

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE E DIPARTIMENTO DI
BIOLOGIA SPERIMENTALE



SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE E
SCIENZE MORFOLOGICHE

CORSO DI DOTTORATO IN NEUROSCIENZE
CICLO XXIII

Area05 - Scienze Biologiche – SSD BIO/14 Farmacologia

Coordinatore: Prof.ssa Alessandra Concas

Effetti dell'isolamento sociale sull'assunzione di
etanolo e sulla plasticità neuronale del recettore
GABA_A nell'ippocampo di topi C57BL/6J

Tutor:

Prof. Paolo Follesa

Dottorando:

Dott. Pierluigi Olla

Direttore della Scuola:

Prof. Giovanni Biggio

Indice

1. Introduzione	1
1. Introduzione all'isolamento sociale	1
1.1. Isolamento sociale e steroidi neuroattivi	1
1.2. Isolamento sociale e recettore GABA _A	2
1.3. Isolamento sociale ed etanolo	3
2. Il sistema GABAergico	3
2.1. Generalità, biosintesi e metabolismo del GABA	3
2.2. Recettori GABA _A	5
2.2.1. Struttura molecolare e funzionalità	5
2.2.2. Localizzazione e distribuzione	7
2.2.3. Farmacologia	7
2.2.4. Recettori GABA _A extrasinaptici e subunità δ	10
2.3. Recettori GABA _B	12
2.3.1. Struttura molecolare e funzionalità	12
2.3.2. Farmacologia	13
2.4. Steroidi e trasmissione GABAergica	14
3. Etanolo	15
3.1. Struttura chimica	15
3.2. Uso ricreativo	16
3.3. Farmacologia	16
3.3.1. Sindrome da astinenza da alcol	17
3.4. Uso clinico	19
3.5. Meccanismo d'azione	19
3.5.1. Effetti sul SNC	19
3.5.2. Regolazione dell'espressione genica	21
3.5.3. Etanolo e recettori GABA _B	23
3.5.4. Etanolo e neurosteroidi	24
2. Obiettivi	26
3. Materiali e metodi	27
1. Animali	27
2. Protocollo sperimentale del free choice drinking	27
3. Misurazione dei livelli di mRNA	28
3.1. Preparazione dei cloni di cDNA	28
3.2. Trasformazione batterica e amplificazione del vettore plasmidico	29
3.3. Isolamento e purificazione dei plasmidi	31
3.4. Sequenziamento	33
3.5. Linearizzazione plasmidica	33
3.6. Preparazione delle sonde di cRNA marcate	34
3.7. Estrazione dell'RNA totale dall'ippocampo di topo	35
3.8. Analisi quali-quantitativa dell'RNA totale estratto	37
3.9. Ibridazione delle sonde di cRNA marcato con l'RNA totale estratto	37
3.10. Saggio dell'RNA protetto da RNasi (RPA)	38

3.11.	Separazione degli ibridi cRNA-mRNA per mezzo dell'elettroforesi su gel di poliacrilamide	41
3.12.	Autoradiografia e analisi d'immagine	42
4.	Analisi statistica	43
4.	Risultati	44
1.	Effetti dell'isolamento sociale sul consumo volontario di etanolo in topi socialmente isolati e in gruppo	44
1.1.	Analisi del consumo di acqua ed etanolo per animale singolo	44
1.2.	Analisi della preferenza al consumo di etanolo	44
2.	Effetti dell'isolamento sociale e del consumo volontario di etanolo sulle modificazioni dell'espressione genica delle subunità α_1 , α_4 e δ del recettore GABA _A nell'ippocampo	45
2.1.	Analisi dei livelli degli mRNA codificanti per le subunità α_1 e α_4	45
2.2.	Analisi dei livelli degli mRNA codificanti per la subunità δ	46
5.	Discussione	47
1.	Isolamento sociale e sensibilità all'etanolo	47
1.1.	Steroidi neuroattivi	47
1.2.	StAR	47
1.3.	Funzionalità del recettore GABA _A	48
1.4.	Studi comportamentali	49
2.	Effetti cronici dell'etanolo e isolamento sociale	50
2.1.	Steroidi neuroattivi	50
2.2.	Plasticità e funzionalità del recettore GABA _A	51
3.	Conclusioni	52
6.	Bibliografia	58
7.	Figure e tabelle	68

1. Introduzione

1. INTRODUZIONE ALL'ISOLAMENTO SOCIALE

L'isolamento sociale è una condizione estremamente stressante per gli animali abituati a vivere in gruppo ed è per questo che viene considerato un valido modello sperimentale che induce dei cambiamenti comportamentali e altera le concentrazioni plasmatiche di steroidi neuroattivi. Molti autori considerano l'isolamento sociale un modello animale di depressione i cui sintomi vengono alleviati dal trattamento con farmaci antidepressivi (Willner, 1984). I roditori isolati mostrano comportamenti aggressivi, neofobici, e risultano essere avversi alla manipolazione da parte dell'uomo. Assumono un comportamento aggressivo (in particolare morsi e graffi) quando vengono messi a contatto con animali di gruppo (Wongwitdecha e Marsden, 1996), e manifestano un'aumentata attività esploratoria e locomotoria in risposta a nuove situazioni ambientali (Hilakivi et al., 1989; Varty et al., 2000). Inoltre, nei test comportamentali quali *plus-maze*, *light-dark* ed esplorazione *head-dipping*, gli animali isolati mostrano un comportamento simile alla paura (Parker e Morinan, 1986; Hilakivi et al., 1989; Voikar et al., 2005).

