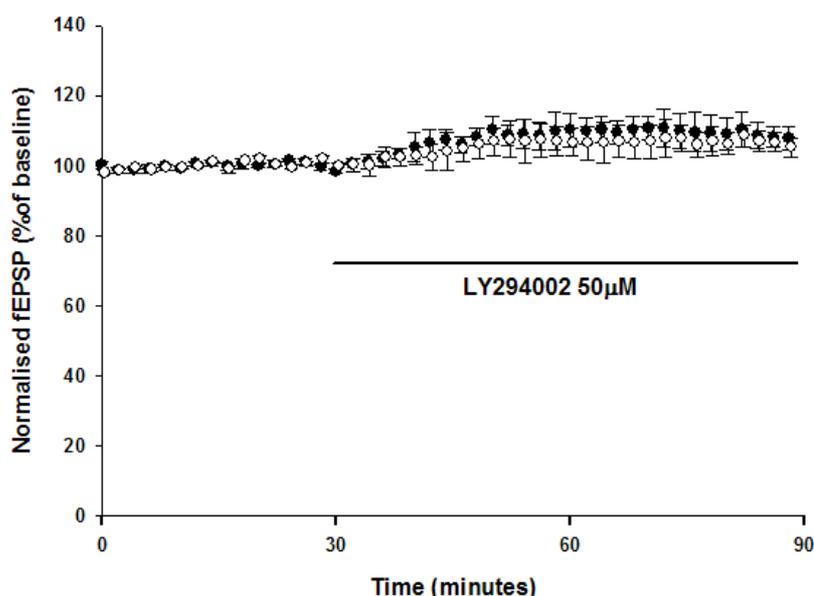


Figura 5.1.10 Effetto di LY294002 su corteccia peririnale di adulto
 LY294002 non mostra alcun effetto sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di ratti adulti (lato temporale, cerchi neri: $108 \pm 3\%$ del valore basale, $p > 0,05$; lato entorinale, cerchi bianchi: $106 \pm 3\%$ del valore basale, $p > 0,05$, $n = 3$). Nessuna differenza è stata trovata tra le due pathways ($p > 0,05$).

5.1.3 Discussione

I risultati precedentemente mostrati confermano che mTOR potrebbe essere coinvolti nei processi di sintesi proteica che portano a mantenimento del potenziamento. Diversi inibitori di mTOR (rapamicina e KU0063794) mostrano lo stesso effetto sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di P14, producendo una depressione della risposta di pari ampiezza senza alterare la trasmissione sinaptica basale nella corteccia peririnale di soggetti adulti. Due diversi inibitori di mTOR sono stati utilizzati al fine di rafforzare i risultati preliminari e di escludere che la rapamicina potesse avere qualsiasi azione diversa su altri elementi che potrebbero influenzare i risultati. In effetti, anche se la rapamicina è considerata un inibitore di mTOR potente e selettivo, ci sono alcune evidenze che questo composto potrebbe avere qualche effetto anche su Canali per il calcio voltaggio-dipendenti (Regimbald-Dumas, Fregeau et al 2010;. Suh, Leal et al. 2010). Alcuni di questi canali sembrano essere coinvolta nell'LTP nell'amigdala (Pinard, Mascagni et al. 2005), così provare anche un altro composto che non dovrebbe avere alcun effetto su questi canali fornirebbe un controllo e rafforzerebbe i risultati. Entrambi i composti, però, hanno mostrato lo stesso effetto di depressione della risposta sinaptica, suggerendo che una continua sintesi proteica potrebbe controllare i livelli basali di trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14, ma non nell'adulto.

La depressione della risposta sinaptica ottenuta attraverso l'inibizione di mTOR, però, è più piccola di quella prodotta dalla inibizione della sola PKM ζ . Quando ZIP è applicato in corteccia peririnale di P14 in seguito della depressione massima della trasmissione sinaptica prodotta dalla inibizione di mTOR, si osserva un'ulteriore diminuzione della risposta.. È interessante notare che la depressione totale della trasmissione sinaptica prodotta dalla inibizione consecutiva di mTOR prima e di PKM ζ poi, è della stessa ampiezza di quella prodotta dalla inibizione della sola PKM ζ . Questi risultati

suggeriscono che, anche se PKM ζ mantiene la trasmissione basale attraverso meccanismi di sintesi proteica mTOR-dipendente, alcuni meccanismi aggiuntivi possono essere coinvolti. Un'ipotesi è che mTOR regola solo la nuova sintesi di PKM ζ , ma non ha effetto su quella parte di enzima che è già attivo, quindi, l'inibizione totale di PKM ζ potrebbe essere ottenuto solo attraverso l'inibitore selettivo ZIP. Questa ipotesi è coerente con la constatazione che la depressione della trasmissione sinaptica ottenuta come conseguenza dell'inibizione della PKM ζ nella corteccia peririnale di P14 occlude ogni successiva depressione della trasmissione sinaptica che potrebbe essere prodotta dalla rapamicina.

Pertanto, la sintesi proteica, cruciale per il mantenimento di LTP e memoria (Hoeffler e Klann 2010), può essere una possibile via per il mantenimento PKM ζ -dipendente della LTP (Westmark et al 2010). In base a questi risultati, la sintesi proteica mTOR-dipendente è importante anche per la regolamentazione della trasmissione sinaptica basale nella corteccia peririnale dei P14, ma non negli adulti.

Un altro meccanismo che potrebbe giocare un ruolo nel mantenimento PKM ζ -dipendente del potenziamento della risposta sinaptica nella corteccia peririnale P14 coinvolge la fosfoinositide 3-kinasi (PI3K). Come meglio descritto in precedenza, è noto che PI3K svolge un ruolo importante nella regolazione di mTOR (Sabatini 2006; Tsokas, Ma et al 2007;. Gobert, Topolnik et al 2008;. Costa-Mattioli, Sossin et al 2009). Inoltre, PI3K è coinvolto nella espressione e nel mantenimento di LTP (Horwood, Dufour et al 2006;. Karpova, Sanna et al 2006;. Tsokas, Ma et al 2007;. Gobert, Topolnik et al 2008;. Sui, Wang et al . 2008). Infine, PI3K regola l'attività di PDK1, fondamentale per l'attivazione di PKM ζ (Kelly, Crary et al. 2007) Pertanto, in una pathway potenziata, come quelle che si osservano nella corteccia peririnale di P14 sembrano essere, l'inibizione della PI3K dovrebbe portare ad una depressione della trasmissione sinaptica. I risultati hanno mostrato di confermare questa ipotesi: gli inibitori della PI3K Wortmannin o

LY294002 producono una significativa depressione della trasmissione sinaptica. In questo caso, due inibitori della PI3K diversi sono stati usati per aumentare la precisione degli esperimenti. Entrambi i composti sembrano avere lo stesso effetto. Ancora una volta, però, la depressione della trasmissione sinaptica prodotta dalla inibizione di PI3K è minore della depressione prodotta dalla inibizione diretta di PKM ζ . La successiva applicazione di ZIP diminuisce ulteriormente la risposta, e la depressione finale della trasmissione sinaptica è alla fine dello stessa ampiezza di quella prodotta da ZIP da solo. Questi risultati sono simili ai risultati degli esperimenti effettuati con inibitori di mTOR. Ancora una volta, l'ipotesi è che PKM ζ è a valle di questa cascata di segnali, ma solo la sintesi di nuova PKM ζ è sotto il controllo di PI3K/mTOR. L'inibizione degli effettori PI3K-dipendente, però, non ha effetto su PKM ζ già attivo. Inoltre, PI3K controlla PDK1, cruciale per l'attivazione di PKM ζ . Pertanto, non si può escludere che l'effetto osservato con l'inibizione di PI3K avvenga anche attraverso un'inibizione indiretta dell'attività PKM ζ tramite l'inibizione di PDK1.