1.1. Isolamento sociale e steroidi neuroattivi

L'osservazione che la surrenectomia negli animali riduce i livelli cerebrali di steroidi neuroattivi (Purdy et al., 1991) e abolisce completamente l'aumento delle loro concentrazioni nel plasma e nel cervello dei ratti sottoposti a stress acuto (Barbaccia et al., 1997), suggerisce che la sintesi periferica degli steroidi neuroattivi abbia un ruolo molto importante nel sostenere i loro livelli. E' dunque possibile che una riduzione dell'attività dell'asse ipotalamo ipofisi surrene (*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA) possa essere responsabile della riduzione dei livelli di steroidi neuroattivi osservata negli animali isolati. E' noto che vari tipi di stress cronico, incluso l'isolamento sociale, aumentano il rilascio di CRF (Rivier e Vale, 1987; De Goeij et al., 1991; Ojima et al., 1995) e

aumentano i livelli di mRNA che codifica per il CRF nel cervello di ratto (Makino et al., 1995; Albeck et al., 1997). Inoltre, la somministrazione intracerebroventricolare di CRF induce nel ratto un comportamento conflittuale (Britton et al., 1986) simile a quello mostrato dai ratti isolati. Dal momento che l'esposizione prolungata al CRF riduce il rilascio di ACTH in colture di cellule pituitarie (Hoffman et al., 1985), è ipotizzabile che la riduzione della sintesi di steroidi neuroattivi negli animali isolati sia dovuta ad una riduzione dei livelli circolanti di ACTH. Come detto precedentemente, l'attivazione dell'asse HPA ha un ruolo importante nel determinare un aumento dei livelli di steroidi neuroattivi in seguito ad uno stress acuto (Barbaccia et al., 1997); durante lo stress cronico si sviluppa una "facilitatory trace" caratterizzata da una ipersensibilità dell'asse HPA (Akana et al., 1999).

1.2. Isolamento sociale e recettore GABA_A

La riduzione delle concentrazioni degli steroidi neuroattivi nel cervello degli animali isolati è associata ad una riduzione della trasmissione GABAergica. Infatti, l'isolamento sociale altera, a livello del recettore GABA_A, l'accoppiamento funzionale tra il sito del GABA e quello dei modulatori allosterici positivi e negativi, benzodiazepine e β -carboline, rispettivamente. Un possibile meccanismo attraverso il quale lo stress cronico determinato dall'isolamento sociale induce una "down regulation" della trasmissione GABAergica potrebbe essere una modificazione della conformazione del recettore GABA_A in seguito a variazione nell'espressione delle specifiche subunità che lo compongono. Infatti è stato dimostrato che variazioni fisiologiche o farmacologiche delle concentrazioni di steroidi neuroattivi nel cervello di ratto, come quelle che si hanno durante la gravidanza, inducono una selettiva modulazione della funzione e dell'espressione delle diverse subunità che compongono il recettore GABA_A in diverse aree cerebrali (Fenelon e Herbison, 1996; Concas et al., 1998; Follesa et al., 1998; Smith et al., 1998a,b). Queste osservazioni suggeriscono che gli steroidi neuroattivi hanno un ruolo importante nella modulazione della trasmissione GABAergica. Un'altra evidenza sperimentale ha dimostrato che l'isolamento sociale incrementa i livelli di espressione genica delle subunità α_4 e δ del recettore GABA_A nell'ippocampo di ratto (Serra et al., 2006).

1.3. Isolamento sociale ed etanolo

I ratti sottoposti ad isolamento sociale rispondono in maniera differente ad una varietà di sostanze psicoattive, incluso l'etanolo, rispetto agli animali di controllo (Paivarinta, 1990; Lapid et al., 2001). Per esempio, è stato visto che la separazione dei ratti durante il periodo dell'adolescenza ed in età adulta porta ad un incremento del consumo volontario di etanolo (Schenk et al., 1990; Wolffgramm, 1990; Juarez e Vasquez-Cortes, 2003; Thorsell et al., 2005). Tali risultati suggeriscono che uno stress cronico, come l'isolamento sociale, potrebbe indurre dei cambiamenti adattativi a livello della plasticità neuronale che si traducono in comportamenti vulnerabili all'abuso di alcol. In accordo, l'isolamento sociale aumenta la sensibilità dell'asse HPA all'etanolo. Numerosi studi hanno dimostrato che l'asse HPA viene stimolato dall'etanolo (Rivier et al., 1996); la somministrazione acuta di etanolo aumenta i livelli di CRF e ACTH (Rivier et al., 1984), un effetto che si traduce in un repentino aumento delle concentrazioni plasmatiche e cerebrali di vari steroidi, inclusi il progesterone, l'allopregnanolone e il THDOC (Rivier et al., 1984; Barbaccia et al., 1999; VanDoren et al., 2000).

2. IL SISTEMA GABAERGICO

2.1. Generalità, biosintesi e metabolismo del GABA

Nel SNC l'acido γ -aminobutirrico (GABA) è il principale mediatore della neurotrasmissione GABAergica inibitoria del cervello dei mammiferi e le sinapsi GABAergiche regolano numerose funzioni comportamentali e della sfera emozionale.

L'identificazione del GABA e il riconoscimento della sua presenza all'interno del cervello dei vertebrati avvenne nel 1950, indipendentemente per merito di Awapara e di Roberts e Frankel. Solo alcuni anni dopo fu suggerito che il GABA potesse avere un'azione inibitoria a livello di differenti strutture nervose. Ulteriori studi permisero di classificare il GABA come un aminoacido che nel SNC dei mammiferi ha funzione di neurotrasmettitore, cioè una sostanza prodotta dalle cellule nervose e da queste liberata nello spazio sinaptico per trasmettere un messaggio (in questo caso inibitorio) ad altre cellule nervose vicine.

Il GABA viene sintetizzato da specifici neuroni a partire dall'acido L-glutammico in un'unica reazione (figura 1) catalizzata dall'acido L-glutammico

decarbossilasi (GAD), enzima espresso nei neuroni che utilizzano il GABA come neurotrasmettitore. La maggior parte del GABA e del glutammato derivano dalle riserve di glutammina presenti nelle cellule gliali. La principale fonte di glutammina e di acido glutammico, e quindi di GABA, è il glucosio: infatti nel ciclo di Krebs uno dei prodotti del metabolismo del glucosio è l'acido α -chetoglutarico, che viene convertito in acido L-glutammico mediante l'enzima GABA- α -chetoglutariltransaminasi (GABA-T).

Il GABA è presente in concentrazione millimolare in molte regioni del cervello e viene liberato sia spontaneamente che in seguito a stimolazione nervosa. Una volta sintetizzato il GABA viene immagazzinato nelle vescicole sinaptiche, presenti nella porzione terminale degli assoni. L'accumulo vescicolare di GABA avviene mediante un trasportatore specifico che utilizza come fonte di energia sia il gradiente elettrico che il pH presente tra il lume vescicolare e il citoplasma, generato dalla H-ATPasi (pompa protonica) vescicolare. Una volta liberato, il GABA diffonde nello spazio sinaptico e interagisce con specifici recettori di membrana pre- e post-sinaptici.

L'azione del GABA si esplica secondo due diverse modalità: in primo luogo esso viene rilasciato da una vasta gamma di diversi interneuroni localizzati in distinte nicchie spazio-temporali all'interno dei circuiti neuronali; inoltre, i differenti effetti fisiologici indotti dal GABA vengono poi trasmessi attraverso una grande varietà di recettori. Per esempio, la componente veloce della trasmissione inibitoria GABAergica viene mediata dai recettori ionotropici per il GABA, mentre l'inibizione sinaptica lenta è mediata attraverso i recettori metabotropici per il GABA, che sono accoppiati a proteine G eteromeriche. La trasmissione GABAergica viene quindi mediata da due tipi di recettori al GABA; e in una sinapsi GABAergica i diversi recettori per il GABA si trovano generalmente co-localizzati. Questi recettori vengono convenzionalmente denominati: GABA_A e GABA_B (vedere paragrafi successivi).

Il GABA viene degradato dall'enzima GABA-T, che lo deamina a semialdeide succinica (SSA). La riduzione della SSA da parte dell'enzima neuronale semialdeide succinica reductasi porta alla formazione di acido γ -idrossibutirrico (GHB). Solo l'1-2% del flusso metabolico che parte dal GABA segue però la via riduttiva che porta al GHB: infatti la maggior parte della SSA, ad opera di una semialdeide-succinico-deidrogenasi NAD-dipendente, viene ossidata ad acido

succinico che rientra nel ciclo di Krebs ma non viene riconvertito in acido L-glutammico nei neuroni. Viceversa il GABA recuperato dalle cellule gliali viene completamente metabolizzato e convertito in L-glutamina: infatti il GABA, trasformato in SSA dal GABA-T, entra nel ciclo di Krebs come acido succinico dove viene convertito in acido α -chetoglutarico, che può essere ritrasformato in acido L-glutammico e L-glutamina, la quale verrà trasferita nei terminali nervosi e trasformata dall'enzima glutamminasi in acido L-glutammico per la sintesi di nuovo GABA. GABA-T e semialdeide succinica si trovano sempre legati ai mitocondri non solo nell'assone terminale ma anche nelle strutture postsinaptiche o nelle cellule gliali.

2.2. Recettori GABA_A

2.2.1. Struttura molecolare e funzionalità

I recettori GABA_A mediano l'azione inibitoria veloce (minore di 100 millisecondi), sono recettori eteropentamerici, costituiti pertanto dall'assemblaggio di cinque diverse subunità proteiche che formano un canale ionico (figure 2 e 3), e vengono attivati ogni volta che due molecole di GABA interagiscono sui loro siti specifici. Su tale complesso recettoriale sono presenti anche altri siti di legame specifici per altre molecole di notevole importanza farmacologica capaci di modularne la funzione, quali, per esempio, le benzodiazepine e i barbiturici.

Il recettore GABA_A è il principale sito di interazione del neurotrasmettitore GABA attraverso il quale i neuroni mediano la loro azione inibitoria. La risposta inibitoria indotta dall'attivazione del recettore GABA_A si attua attraverso meccanismi pre- e post-sinaptici: l'inibizione postsinaptica è tipica dei neuroni encefalici (cellule corticali, cerebellari, ippocampali, ecc.) e avviene attraverso una iperpolarizzazione, mentre l'inibizione presinaptica, presente a livello del midollo spinale, si esplica sotto forma di sinapsi asso-asoniche GABAergiche inibitorie che modulano la funzione eccitatoria dei motoneuroni.

L'azione inibitoria veloce del GABA indotta dall'attivazione dei recettori GABA_A determina un aumento della conduttanza allo ione cloruro. La maggiore concentrazione di cloro che viene a crearsi all'interno della cellula crea uno stato di iperpolarizzazione della membrana che si traduce in un aumento della soglia di eccitabilità, con conseguente riduzione della probabilità che un potenziale d'azione possa avere inizio. Dal punto di vista meccanicistico,

l'aumentata permeabilità di membrana agli ioni cloro è associata ad un incremento del tempo medio di apertura del canale al cloro indotto dalla interazione del GABA, presente nello spazio sinaptico, con i recettori GABA_A.