5.2 Ruolo dei Recettori Metabotropici del Glutammato di Gruppo I nella regolazione di PKM ζ durante il neurosviluppo.

5.2.1 Introduzione

Come descritto nei capitoli precedenti, PKM ζ sembra mantenere un elevato livello della trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14 agendo a valle di alcuni meccanismi di segnalazione intracellulare che coinvolgono PI3K e mTOR. È noto che l'attivazione di una varietà di recettori del glutammato, tra cui i recettori metabotropici del glutammato (mGluRs), può innescare cascate di segnalazione che sostengono LTP e regolano mTOR (Hoeffler e Klann 2010). Inoltre, è noto che PI3K, una chinasi coinvolta in fenomeni di memoria e apprendimento, è attivata dal complesso calcio / calmodulina (Joyal, Burks et al 1997; Wang, Fibuch et al 2007.) e dalla subunità $\beta\gamma$ della proteina G (Lopez Ilasaca-1998). È stato inoltre dimostrato che i recettori metabotropici del Glutammato di gruppo I (mGluR1 e mGluR5) sono accoppiati all'interno delle cellule alla proteina trimerica Gq: la subunità α di GQ induce l'idrolisi dei fosfoinositidi, con formazione di diacilglicerolo (DAG) e inositol-3-fosfato, inducendo un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} . La subunità $\beta\gamma$ attiva PI3K (Pin e Duvoisin 1995).

Ci sono numerose testimonianze dell'interazione tra i recettori mGlu e PI3K; i recettori mGlu di gruppo I attivano PI3K, inducendo una pathway di signalling intracellulare che mostra importanti effetti neuroprotettivi. Attraverso l'attivazione di PI3K, mGluRs di gruppo I prevengono l'apoptosi neuronale (Rong, Ahn et al. 2003), promuovono l'attivazione PI3K-dipendente di Akt e mTOR (Hou e Klann 2004), regolano l'attivazione della microglia (Chong, Kang et al. 2005), sono neuro protettivi nei confronti di peptidi A β in modelli animali di malattia di Alzheimer (Liu, Gong et al. 2005) e mostrano effetti

neuroprotettivi in modelli animali di ischemia cerebrale (Scartabelli, Gerace et al. 2008).

Infine, vi sono alcune evidenze che dimostrano che mGluRs sono coinvolti nella regolazione della sintesi proteica (Weiler e Greenough 1993;. Angenstein, Greenough et al 1998), quindi non è improbabile che essi possano in qualche modo regolare anche la sintesi di PKM ζ .

Partendo dalla nozione che i recettori mGluR di gruppo I, in particolare mGlu5, sono altamente espressi nelle prime fasi del neurosviluppo (Casabona, Knöpfel et al 1997;. Copani, Casabona et al 1998), questi recettori sembravano essere dei buoni candidati per mantenere gli alti livelli di trasmissione sinaptica basale che sono stati osservati nella corteccia peririnale di P14, eventualmente attraverso meccanismi mediati da PI3K /mTOR.

Quindi, al fine di esaminare il ruolo dei recettori mGlu di gruppo I nel mantenimento la trasmissione sinaptica basale in P14, e il loro possibile ruolo nella regolazione dell'attività PKM ζ , sono stati eseguiti i seguenti esperimenti.

5.2.2 Risultati

5.2.2.1 Ruolo di mGlu1 nella trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale

Al fine di determinare se una attivazione continua di mGlu1 può contribuire al mantenimento della trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di P14, dopo 30 minuti di registrazione di base, un antagonista selettivo di mGlu1 (2 μ M LY456236) è stato applicato per 1 ora (Figura 5.2.1). LY456236 produce una diminuzione nella trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di P14 (temporale: $76 \pm 0,7\%$ del valore basale, $p < 0,001$; entorinale $78 \pm 0,1\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 4$). Nessun effetto di LY456236 si osserva nella corteccia peririnale quando il composto viene applicato su fettine di cervello adulto (2-3 settimane), come mostrato nella **Figura 5.2.2** (temporale: $101 \pm 2\%$ della baseline, $p > 0,05$; entorinale $99 \pm 1,6\%$ del valore basale, $p > 0,05$, $n = 3$).

Questi esperimenti sono stati ripetuti utilizzando un altro inibitore di mGluR1, il modulatore allosterico negativo (NAM) JNJ16259685. Dopo 30 minuti di registrazione di baseline, l'applicazione di JNJ16259685 10 μ M produce una significativa riduzione della trasmissione sinaptica basale in fettine di corteccia peririnale da P14 (**Figura 5.2.3** lato temporale $77 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale $76 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 4$). L'effetto sulla trasmissione sinaptica basale di JNJ16259685 è della stessa entità della diminuzione prodotta dall'altro antagonista di mGlu1 LY456236, confermando i risultati precedenti. L'applicazione di JNJ16259685 non mostra alcun effetto sulla corteccia peririnale degli adulti (**Figura 5.2.4**, lato temporale $103 \pm 2\%$ del valore basale, $p > 0,05$; lato entorinale $101 \pm 3\%$ del valore basale, $p > 0,05$, $n = 3$).

La depressione prodotta da entrambi gli antagonisti di mGlu1 è più piccola di quella prodotta dall'inibizione di PKM ζ di mTOR, indicando che, sebbene l'attivazione continua di mGlu1 recettori probabilmente contribuisce a mantenere la trasmissione basale nella corteccia peririnale di P14, altri meccanismi potrebbero essere coinvolti in questo fenomeno. Al fine di confermare che la diminuzione osservata sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di P14 conseguente al blocco della mGlu1 avviene attraverso un meccanismo mTOR-dipendente, dopo 60 minuti di registrazione di base, inibitore di mTOR 1 μ M KU0063794 è stato applicato, seguito dal antagonista di mGlu1 LY456236 (**Figura 5.2.5**). I dati mostrano che l'inibizione di mTOR deprime la trasmissione sinaptica basale, come osservato in precedenza (**capitolo 5.1.2.2**) (lato temporale: $67 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0.01$; entorinale $68 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0.01$, $n = 3$). Nessuna ulteriore riduzione della trasmissione sinaptica, si osserva in seguito alla successiva applicazione di LY456236 (Temporale $65 \pm 2\%$ del valore basale, $p > 0.05$; entorinale laterale $66 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0.05$, $n = 3$). Pertanto, questi risultati suggeriscono che mGlu1 mantiene la trasmissione sinaptica basale nella corteccia peririnale p14 attraverso un meccanismo mTOR-dipendente.

5.2.2.2 Ruolo di mGlu5 nella trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale

Per valutare se mGlu5, così come mGlu1, contribuisce al mantenimento di elevati livelli basali di trasmissione sinaptica in corteccia peririnale di P14, l'antagonista di mGlu5 MPEP 10 μ M è stato applicato dopo 30 minuti di registrazione di baseline (**Figura 5.2.6**). Il blocco di mGlu5 produce una piccola ma significativa riduzione della trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14 (lato temporale $87 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale $83 \pm 2\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 7$). Questi risultati confermano il ruolo di mGlu5 nel mantenimento della trasmissione sinaptica

basale in corteccia peririnale di P14. Nessun effetto dell' inibizione di mGlu5 si osserva su fette di corteccia peririnale adulta (**Figura 5.2.7**, lato temporale $97 \pm 2\%$ del valore basale, $p > 0.05$; lato entorinale $99 \pm 2\%$ del valore basale, $p > 0,05$, $n = 5$).

Al fine di confermare che il calo osservato sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di P14 avviene attraverso un meccanismo mTOR-dipendente, dopo 60 minuti di registrazione di base, inibitore di mTOR rapamicina 5μ è stata perfusa sulla fettina, seguita dall'antagonista di mGlu5 MPEP (**Figura 5.2.8**). L'inibizione di mTOR deprime la trasmissione sinaptica basale, come osservato in precedenza (capitolo 5.1.2.2) (lato temporale: $67 \pm 2\%$ della baseline, $p < 0,001$; entorinale $68 \pm 1\%$ della baseline, $p < 0,001$, $n = 6$). Nessuna ulteriore riduzione della trasmissione sinaptica si osserva in seguito alla successiva applicazione di MPEP (lato temporale $63 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0.05$; lato entorinale $64 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0.05$, $n = 3$).