I recettori GABA_A fanno parte della superfamiglia di recettori canale e sono strutture macromolecolari complesse composte dalla combinazione di diverse subunità proteiche strettamente correlate che si assemblano a formare un canale permeabile allo ione cloruro.

La famiglia dei recettori GABA_A include almeno 19 diversi geni nell'uomo. Ciascun recettore funzionale è costituito da un pentamero di differenti subunità, il che permette un codice combinatorio di possibili sottotipi di recettori GABA_A le cui proprietà biofisiche e farmacologiche sono dipendenti dalla composizione in subunità.

Le subunità fino ad oggi clonate hanno un peso molecolare compreso fra 46 e 67 kDa, sono state raggruppate in classi denominate con le lettere dell'alfabeto greco (α , β , γ , δ , ϵ , π , ρ , θ) e presentano una struttura comune caratterizzata dalla presenza di quattro domini transmembranalmente ad α -elica. All'interno di ogni classe esistono diverse isoforme che presentano circa il 70% di omologia nella loro sequenza. Queste comprendono 6 subunità di tipo α , 3 β , 3 γ , 1 δ , 1 ϵ , 1 π , 3 ρ , e 1 θ le quali, assemblandosi in modo diverso, possono teoricamente generare un elevato numero di differenti sottotipi di recettori GABA_A con profili farmacologici differenti.

L'eterogeneità è aumentata ulteriormente dallo *splicing* alternativo degli esoni del pre-mRNA, dal quale hanno origine due isoforme della subunità γ_2 a partire dallo stesso gene (Whiting et al., 1990): tali isoforme sono indicate come γ_{2L} (*long*) e γ_{2S} (*short*), e differiscono per la presenza o meno di piccoli peptidi localizzati nel *loop* intracellulare che unisce i domini transmembranalmente TM3 e TM4.

Nonostante ciò, nel SNC dei mammiferi la maggior parte dei recettori GABA_A è costituita da una combinazione di subunità α e β assemblate per formare il pentamero con una o più subunità γ , δ , o ϵ . Fanno eccezione alcuni recettori GABA_A presenti nella retina (inizialmente denominati GABA_C) che presentano una struttura omomericamente di subunità ρ .

2.2.2. Localizzazione e distribuzione

Studi sulla distribuzione delle subunità del recettore GABA_A nelle diverse aree cerebrali hanno dimostrato che ogni subunità ha una distribuzione peculiare (Wisden et al., 1992; Laurie et al., 1992); vi sono subunità più o meno ubiquitarie, come la α_1 , e subunità localizzate solo in specifiche regioni del cervello come la α_6 , presente solo nelle cellule granulari del cervelletto. Questi studi hanno anche evidenziato che alcune popolazioni neuronali esprimono quasi tutte le subunità del recettore GABA_A mentre altre popolazioni neuronali presentano solo alcune subunità. La combinazione $\alpha_1/\beta_n/\gamma_2$ costituisce il sottotipo di recettore GABA_A più espresso nel SNC dei mammiferi.

La diversa composizione in subunità nei diversi sottotipi recettoriali è regolata dall'espressione di specifici geni. Come spesso accade per subunità diverse di uno stesso recettore, gruppi di geni codificanti alcune subunità del recettore GABA_A sono localizzati su uno stesso cromosoma (tabella 1). Per esempio, i geni codificanti per le subunità α_1 , β_2 , e γ_2 , formano il sottotipo recettoriale BZ1 e sono raggruppati nel cromosoma 5 umano, i geni α_2 , β_1 e γ_1 sono sul cromosoma 4 e i geni α_5 , β_3 , e γ_3 sul cromosoma 15. Queste evidenze suggeriscono una certa forma di regolazione coordinata per la trascrizione di gruppi co-localizzati di geni. Tuttavia, questa regola non è sempre valida, come nel caso dei recettori $\alpha_3\beta\gamma_2$, in cui il gene α_3 è localizzato sul cromosoma X, differente da quello su cui è localizzato il gene γ_2 . Nell'uomo, infine, il gene codificante per la subunità δ è situato nel cromosoma 1 e non è co-localizzato con altri geni codificanti per altre subunità del recettore GABA_A: in accordo con ciò la regolazione della sua espressione sembra essere indipendente da quella dei geni per le altre subunità, e la presenza della subunità δ conferirebbe ai recettori caratteristiche peculiari (vedere paragrafo 2.2.4.).

2.2.3. Farmacologia

I recettori GABA_A costituiscono un bersaglio selettivo per numerose classi di farmaci attivi sul SNC, tra cui gli ansiolitici, i sedativo-ipnotici, gli anestetici generali, gli anticonvulsivanti e i mio-rilassanti. In accordo con ciò, il recettore GABA_A include sei principali domini di legame per molecole endogene o esogene che possono modulare in maniera positiva o negativa l'attività del GABA. Questi domini di legame includono siti localizzati all'interno o vicini al

canale al cloro come per esempio quelli per il GABA, localizzato nell'interfaccia tra le subunità α e β ; per le benzodiazepine, localizzato nell'interfaccia tra le subunità α e γ ; per i barbiturici, all'interno del canale al cloro, nei domini transmembranalmente TM2 e TM3; per altre molecole, come la picrotossina e gli steroidi. Questi domini di legame modulano la risposta recettoriale quando questa è stimolata dal GABA.

La subunità γ , necessaria per il potenziamento dell'azione del GABA da parte delle benzodiazepine (Olsen e Tobin, 1990; Macdonald e Olsen, 1994), permette a tali farmaci di indurre i loro tipici effetti farmacologici (Pritchett et al., 1989). Sullo stesso sito si possono legare oltre alle benzodiazepine anche altri composti non benzodiazepinici fra cui le imidazopiridine (zolpidem) e le pirazolopirimidine (zaleplon).

Infatti, come accennato precedentemente, ciascuna subunità proteica può potenzialmente determinare la specifica funzione fisiologica e farmacologica del recettore GABA_A (Macdonald e Olsen, 1994; Barnard et al., 1998; Pritchett et al., 1989): per esempio, l'assenza o la presenza di particolari isoforme della subunità α conferisce a tali recettori una certa selettività per alcuni farmaci come zaleplon e zolpidem (Barnard et al., 1998). Tanto è vero che lo zaleplon, *in vitro*, a basse concentrazioni presenta come profilo farmacologico una grande affinità per il sito di legame delle benzodiazepine dei recettori contenenti la subunità α_1 (Sanna et al., 2002, 2003).

Studi di biologia molecolare hanno permesso così di associare ad alcune subunità del complesso recettoriale GABA_A un possibile differente ruolo fisiologico o farmacologico (Barnard et al., 1998; Mehta e Ticku, 1999); anche diversi esperimenti condotti sull'espressione di recettori ricombinanti costituiti da diverse combinazioni di differenti subunità hanno dimostrato che le proprietà farmacologiche del recettore, inclusa la sensibilità alle benzodiazepine e all'alcol, sono influenzate dalla composizione in subunità (Pritchett et al., 1989; Wafford et al., 1991).

Diverse subunità di tipo α mediano le distinte azioni farmacologiche delle benzodiazepine: la subunità α_1 media l'effetto sedativo-ipnotico (Rudolph et al., 1999), la subunità α_2 media l'effetto ansiolitico e in parte quello miorilassante (Low et al., 2000) e la subunità α_4 sembra invece essere importante nel mediare la trasmissione GABAergica in alcune condizioni fisiologiche (Smith et

al., 1998a) o farmacologiche (Follesa et al., 2000) associate a brusche variazioni nei livelli di neurosteroidi. La subunità α_4 risulta inoltre aumentata dopo brusca sospensione di un trattamento cronico con benzodiazepine (Follesa et al., 2001), con imidazopiridine o pirazolopirimidine (Follesa et al., 2002), o con etanolo, sia *in vitro* (Follesa et al., 2003) che *in vivo* (Grobin et al., 1998; Cagetti et al., 2003). Inoltre recettori ricombinanti contenenti la subunità α_4 legano con elevata affinità agonisti del GABA quali il muscimolo o l'antagonista flumazenil, ma molto debolmente le classiche benzodiazepine quali il diazepam (Wisden et al., 1991).

Anche altre sostanze, come ad esempio alcuni anestetici generali, l'etanolo e l'antibiotico penicillina, possono avere un effetto modulatore sui recettori GABA_A. In realtà per quanto riguarda gli anestetici generali e l'etanolo, che modulano positivamente il recettore GABA_A interagendo con alcune porzioni delle subunità proteiche che costituiscono il recettore, i siti di legame specifici non sono stati ancora identificati. Tuttavia è stato suggerito che nelle diverse subunità che costituiscono il complesso macromolecolare GABA_A esistano aminoacidi localizzati nei domini transmembranal TM2 e TM3 di cruciale importanza per la loro azione modulatoria. Per esempio alcuni anestetici volatili per poter interagire sul complesso recettoriale richiederebbero la presenza di una serina in posizione 270 nel TM2 e di una alanina in posizione 291 nel TM3 sulla subunità α_1 e di una serina in posizione 265 nel TM2 sulla subunità β_1 , e questi stessi aminoacidi sembrano essere importanti anche per l'azione modulatoria dell'etanolo. Per altri anestetici endovenosi, invece, sembra essere importante la presenza di un residuo di asparagina sempre in posizione 265 ma sulla subunità β_3 .

Anche gli steroidi neuroattivi, un'altra classe di modulatori positivi della trasmissione GABAergica, sembrano avere dei siti d'azione preferenziali sui recettori GABA_A. Alcuni steroidi endogeni (due metaboliti del progesterone: l'allopregnanolone e il tetraidrodeossicorticosterone o THDOC) o di sintesi (ganaxolone) inducono effetti simili a quelli dei barbiturici; infatti facilitano il legame del GABA e modulano allostericamente l'apertura del canale al cloro sia in presenza sia in assenza (solo ad alte concentrazioni) di GABA.

Studi più approfonditi dovranno essere condotti utilizzando, per esempio, linee di animali transgenici per chiarire il ruolo delle subunità β nel mediare l'azione

degli steroidi e dell'etanolo. È stato infatti recentemente dimostrato che i recettori ricombinanti $\alpha_4\beta_3\delta$ sono attivati da concentrazioni molto basse (1-3mM) di etanolo rispetto a quelle necessarie (>50mM) per attivare altri recettori ricombinanti. Inoltre, la sostituzione della subunità β_3 con la β_2 negli stessi recettori riduce di 10 volte la sensibilità all'azione dell'etanolo (Wallner et al., 2003). Studi eseguiti su topi *knock-out* per la subunità β_3 hanno confermato i risultati degli studi sui *knock-in* β_3 (N265M), mostrando una ridotta sensibilità agli anestetici, mentre i *knock-out* per la subunità δ mostrano una ridotta sensibilità per gli steroidi neuroattivi. L'utilizzo di topi *knock-out* ha suggerito che la subunità α_1 può influenzare l'effetto sedativo ipnotico di alcuni anestetici ma non dell'etanolo.