Pertanto, la depressione della trasmissione basale indotta da MPEP nella corteccia peririnale P14 non è stato osservato dopo depotenziamento rapamicina-indotto. Questi risultati suggeriscono che cascate di signalling mGlu5/mTOR-dipendenti mantengono la trasmissione sinaptica basale nella corteccia neonatale.

5.2.2.3 Effetto dell'antagonismo combinato di mGlu1 e mGlu5 sul mantenimento della trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di P14

Dal momento che i nostri risultati precedenti dimostrano che l'antagonismo selettivo di mGluR1 o mGlu5 in corteccia peririnale di P14 produce una depressione nella trasmissione sinaptica di più o meno il 20% ciascuno, è stato interessante scoprire se questo effetto è additivo, e se è si verifica attraverso l'inibizione dell'attività di PKM ζ . Per verificare questa ipotesi, dopo

una registrazione di baseline di 30 minuti, il selettivo mGlu1 NAM, JNJ16259685, è stato applicato sulla fetta di corteccia peririnale di ratto P14, seguito dall'antagonista selettivo di mGlu5, MPEP (**Figura 5.2.9**). L'inibitore selettivo di PKM ζ , ZIP, è stato applicato dopo MPEP. Il blocco di mGlu1 produce una significativa riduzione della trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14 (lato temporale: $77 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale: $80 \pm 0,8\%$ del valore basale, $p < 0,001$; $n = 4$). L'applicazione successiva di MPEP in corteccia P14 diminuisce ulteriormente la trasmissione sinaptica basale in modo additivo (lato temporale: $59 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0,001$ v JNJ16259685, lato entorinale: $59 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0,001$ v JNJ16259685; $n = 4$). La successiva applicazione di ZIP, però, produce un'ulteriore piccola, ma significativa, depressione della trasmissione sinaptica (lato temporale: $51 \pm 0,7\%$ del valore basale, $p < 0,01$ v MPEP; lato entorinale: $51 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0,01$ v MPEP; $n = 4$). Pertanto, il depotenziamento ZIP-indotto della baseline non è completamente occluso dal blocco di mGluR1 e mGluR5, questo suggerisce ancora una volta che l'attività di PKM ζ è probabilmente regolata dai recettori metabotropici di Gruppo I, anche se non completamente.

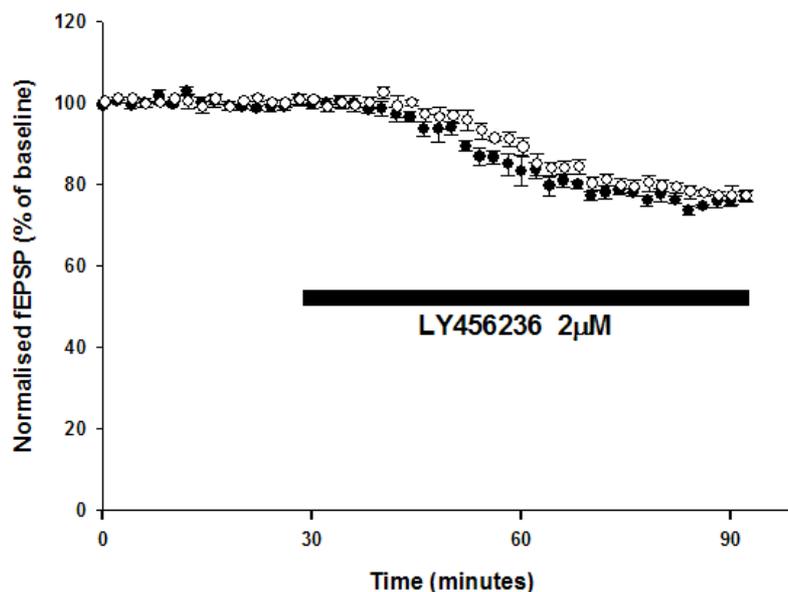


Figura 5.2.1 Effetto di LY456236 sulla corteccia peririnale di P14
L'antagonista selettivo di mGlu1, LY456236, produce una diminuzione della risposta sinaptica basale (lato temporale, cerchi neri: $76 \pm 0.7\%$ della baseline, $p < 0.001$; lato entorinale, cerchi bianchi $78 \pm 0.1\%$ della baseline, $p < 0.001$, $n=4$).

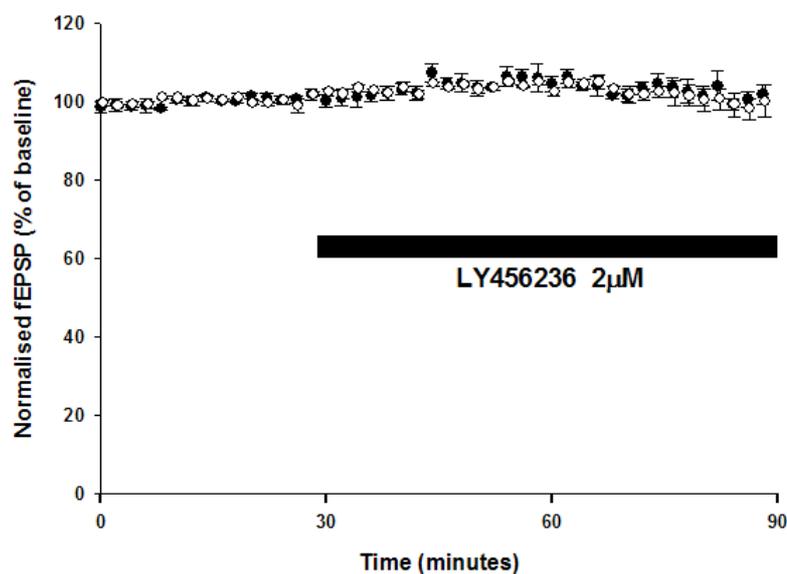


Figure 5.2.2 Effetto di LY456236 su corteccia peririnale di adulto
L'antagonista di mGlu1 LY456236 non mostra alcun effetto sulla trasmissione sinaptica basale in corteccia peririnale di adulto (Temporale, cerchi neri: $101 \pm 2\%$ della baseline, $p > 0.05$; entorinale, cerchi bianchi $99 \pm 1.6\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n=3$).

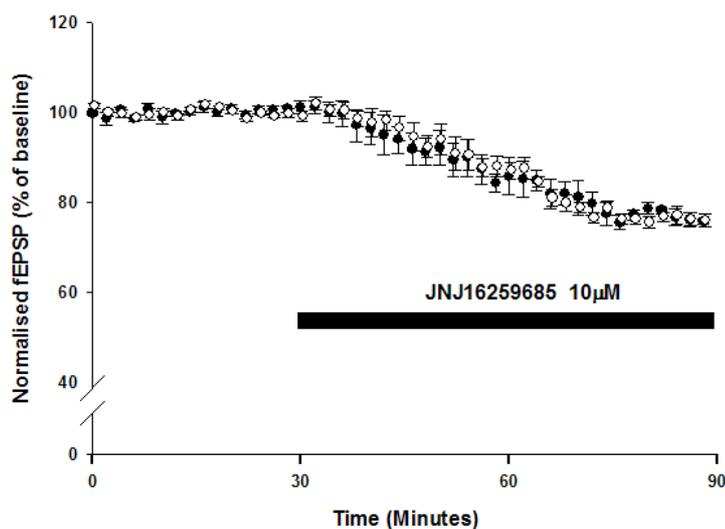


Figura 5.2.3 Effetto di JNJ16259685 su corteccia peririnale di P14
L'applicazione del NAM di mGlu1, JNJ16259685, produce una depressione significativa della trasmissione sinaptica (lato temporale, cerchi neri: $77 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale, cerchi aperti: $76 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 4$). L'effetto sulla trasmissione sinaptica basale di JNJ16259685 è della stessa entità del calo prodotto dall'altro antagonista di mGlu1 LY456236.