2.2.4. Recettori GABA_A extrasinaptici e subunità δ

Recentemente è stata dimostrata la presenza, all'interno di uno stesso neurone, di due distinte popolazioni di recettori GABA_A, localizzate rispettivamente a livello sinaptico ed extrasinaptico. L'attivazione transiente dei recettori GABA_A sinaptici è responsabile della tipica inibizione fasica mediata dal GABA, mentre l'attivazione continua dei recettori GABA_A extrasinaptici media un'inibizione di tipo tonico (Brickley et al., 1996; Mody 2001; Hamann et al., 2002; Nusser e Mody 2002; Semyanov et al., 2003, 2004). Un'ulteriore differenza tra questi due tipi di recettori è la loro composizione: alcune subunità, infatti, sono caratteristiche dei recettori sinaptici, come le subunità γ (Essrich et al., 1998); altre si trovano assemblate solamente nei recettori GABA_A extrasinaptici, come le subunità δ , mentre altre subunità si possono localizzare sia a livello sinaptico che extrasinaptico (Nusser et al., 1998).

Probabilmente l'inibizione tonica è determinata dal fatto che i recettori extrasinaptici contenenti la subunità δ possiedono un'affinità per il GABA circa 50 volte maggiore rispetto ai recettori che mancano della subunità δ (Saxena e Macdonald 1996; Brown et al., 2002), e possono così essere attivati anche da quantità minime di neurotrasmettitore che fuoriescono dalla sinapsi (*spillover*) e non vengono ricaptate dai trasportatori. In questo modo la cellula avrà una soglia d'attivazione maggiore, e sarà quindi meno probabile che possa generare un potenziale d'azione in risposta agli stimoli provenienti da altre cellule. Inoltre questi recettori hanno una ridotta velocità di desensitizzazione

(Saxena e Macdonald, 1994).

La differente affinità nei confronti del GABA può essere sfruttata per separare farmacologicamente l'inibizione tonica mediata dai recettori extrasinaptici da quella fasica mediata dai recettori sinaptici, utilizzando l'antagonista SR95531 (gabazina): a basse concentrazioni infatti la gabazina è in grado di bloccare solo l'inibizione di tipo fasico, mentre a concentrazioni superiori viene bloccata anche l'inibizione tonica (Stell e Mody, 2002).

I recettori GABA_A extrasinaptici presentano anche una maggiore sensibilità agli steroidi neuroattivi e all'agonista parziale 4,5,6,7 tetraidroisoxazolo-[5,4-c]piridin-3-olo o gaboxadolo (THIP) (Adkins et al., 2001; Brown et al., 2002; Wohlfarth et al., 2002) oltre che all'etanolo (Sundstrom-Poromaa et al., 2002; Wallner et al., 2003), rispetto ai recettori GABA_A contenenti la subunità γ . Quindi l'effetto modulatorio di alcuni steroidi neuroattivi sulla funzione del recettore GABA_A aumenta in modo marcato se nel recettore è presente la subunità δ (Adkins et al., 2001; Brown et al., 2002; Wohlfarth et al., 2002).

Inoltre è stato dimostrato che l'espressione di geni per recettori GABA_A extrasinaptici contenenti la subunità δ nell'ippocampo di ratto può essere alterata da agenti farmacologici come l'etanolo (Cagetti et al., 2003) che incrementano i livelli cerebrali di neurosteroidi (Morrow et al., 2001.; Sanna et al., 2004). Questi cambiamenti nell'espressione della subunità δ altererebbero le proprietà farmacologiche del recettore GABA_A, incrementandone la sensibilità all'etanolo (Sundstrom-Poromaa et al., 2002) e riducendone la sensibilità a benzodiazepine e steroidi (Cagetti et al., 2003).

I recettori GABA_A che contengono la subunità δ sono localizzati principalmente a livello extrasinaptico nelle cellule granulari di cervelletto e nei neuroni ippocampali del giro dentato e nelle cellule piramidali delle aree CA1 e CA3 (Sperk et al., 1997; Nusser et al., 1998; Pirker et al., 2000).

2.3. Recettori GABA_B

2.3.1. Struttura molecolare e funzionalità

I recettori GABA_B, che mediano l'inibizione sinaptica lenta (maggiore di 100 millisecondi), non sono associati a canali ionici ma sono recettori metabotropici accoppiati a proteine G inibitorie. Inoltre, dal punto di vista farmacologico, si differenziano dai recettori GABA_A perché sono attivati in maniera selettiva da un derivato del GABA, il β-4-cloro-fenil-GABA (baclofen) che non attiva i recettori GABA_A.

La struttura molecolare del recettore GABA_B è stata rivelata nel 1997 in seguito alla clonazione di due geni. Questi geni codificano per due proteine recettoriali denominate GABA_BR1 e GABA_BR2. Queste sono glicoproteine costituite da circa 950 aminoacidi e condividono fra loro il 35% d'identità e il 54% di similitudine. Ciascuna di queste proteine è inoltre presente, nel cervello dell'uomo e del ratto, come varianti multiple originate da meccanismi di maturazione alternativa dell'mRNA (*splicing*).

Come predetto dai precedenti studi neurochimici e farmacologici, i recettori GABA_BR1 e GABA_BR2 appartengono alla superfamiglia dei recettori metabotropici e possiedono, oltre alla tipica regione a 7 α-eliche transmembrana, anche un dominio ammino-terminale extracellulare molto esteso ed una coda carbossilica intracellulare. I recettori GABA_B presentano alcune peculiari caratteristiche che li rendono unici fra tutti i recettori metabotropici, infatti alcuni studi d'espressione di recettori GABA_B ricombinanti hanno permesso di stabilire che la forma strutturale pienamente funzionale che viene espressa sulla membrana neuronale è un eterodimero GABA_BR1-GABA_BR2.