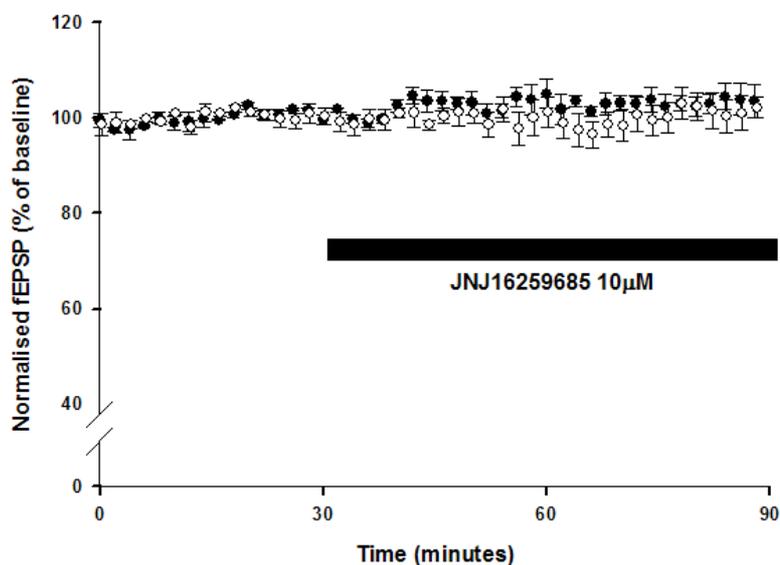


Figura 5.2.4 Effetto di JNJ16259685 su corteccia peririnale di adulto
L'applicazione di JNJ16259685 non mostra alcun effetto sulla corteccia peririnale di adulti (lato temporale, cerchi neri: $103 \pm 2\%$ della baseline, $p > 0.05$; lato entorinale, cerchi bianchi: $101 \pm 3\%$ della baseline, $p > 0.05$, $n = 3$). Nessuna differenza è stata trovata tra le due pathways ($p > 0,05$).

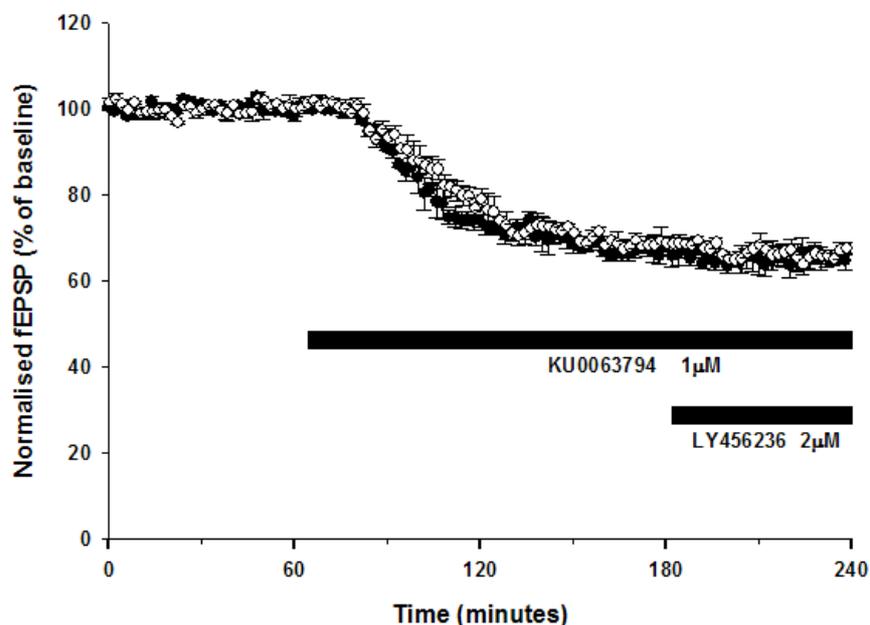


Figura 5.2.5 Effetto di KU0063794 e LY456236 su corteccia peririnale di P14 L'inibizione di mTOR da KU0063794 deprime la trasmissione sinaptica basale (lato temporale, cerchi neri: $67 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0.01$; lato entorinale, cerchi aperti $68 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0.01$, $n = 3$). Nessuna ulteriore riduzione della trasmissione sinaptica si osserva in seguito alla successiva applicazione di LY456236 (Temporale $65 \pm 2\%$ del valore basale, $p > 0.05$; entorinale $66 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0.05$, $n = 3$)

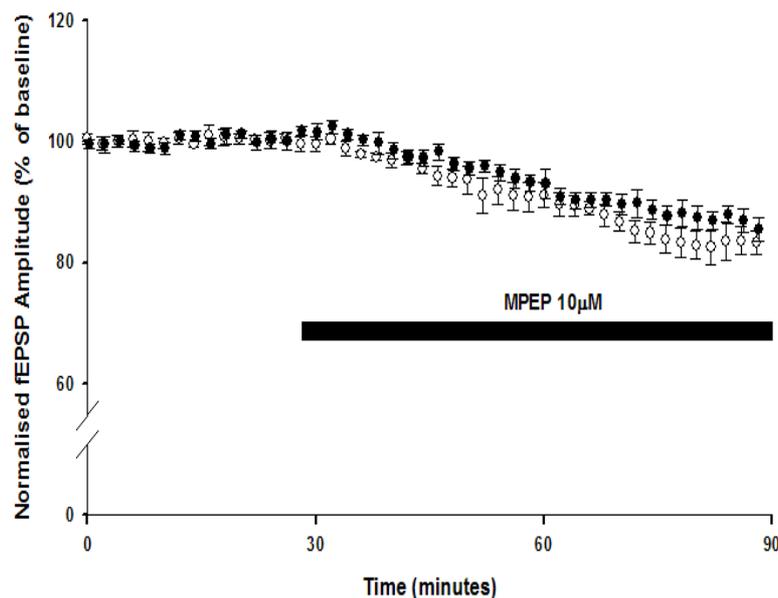


Figura 5.2.6 Effetto di MPEP su corteccia peririnale di P14 L'applicazione dell'antagonista selettivo di mGlu5 MPEP produce una piccola ma significativa riduzione della trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14 (lato temporale, cerchi neri: $87 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0,001$; lato entorinale, cerchi aperti: $83 \pm 2\%$ del valore basale, $p < 0,001$, $n = 7$).

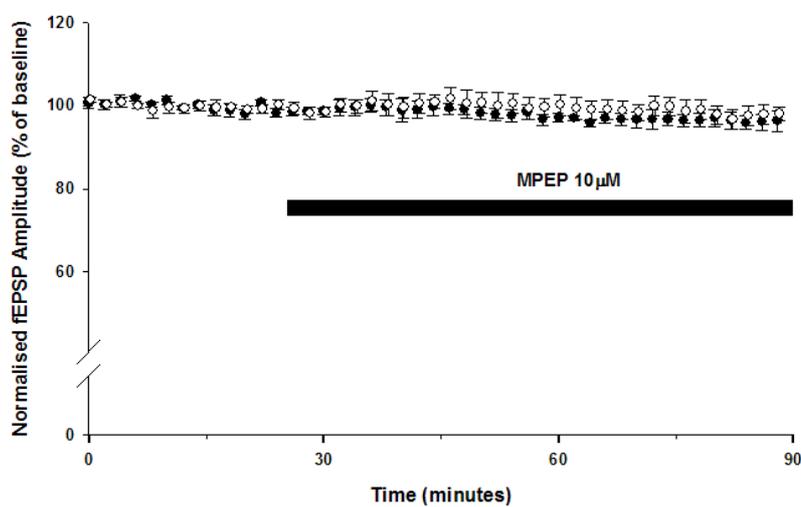


Figura 5.2.7 Effetto di MPEP su corteccia peririnale di adulto L'applicazione dell'antagonista selettivo di mGlu5 MPEP non mostra alcun effetto sulla trasmissione sinaptica basale nella corteccia peririnale di adulto (lato temporale, cerchi neri: $97 \pm 2\%$ del valore basale, $p < 0,05$; lato entorinale, cerchi aperti: $99 \pm 2\%$ del valore basale, $p > 0,05$, $n = 7$).