I recettori GABA_B sono localizzati, a livello subcellulare, oltre che sui terminali presinaptici GABAergici (autorecettori), anche sui terminali non-GABAergici (eterorecettori) e a livello postsinaptico su dendriti e corpi cellulari non GABAergici.

L'attivazione del recettore GABA_B viene mediata da un accoppiamento con proteine G generalmente appartenenti alla famiglia G_{iα}/G_{oα} che sono sensibili alla tossina della pertosse (PTX), anche se in taluni casi, alcuni effetti presinaptici del baclofen appaiono essere PTX-insensibili. I meccanismi effettori associati al recettore GABA_B sono il sistema dell'adenilato ciclasi e i canali al

Ca²⁺ e al K⁺.

Gli agonisti del recettore GABA_B, come il baclofen, inibiscono entrambe le funzioni dell'adenilato ciclasi, basale e stimolata dalla forskolina, inducendo così un abbassamento dei livelli intracellulari di cAMP. Questo effetto può però essere bloccato dagli antagonisti selettivi del recettore GABA_B come il composto CGP54626. In seguito alla loro attivazione i recettori GABA_B inducono, nelle membrane neuronali, la diminuzione della conduttanza del Ca²⁺ ed un aumento della conduttanza del K⁺. L'effetto sulla conduttanza del Ca²⁺ sembra essere principalmente associato alle correnti presinaptiche mediate da canali al calcio di tipo P/Q ed N; perciò la riduzione dell'ingresso di Ca²⁺ nel terminale presinaptico attraverso questi canali voltaggio-dipendenti sembra essere il principale meccanismo attraverso il quale il recettore GABA_B è capace di regolare il rilascio di neurotrasmettitori. La modulazione della conduttanza del K⁺ è invece associata principalmente ai recettori GABA_B localizzati a livello postsinaptico; l'aumento della permeabilità al K⁺, e quindi la sua uscita dalla cellula, si traduce in un effetto iperpolarizzante della membrana, con conseguente innalzamento della soglia di eccitabilità della stessa cellula.

2.3.2. *Farmacologia*

Fra le molecole in grado di modulare la trasmissione GABA_B-ergica vi sono il baclofen e altre molecole da esso derivate, in cui la struttura è stata modificata per ottenere effetti modulatori più potenti sul recettore GABA_B. Tra gli effetti farmacologici più importanti degli agonisti del recettore GABA_B, quello miorilassante è quello più utilizzato dal punto di vista clinico.

Il faclofen, il saclofen e il 2-idrossisaclofen, derivati dal baclofen, sono stati i primi composti di sintesi ad azione antagonista sul recettore GABA_B. Anche se dotati di modesta affinità per i recettori GABA_B, essi, tuttavia, sono stati fondamentali strumenti d'indagine per la comprensione dei ruoli fisiologici e farmacologici di questi recettori. Anche se gli effetti degli antagonisti sono ancora poco esplorati sull'uomo, i risultati degli studi condotti sugli animali suggeriscono una potenziale utilità clinica come antiepilettici nelle assenze. In aggiunta, gli antagonisti del recettore GABA_B inducono un miglioramento delle performance cognitive in diversi test animali, mentre gli agonisti hanno un effetto opposto.

Per quanto riguarda le implicazioni terapeutiche del recettore GABA_B queste includono l'analgesia, alcune malattie psichiatriche, le tossicodipendenze, l'epilessia e la memoria.

Per quanto riguarda le tossicodipendenze il baclofen riduce sia l'assunzione di etanolo in soggetti etilisti che la ricerca compulsiva dell'alcol e riduce l'autosomministrazione di cocaina e oppiacei in animali da esperimento. Anche l'acido γ -idrossi-butirrico (GHB) legandosi a bassa affinità sul recettore GABA_B riduce ugualmente l'assunzione di etanolo.

2.4. Steroidi e trasmissione GABAergica

I due metaboliti neuroattivi del progesterone, 3 α -idrossi-5 α -pregnan-20-one (allopregnanolone o AP) e tetraidrodesossicorticosterone (THDOC), sono *in vitro* e *in vivo* tra i più potenti ed efficaci modulatori positivi dei recettori GABA_A. Studi elettrofisiologici eseguiti su recettori GABA_A clonati e nativi hanno dimostrato che questi composti facilitano la trasmissione GABAergica aumentando la frequenza e la durata d'apertura del canale allo ione Cl⁻ associato al recettore GABA_A. Il meccanismo d'azione molecolare, come già accennato, dipende dalla concentrazione di steroide: basse concentrazioni di ormone potenziano l'attività dello ionoforo al cloro attraverso una facilitazione allosterica dell'azione del GABA, mentre alte concentrazioni sono invece capaci di attivare direttamente il canale così come fanno i barbiturici.

La diversa composizione in subunità del recettore può inoltre alterare l'efficacia di alcuni steroidi. È di notevole importanza ricordare che alcuni derivati steroidei solfati (pregnenolone solfato, deidroepiandrosterone solfato), al contrario dei metaboliti del progesterone, inibendo la frequenza di apertura del canale allo ione cloro, modulano negativamente la funzione del recettore GABA_A. Infatti, la somministrazione di questi derivati a topi e ratti induce effetti ansiogenici e proconvulsivanti. Quest'ultima scoperta ha una notevole importanza in quanto dimostra l'esistenza di modulatori allosterici endogeni capaci di attivare o inibire il recettore GABA_A come fanno i farmaci ansiolitici (agonisti) e i farmaci ansiogenici (agonisti inversi). Questi ormoni sarebbero perciò una componente fondamentale dei meccanismi fisiologici rilevanti nel controllo dell'attività delle aree cerebrali coinvolte nella regolazione delle emozioni e più in generale dell'eccitabilità neuronale.