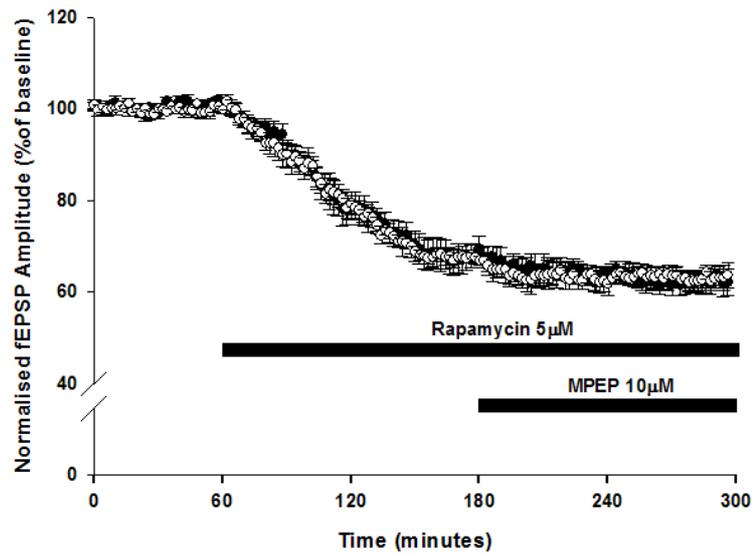


Figura 5.2.8 Effetto di Rapamicina ed MPEP su corteccia peririnale di P14

L'applicazione dell'inibitore di mTOR rapamicina deprime la trasmissione sinaptica basale, come osservato in precedenza (temporale, cerchi neri: $67 \pm 2\%$ del valore basale, $p < 0.001$; entorinale, cerchi bianchi: $68 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0.001$, $n = 6$). Nessuna ulteriore riduzione della trasmissione sinaptica, si osserva in seguito all'applicazione di MPEP (temporale $63 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0.05$; lato entorinale $64 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0.05$, $n = 3$).

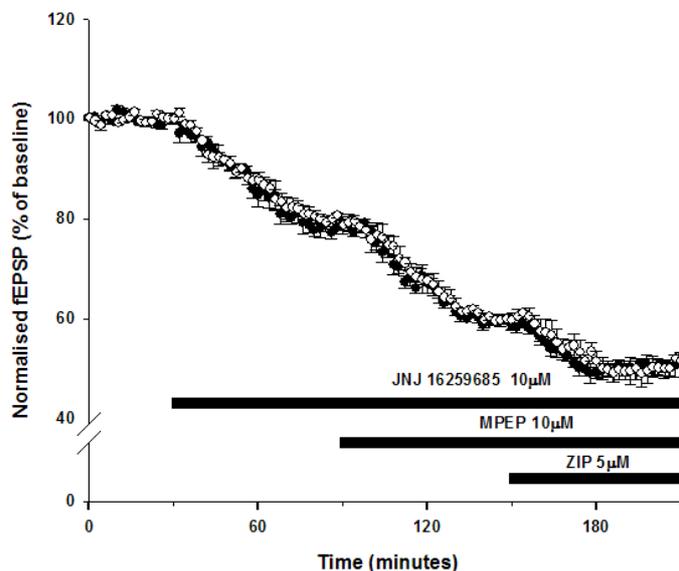


Figura 5.2.9 Effetto di JNJ16259685, MPEP e ZIP su corteccia peririnale di P14

L'applicazione di JNJ16259685 produce una significativa riduzione della trasmissione sinaptica (temporale, cerchi neri: $77 \pm 1\%$ del valore basale, $p < 0.001$; entorinale, cerchi bianchi: $80 \pm 0,8\%$ del valore basale, $p < 0.001$; $n = 4$). L'applicazione successiva di MPEP diminuisce ulteriormente la trasmissione sinaptica in modo additivo (temporale: $59 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0.001$ v JNJ16259685; entorinale: $59 \pm 0,6\%$ del valore basale, $p < 0.001$ v JNJ16259685). La successiva applicazione di ZIP produce una ulteriore piccola, ma significativa, depressione della trasmissione sinaptica (lato temporale: $51 \pm 0,7\%$ del valore basale, $p < 0.01$ v MPEP; entorinale: $51 \pm 1\%$ del valore basale, $p > 0.01$ v MPEP)

5.2.3 Discussione

I precedenti risultati dimostrano che è possibile che un alto livello di trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14 sia regolato da PKM ζ , che è a sua volta controllata da processi PI3K- e mTOR-dipendenti. Ma cosa mantiene un alto livello di attività di PKM ζ ? Un possibile candidato è stato identificato nei recettori metabotropici del glutammato (mGluRs), in particolare del gruppo I

Come descritto in precedenza, è ampiamente noto che i recettori metabotropici del glutammato sono fondamentali nella plasticità neuronale, in particolare in processi di apprendimento e memoria. Il Gruppo I degli mGluRs, accoppiato con Gq, ha come effetto finale l'idrolisi del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) a diacil glicerolo (DAG) e inositolo trifosfato (IP3) e tramite vie di signalling intracellulare portano ad un aumento della concentrazione intracellulare di Ca²⁺. I recettori del Gruppo I sono anche noti per regolare l'attività di mTOR e PI3K, pertanto appaiono come un soggetto interessante da indagare, al fine di chiarire ulteriormente i meccanismi che portano alla attività sostenuta di PKM ζ .

Quando l'attività di mGlu1 o mGlu5 è bloccata mediante l'applicazione di antagonisti selettivi, si osserva una piccola ma significativa depressione della trasmissione sinaptica in corteccia peririnale di P14. Il blocco di questi recettori non mostra alcun effetto sulla trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale dell'adulto. Di conseguenza, questi recettori sembrano essere coinvolti nel mantenimento degli alti livelli di trasmissione sinaptica nella corteccia peririnale di P14, anche se i meccanismi responsabili di questo effetto non sono noti. Seguendo l'ipotesi che la trasmissione sinaptica basale è mantenuta da PKM ζ forse attraverso sintesi proteica PI3K/mTOR-dipendente, l'idea era che il gruppo I degli mGluRs, regolando l'attività di mTOR e PI3K, possa essere a monte dell'intero percorso di signalling. Infatti,

quando gli antagonisti di mGlu1 o mGlu5 vengono applicati sulla fettilinaa dopo la depressione della trasmissione sinaptica prodotta dalla inibizione di mTOR, non si osserva nessuna ulteriore diminuzione della risposta. Questi risultati supportano l'ipotesi che la regolazione da parte di mTOR della trasmissione sinaptica si basa, almeno in parte, sull'attivazione di mGlu1 e mGlu5. È importante ricordare che la traduzione mTOR-dipendente ha già dimostrato di essere coinvolta nella plasticità sinaptica e si sa che il gruppo I degli mGluRs è in grado di regolare la traduzione proteica mTOR-dipendente (Hoeffler e Klann 2010). Inoltre, l'inibizione di entrambi mGlu1 e mGlu5 sembra deprimere la trasmissione sinaptica in modo additivo. Ancora una volta, la depressione prodotta da entrambe gli antagonisti di mGlu1 e mGlu5 è più piccola di quella prodotta dalla inibizione diretta di PKM ζ , e la successiva applicazione di ZIP produce un' ulteriore piccola diminuzione nella trasmissione sinaptica. La depressione totale della trasmissione sinaptica ottenuta con l'applicazione dei tre composti è della stessa entità di quella prodotta da ZIP da solo. Ancora una volta, quindi, questi risultati suggeriscono che, anche se la continua attivazione del gruppo I dei recettori mGlu contribuisce in grande parte a mantenere la trasmissione basale nella corteccia peririnale di P14, probabilmente esistono altri meccanismi coinvolti in questo processo.

Considerati insieme, questi risultati suggeriscono che una cascata di signalling mGlu1/5-PKM ζ -mTOR-dipendente mantiene la trasmissione sinaptica basale nella corteccia neonatale.

6 DISCUSSIONE GENERALE

6.1 Discussione generale

Vi è un crescente interesse nella comunità scientifica nei riguardi di PKM ζ . È stato ben dimostrato nel corso degli ultimi anni che PKM ζ è cruciale per il mantenimento della LTP in differenti aree del cervello (in particolare l'ippocampo e la corteccia insulare). L'inibizione della PKM ζ annulla la LTP sia in vitro che in vivo, e cancella completamente i ricordi codificati in esperimenti comportamentali di vario genere (Sacktor, Osten et al 1993;. Serrano, Yao et al 2005;. Pastalkova, Serrano et al. 2006; Shema, Sacktor et al 2007;. Serrano, Friedman et al 2008). Gli esperimenti eseguiti in corteccia peririnale di adulto confermano il ruolo di PKM ζ nel mantenere il potenziamento anche in questa zona del cervello, cruciale per la memoria di riconoscimento. Inoltre, l'attività di PKM ζ è down-regolata dalla somministrazione di protocolli di LFS, quando sono in grado di condurre ad una vera e propria, stabile LTD (o depressione). Per questi motivi, PKM ζ non mostra alcun effetto sulla induzione di LTD, così come non mostra alcun effetto sulla induzione di LTP, in cui non è coinvolta. In generale, i risultati confermano ciò che è noto su PKM ζ , come è stato descritto in studi precedenti, anche se questa è la prima volta che tali studi sono svolti nella corteccia peririnale. Inoltre, gli esperimenti sulla inibizione PDK1 sembrano confermare il ruolo cruciale di questa proteina nella regolazione dell'attività PKM ζ , anche se, come spiegato prima, è impossibile affermare con certezza che l'effetto osservato sul mantenimento della LTP si verifica solo attraverso una inibizione PDK1-dipendente dell'attività di PKM ζ . PDK1, infatti, regola molte differenti processi cellulari, la maggior parte dei quali coinvolti nella proliferazione cellulare. Tuttavia, i risultati sono incoraggianti e potrebbero fornire una base per ulteriori lavori volti a chiarire meglio il signalling intracellulare coinvolto nella regolazione del PKM ζ . La regolazione delle attività PKM ζ è, infatti, un aspetto molto affascinante, perché questa proteina sembra da sola essere sufficiente per il mantenimento di LTP (Ling, Benardo et al. 2002), ma i meccanismi che portano alla sua attivazione non sono ancora chiari. È piuttosto sorprendente,

in primo luogo, che una sola proteina sia responsabile del mantenimento di un processo così importante e complicato, come il mantenimento della memoria. Inoltre, l'up-regulation di PKM ζ in seguito a LTP e la sua down-regulation in seguito a LTD (o viceversa: LTP conseguente ad up-regulation di PKM ζ e LTD conseguente alla down-regulation di PKM ζ) sembrano essere fenomeni di una semplicità sorprendente. Per quanto riguarda i meccanismi intracellulari che portano all'attivazione di PKM ζ , è stato ipotizzato che PKM ζ è attivato da varie chinasi, come PI3K, CaMKII e chinasi associate, che sono up-regolate entro 10 minuti post-HFS (Osten, Valsamis et al. 1996; Sacktor 2008). I livelli di PKM ζ , invece, aumentano solo dopo 10 minuti post-HFS (Sacktor 2008). Pertanto, PKM ζ è idoneo a costituire una via finale comune per l'induzione delle chinasi, in grado di mantenere il potenziamento sinaptico attraverso persistente attività della chinasi. I meccanismi con cui PKM ζ mantiene la sua persistente attività chinasi vanno ancora chiariti. In realtà, il tempo di dimezzamento di PKM ζ è di un paio d'ore al massimo, a meno che i suoi effetti possono durare per un tempo molto più lungo (forse più di un mese) (Sacktor 2008). È stato suggerito che, una volta attivata, PKM ζ auto-mantiene la sua sintesi attraverso un ciclo di feedback positivo (Kelly, Crary et al. 2007), ma i fattori di trascrizione effettivamente responsabili di questa upregulation di così lunga durata devono essere ancora identificati. CREB sembra essere coinvolto (Muslimov, Nimmrich et al. 2004), ma ulteriori studi saranno necessari per ottenere evidenze conclusive.

Esperimenti condotti su animali P14 offrono uno scenario diverso. A differenza di quanto osservato negli adulti, non solo non è possibile indurre LTP in corteccia P14 peririnale, ma l'inibizione di PKM ζ riduce significativamente la risposta sinaptica, sia nella baseline sia in una pathway de-depressa. Ulteriori esperimenti hanno dimostrato che PKM ζ mantiene questi livelli LTP-simili della risposta sinaptica attraverso una cascata di signalling PI3K/mTOR-dipendente. Inoltre, questi processi sembrano essere sotto il controllo del gruppo I dei recettori metabotropici del glutammato. mGluRs di gruppo I, PI3K e mTOR sono tutti fattori cruciali nella plasticità

sinaptica e i loro ruoli sono stati ampiamente discussi nei capitoli 5.1.1, 5.1.3, 5.2.1 e 5.2.3. Ora, è interessante esaminare il significato di queste osservazioni considerate nel loro insieme. Senza dubbio, un tale comportamento peculiare della corteccia peririnale solleva molti interrogativi, in quanto finora non ci sono prove di un comportamento simile in nessun'altra regione del cervello. PKM ζ ora è etichettata come "la proteina che mantiene la LTP" (Hrabetova e Sacktor 1996; Drier, Tello et al 2002; Ling, Benardo et al 2002; Pastalkova, Serrano et al 2006), quindi un effetto così grande della sua inibizione sulla baseline è abbastanza sorprendente, in un primo momento. Tuttavia, i risultati mostrati nel capitolo 4.2 forniscono un forte supporto all'ipotesi che nella corteccia peririnale di P14 la trasmissione sinaptica basale sia già potenziato da sola, come se fosse in uno "stato permanente di LTP". In quest'ottica, l'effetto di inibizione della PKM ζ ha più senso. A quanto pare, in questa fase di sviluppo neurologico nella corteccia peririnale, il ruolo di PKM ζ nel mantenere alti livelli di trasmissione sinaptica dovrebbe essere letto in modo diverso, cioè essere considerato come un processo di stabilizzazione delle sinapsi immature. Un possibile coinvolgimento di PKM ζ nella stabilizzazione delle sinapsi immature nel corso dello sviluppo neurologico è stato recentemente dimostrato in *Xenopus* (Liu, Tari et al. 2009). Inoltre, anche se i motivi per cui la trasmissione sinaptica viene mantenuta in uno stato potenziato non sono noti, è possibile che questi meccanismi siano finalizzati a promuovere o stabilizzare connessioni sinaptiche nella corteccia immatura cerebrale (Hua e Smith 2004; Cline e Haas 2008; Hanse, Taira et al. 2009). Questa stabilizzazione delle sinapsi immature può avvenire attraverso un meccanismo che si basa sulla trasmissione glutammatergica e l'inserimento dei recettori AMPA nella membrana neuronale (Rajan, Witte et al 1999; Haas, Li et al 2006; Hanse, Taira et al 2009). Poiché vi è un crescente accordo sulle prove che PKM ζ mantiene LTP attraverso la regolamentazione del traffico dei recettori AMPA (Ling, Benardo et al 2006; Yao, Kelly et al 2008; Miguez, Hardt et al 2010), non è azzardato dire che questi meccanismi di stabilizzazione sinaptica sono essenzialmente gli stessi che operano nell'espressione/ mantenimento del

potenziamento a lungo termine (LTP). Pertanto la stabilizzazione della trasmissione nelle sinapsi immature è potenzialmente sotto il controllo di meccanismi di induzione, espressione e di mantenimento di processi LTP-simili.

Più tardi durante lo sviluppo, il potenziamento "di base" viene gradualmente perduto, finché non è possibile cominciare ad indurre LTP in corteccia peririnale. Ciò è già evidente a PND35, e persiste in età adulta.

I meccanismi che riducono il ruolo della LTP e PKM ζ durante lo sviluppo della corteccia peririnale non sono noti, ma potrebbero derivare da processi LTD-simili che sono alla base della memoria di riconoscimento visivo (Brown e Bashir 2002; Griffiths, Scott et al 2008). L'apertura degli occhi potrebbe essere un elemento importante coinvolto in questo fenomeno. La corteccia peririnale è strettamente connessa alla corteccia visiva, per cui una ipotesi molto interessante è che i processi LTD-simili potrebbero avvenire in corteccia peririnale come conseguenza di nuovi input provenienti dalla corteccia visiva. Vale la pena sottolineare ancora una volta che a PND14 i ratti hanno gli occhi ancora chiusi. L'ipotesi che le prime esperienze visive possano produrre una qualche forma di plasticità della corteccia visiva, che a sua volta modifica le connessioni sinaptiche nella corteccia peririnale, è senza dubbio affascinante, ma che richiederebbe ulteriori indagini. Un modo per farlo potrebbe essere cercare di indurre LTP in ratti adulti in deprivazione visiva. Se i meccanismi che portano alla depressione della trasmissione sinaptica basale, che consente alla sinapsi di essere potenziata in seguito a stimolazione adeguata, dipendono da input visivi, gli animali adulti allevati al buio non dovrebbero presentare LTP, esattamente come avviene nei P14.

Un'altra possibilità interessante è che la stabilizzazione neuronale mantenuta da PKM ζ si verifichi al fine di prevenire disturbi dello sviluppo. Una regolazione aberrante della sintesi proteica è importante nei disturbi dello sviluppo, come autismo e ritardo mentale (Hoeffler e Klann 2010). È possibile

che PKM ζ , mantenendo una sorta di stabilità nelle sinapsi, impedisca anche il verificarsi di una sorta di sintesi proteica aberrante a livello dendritico che potrebbe produrre anomalie nella trasmissione sinaptica e nelle connessioni durante le prime fasi dello sviluppo. Pertanto meccanismi PKM ζ / mTOR-dipendenti potrebbe essere essenziale anche per il normale sviluppo del sistema nervoso centrale.

Finora, non c'è lavoro svolto sugli esseri umani, ma ovviamente questa proteina è di grande interesse soprattutto in patologie che coinvolgono la memoria. Alcuni lavori preliminari dimostrano che PKM ζ forma aggregati con grovigli neurofibrillari e recettori AMPA nella malattia di Alzheimer (Crary, Shao et al. 2006). Inoltre, ci sono evidenze che una disregolazione della segnalazione di mTOR sia coinvolta in molte patologie, come il morbo di Alzheimer, la sindrome da X-fragile, sclerosi tuberosa e così via (Pei e Hugon 2008;. Swiech, Perycz et al 2008; Ehninger, de Vries et al . 2009; Hoeffler e Klann 2010; Ma, Hoeffler et al 2010;. Malter, Ray et al 2010;. Sharma, Hoeffler et al 2010), e gli esperimenti descritti nel capitolo 5.1 mostrano un legame tra l'attività di mTOR e PKM ζ . Infine, PKM ζ potrebbe giocare un ruolo anche nelle malattie psichiatriche, come disturbo post-traumatico da stress (PSTD). Lavori preliminari hanno dimostrato, infatti, (Cohen, Kozlovsky et al. 2010) che l'inattivazione di PKM ζ in varie zone cerebrali riduca i comportamenti PSTD-simil.

Pertanto, PKM ζ è un argomento molto interessante da sviluppare, e una conoscenza più completa della sua attività potrebbe produrre strumenti incredibilmente utili per comprendere meglio i meccanismi alla base della stabilizzazione sinaptica nel neuro sviluppo e del mantenimento della memoria nella vita adulta.

7 Bibliografia

Bibliografia

Abraham WC, Williams JM (2003) Properties and mechanisms of LTP maintenance. *Neuroscientist* 9:463-474.

Anderson WW, Collingridge GL.(2001) The LTP Program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. *J Neurosci Methods*. 108:71-83

Arico S, Pattingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P, Ogier-Denis E.(2002) Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem*. 277:27613-27621.

Aggleton JP, Keen S, Warbuton EC, Bussey TJ (1997) Extensive cytotoxic lesions involving both the rhinal cortices and area TE impair recognition but spare spatial alternation in the rat. *Brain Res Bull* 43:279-287.

Aggleton JP, Kyd RJ, Bilkey DK (2004) When is the perirhinal cortex necessary for the performance of spatial memory tasks? *Neurosci Biobehav Rev* 28:611-624.

Ahn S, Olive M, Aggarwal S, Krylov D, Ginty DD, Vinson C (1998) A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol* 18:967-977.

Balendran A, Biondi RM, Cheung PC, Casamayor A, Deak M, Alessi DR. (2000a) A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C ζ (PKC ζ) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J Biol Chem*. 275:20806-20813.

Balendran A, Hare GR, Kieloch A, Williams MR, Alessi DR. (2000b) Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett*. 484:217-223.

Barker GR, Bashir ZI, Brown MW, Warburton EC (2006a) A temporally distinct role for group I and group II metabotropic glutamate receptors in object recognition memory. *Learn Mem* 13:178-186.

Barker GR, Warburton EC, Koder T, Dolman NP, More JC, Aggleton JP, Bashir ZI, Auberson YP, Jane DE, Brown MW (2006b) The different effects on recognition memory of perirhinal kainite and NMDA glutamate receptor antagonism: implications for underlying plasticity mechanisms. *J Neurosci* 26:3561-35966.

Barria A, Derkach V, Soderling T (1997) Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-

amino-3-hydroxyl-5-metyl-4-isoxazole-proprionate-type glutamate receptor. *J Biol Chem* 272:32727-32730.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A Synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Manilow R (2006) Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 51:213-225.

Bortolotto ZA, Lauri S, Isaac JT, Collingridge GL (2003) Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:657-666.

Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S, Laroche S. (2003) MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:805-14.

Brown GP, Blitzer RD, Connor JH, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM (2000) Long-term potentiation induced by theta frequency stimulation is regulated by a protein phosphatase-1-operated gate. *J Neurosci* 20:7880-7887.

Brown GP, Aggleton JP (2001) Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2:51-61.

Buckley MJ (2005) The role of perirhinal cortex and hippocampus in learning, memory, and perception. *Q J Exp Psychol B* 58:246-268.

Burwell RD, Witter MP, Amaral DG (1995) Perirhinal and Postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5: 390-408.

Burwell RD, Amaral DG (1998a) Perirhinal and Postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 391:293-321.

Burwell RD, Amaral DG (1998b) Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol*, 398: 179-205.

Burwell RD (2001) Borders and cytoarchitecture of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat, *J Comp Neurol* 437: 17-41.

Bussey TJ, Muir JL, Aggleton JP (1999) Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. *J Neurosci* 19:495-502.

Bussey TJ, Duck J, Muir JL, Aggleton JP (2000) Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transaction or neurotoxic lesions

of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behav Brain Res* 111:187-202.

Castillo PE, Janz R, Sudhof TC, Tzonopoulos T, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 338: 590-593.

Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Shaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 334:33-46.

Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:952-962.

Corodimas KP, Le Doux JE (1995) Disruptive effects of posttraining perirhinal cortex lesions on conditioned fear: contributions of contextual clues. *Behav Neurosci* 109:613-619.

Deacon TW, Eichenbaum H, Rosenberg P, Eckmann KW (1983) Afferent connections of the perirhinal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 220:168-190.

Dix SL, Aggleton JP (1999) Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object location and object-context recognition. *Behav Brain Res* 99:191-200.

Dong LQ, Zhang RB, Langlais P, He H, Clark M, Zhu L, Liu F. (1999) Primary structure, tissue distribution, and expression of mouse phosphoinositide-dependent protein kinase-1, a protein kinase that phosphorylates and activates protein kinase C ζ . *J Biol Chem*. 274:8117-8122.

Eichenbaum H (1999) The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res* 103:123-133.

Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP (1996) Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. *Behav Brain Res* 80:9-25.

Ennaceur A, Aggleton JP (1997) The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behav Brain Res* 88:181-193.

Ennaceur A, Delacour J (1998) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioural data. *Behav Brain Res* 31:47-59.

Fortin NJ, Wright SP, Eichenbaum H (2004) Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature* 431:188-191.

Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the

dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38:447-460.

Gaffan D, Parker A (1996) Interaction of perirhinal cortex with the fornix-fimbria: memory for objects and "object-in-place" memory. *J Neurosci* 16:5864-5869.

Henze DA, Urban NN, Barrionuevo G (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98:407-427.

Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, Libien JM, Weinstein G, Tcherapanov A, Sacktor TC. (2003) Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J Biol Chem.* 278:40305-40316.

Hayashi T, Mo JH, Gong X, Rossetto C, Jang A, Beck L, Elliott GI, Kufareva I, Abagyan R, Broide DH, Lee J, Raz E.(2007) 3-Hydroxyanthranilic acid inhibits PDK1 activation and suppresses experimental asthma by inducing T cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:18619-18624.

Hoeffler, C. A. and E. Klann (2010). "mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease." *Trends Neurosci* 33(2): 67-75.

Kelly A, Mullany PM, Lynch MA (2000) Protein synthesis in entorhinal cortex and long-term potentiation in dentate gyrus. *Hippocampus* 10:431-7.

Kelly MT, Crary JF, Sacktor TC.(2007) Regulation of protein kinase Mzeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation. *J Neurosci* 27:3439-3444.

Kemp N, Bashir ZI (2001) Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. *Prog Neurobiol* 65:339-365.

Kim CH, Lisman JE (2001) A labile component of AMPA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on microtubule motors, actin, and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J Neurosci* 21:4188-4194.

Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, Fowble JW, Ward PJ, Chen CS.(2004) 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64:1444-1451.

Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. (1998) Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 281:2042-2045.

Lauri SE, Bortolotto ZA, Bleakman D, Ornstein PL, Lodge D, Isaac JT, Collingridge GL (2001) A critical role of facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron* 32:697-709.

Lauri SE, Bortolotto ZA, Nistico R, Bleakman D, Ornstein PL, Lodge D, Isaac JT, Collingridge GL (2003) A Role for Ca^{2+} stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 39:327-341.

Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Hyman RL (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405:955-959.

Ling DS, Bernardo LS, Serrano PA, Blace N, Kelly MT, Crary JF, Sacktor TC (2002) Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat Neurosci* 5:295-296.

Ling DS, Bernardo LS, Sacktor TC (2006) Protein kinase Mzeta enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors. *Hippocampus* 16:443-52.

Lisman J (2003) Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:829-842

Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.

Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.

Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.

Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, Molnar E, Collingridge GL, Bashir ZI. (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24(36):7821-7828.

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.

McCormack, S. G., R. L. Stornetta, et al. (2006). "Synaptic AMPA receptor exchange maintains bidirectional plasticity." *Neuron* 50(1): 75-88.

Mellor J, Nicoll RA (2001) Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium, *Nat Neurosci* 4:125-126.

Meunier M, Bachevalier J, Mishkin M, Murray EA (1993) Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. *J Neurosci* 13:5418-5432.

Meunier M, Hadfield W, Bachevalier J, Murray ES (1996) Effects of rhinal cortex lesions combined with hippocampectomy on visual recognition memory in rhesus monkey. *J Neurophysiol* 75:1190-1205.

Mesulam MM (1998) From sensation to cognition. *Brain* 121 (pt. 6):1013-1052.

Migues, P. V., O. Hardt, et al. (2010). "PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking." *Nat Neurosci* 13(5): 630-634.

Mishkin M, Delancour J (1975) An analysis of short-term visual memory in the monkey. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 1:326-334.

Miyamoto E (2006) Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci* 100:433-442.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776

Morris RG (2003) Long-term potentiation and memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:643-647.

Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. (1995). PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 14:1961–1969.

Mumby DG, Pinel JP (1994) Rhinal cortex lesions and object recognition in rats. *Behav Neurosci* 108:11-18.

Murray EA, Baxter MG, Gaffan D (1998) Monkeys with rhinal cortex damage or neurotoxic hippocampal lesions are impaired on spatial scene learning and object reversals. *Behav Neurosci* 112:1291-1303.

Murray EA, Graham KS, Gaffan D (2005) Perirhinal cortex and its neighbours in the medial temporal lobe: contributions to memory and perception. *Q J Exp Psychol B* 58:378-396.

Naik MU, Benedikz E, Hernandez I, Libien J, Hrabe J, Valsamis M, Dow-Edwards D, Osman M, Sacktor TC.(2000). Distribution of protein kinase Mzeta and the complete protein kinase C isoformfamily in rat brain. *J Comp Neurol.* 426:243-258

Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH. (1993). Activation of the ζ isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 268:13–16.

Nemanic S, Alvarado MC, Bachevalier J (2004) The hippocampal/parahippocampal regions and recognition memory: insights from visual paired comparisons versus object-delayed nonmatching in monkeys. *J Neurosci* 24:2013-2026.

Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.

Nishizuka Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular recognition. *Nature* 334:661–665.

Nishizuka Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9:484–496.

Osten P, Hrabetova S, Sacktor TC. (1996) Differential downregulation of protein kinase C isoforms in spreading depression. *Neurosci Lett.* 221:37-40.

Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313:1141-1144.

Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th Edition. San Diego: Academic Press.

Pittenger C, Huang YY, Paletzky RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER (2002) Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* 34: 447-462.

Reymann KG, Frey JU (2007) The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late associativity' and implications. *Neuropharmacology* 52:24-40.

Rumpel S, LeDoux J, Zador A, Manilow R (2005) Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308:83-88.

Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E. (1993) Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:8342-8346.

Sacktor, T. C. (2010). "PINing for things past." *Sci Signal* 3(112): pe9.

Sacktor, T. C., P. Osten, et al. (1993). "Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8342-8346.

Sanna PP, Cammalleri M, Berton F, Simpson C, Lutjens R, Bloom FE, Francesconi W (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the

expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci* 22:3359-3365.

Scharf MT, Woo NH, Lattal KM, Young JZ, Nguyen PV, Abel T. (2002) Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training. *J Neurophysiol.* 87:2770-7.

Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. (2007) Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 317:951-953.

Serrano P, Yay Y, Sacktor TC (2005) Persistent phosphorylation by protein kinase M Zeta maintains late-phase long-term potentiation. *J Neurosci* 23:9220-9228.

Sigurdsson T, Doyere V, Cain CK, Ledoux JE (2007) Long-term potentiation in the amygdale: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* 52:215-227.

Sudhof TC (2004) The Synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.

Suzuki WA, Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1993) Lesions of the perirhinal and parahippocampal cortices in the monkey produce long-lasting memory impairment in the visual and tactual modalities. *J Neurosci* 3:2430-2451.

Tulving E, Schacter DL, McLachlan DR, Moscovitch M. (1998) Priming of semantic autobiographical knowledge: a case study of retrograde amnesia. *Brain Cogn* 8:3-20.

Wan H, Aggleton JP, Brown MW (1999) Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci* 19:1142-1148.

Wan H, Warburton EC, Zhu XO, Koder TJ, Park Y, Aggleton JP, Cho K, Bashir ZI, Brown MW (2004) Benzodiazepine impairment of perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Eur J Neurosci* 20:2214-2224.

Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, Barker GR, Aggleton JP, Bashir ZI, Brown MW (2003) Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron* 38:987-996.

Warburton EC, Glover CP, Massey PV, Wan H, Johnson B, Bienemann A, Deuschle U, Kew JN, Aggleton JP, Bashir Zi, Uney J, Brown MW (2005) cAMP responsive element-binding protein phosphorylation is necessary for perirhinal long-term potentiation and recognition memory. *J Neurosci* 25:6296-6303.

Westmark, P. R., C. J. Westmark, et al. (2010). "Pin1 and PKMzeta sequentially control dendritic protein synthesis." *Sci Signal* 3(112): ra18.

Wiig KA, Bilkey DK (1994) The effects of perirhinal cortical lesions on spatial reference memory in the rat. *Behav Brain Res* 63:101-109.

Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ (2004) Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 24:5901-5908.

Winters BD, Bussey TJ (2005) Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* 25:4243-4251.

Yasuda H, Barth AL, Stellwagen D, Malenka RC (2003) A developmental switch in the signalling cascades for LTP induction. *Nat Neurosci* 6:15-16.

Yeckel MF, Kapur A, Johnston D (1999) Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism. *Nat Neurosci* 6:15-16.

Zhu XO, Brown MW, McCabe BJ, Aggleton JP (1995) Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in rat brain. *Neuroscience* 69:821-829.

Ziakopoulos, Z., C. W. Tillett, et al. (1999). "Input-and layer-dependent synaptic plasticity in the rat perirhinal cortex in vitro." *Neuroscience* 92(2): 459-472.