È importante ricordare che i livelli cerebrali e plasmatici di progesterone e dei suoi metaboliti subiscono drammatiche fluttuazioni in diverse condizioni fisiologiche quali stress, gravidanza, ciclo mestruale e menopausa. Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato che questi ormoni sono in grado di modulare l'espressione genica e quindi la sintesi dei recettori GABA_A. Pertanto, alterazioni nella secrezione periferica o centrale di questi ormoni possono determinare modificazioni nel *pattern* di espressione dei recettori GABA_A e quindi modificare la soglia di eccitabilità delle cellule nonché l'efficacia dei farmaci attivi su questi recettori. Le fluttuazioni nei livelli di steroidi neuroattivi che si verificano durante le diverse fasi del ciclo mestruale, la gravidanza, prima e dopo il parto e durante la menopausa sono associate a parallele modificazioni dell'attività delle sinapsi GABAergiche e dell'espressione genica dei recettori GABA_A; poiché i recettori GABA_A svolgono un ruolo cruciale nella modulazione della sfera emozionale e nel controllo dell'eccitabilità neuronale, queste alterazioni nella loro funzione ed espressione genica potrebbero avere un ruolo predominante nel mediare sia la sintomatologia positiva che la sintomatologia negativa (ansia, insonnia, depressione) che talvolta sono associate alle suddette condizioni.

3. ETANOLO

3.1. Struttura chimica

L'etanolo, dal punto di vista chimico, appartiene al gruppo degli alcoli, composti organici a diversa catena alchilica con un ossidrile (-OH) come gruppo funzionale legato ad un atomo di carbonio non aromatico. Il più piccolo di questi composti è il metanolo, mentre l'alcol etilico ha una catena di due atomi di carbonio e la sua formula bruta è CH₃CH₂OH. A temperatura ambiente l'etanolo si presenta come un liquido incolore dall'odore caratteristico, tendenzialmente volatile ed estremamente infiammabile. La sua struttura chimica gli conferisce contemporaneamente proprietà idrofobiche e idrofiliche. L'etanolo è completamente solubile in molti solventi organici e ha un'ottima capacità di sciogliersi in acqua, data la sua corta catena alchilica; esso è inoltre in grado di attraversare facilmente le membrane lipidiche.

3.2. Uso ricreativo

Da un punto di vista alimentare e socio-culturale l'etanolo, prodotto in natura dalla fermentazione degli zuccheri, è una sostanza che ha sempre accompagnato la società umana sin dai tempi più antichi; esistono infatti documentazioni di bevande alcoliche risalenti al 3000 a.C.. Grazie ai suoi tipici effetti disinibenti, il suo uso è sempre stato associato ad importanti eventi o momenti della *routine* quotidiana, coinvolgendo sia l'ambiente sociale che culturale come anche l'ambito religioso, nel quale l'alcol ha da sempre assunto numerosi significati simbolici; in generale rappresenta una parte integrante della storia e delle tradizioni di ciascun popolo. La sua facile reperibilità e il prezzo relativamente basso hanno portato l'alcol etilico ad essere la sostanza d'abuso più diffusa al mondo.

3.3. Farmacologia

Dal punto di vista neurofarmacologico l'etanolo è una sostanza psicoattiva, quindi non è considerato un farmaco; è un depressivo del sistema nervoso centrale che, per dosi crescenti, provoca sedazione e, al termine, ipnosi; l'attività farmacologica dell'etanolo comunque è sempre di tipo inibitorio, anche se a basse concentrazioni prevalgono gli effetti ansiolitico e disinibente; aumentando la dose possono insorgere infatti gli effetti sedativo-ipnotico e anticonvulsivante. Il meccanismo molecolare di questa sua azione a livello centrale non è stato ancora completamente chiarito.

L'etanolo ha una curva dose-risposta non ripida; pertanto la sedazione si mantiene in un ampio intervallo di dosi. Viene assunto per via orale, assorbito a livello intestinale, ed ha un volume di distribuzione vicino a quello dell'acqua totale dell'organismo e viene metabolizzato principalmente nel fegato prima ad acetaldeide dall'enzima alcol deidrogenasi e poi ad acetato dall'aldeide deidrogenasi. L'eliminazione avviene per la maggior parte attraverso il rene, ma una parte viene escreta attraverso i polmoni.

Come tutte le sostanze d'abuso inoltre l'etanolo è in grado di indurre tolleranza e dipendenza in seguito ad assunzione cronica. La tolleranza è determinata dalla riduzione degli effetti farmacologici, che induce l'alcolista ad aumentare progressivamente la dose per ottenere gli stessi effetti iniziali, e può essere sia di tipo farmacocinetico che farmacodinamico. La dipendenza invece è

soprattutto di tipo fisico, ed è determinata dal manifestarsi delle crisi d'astinenza in seguito all'interruzione della somministrazione cronica; i sintomi riscontrati con maggiore frequenza sono: irritabilità, tachicardia, tremori, e nei casi più gravi allucinazioni, *delirium tremens*, convulsioni. Se a ciò si aggiunge l'incapacità da parte dell'alcolista di smettere di bere nonostante la volontà di farlo, la persistenza dell'uso nonostante i problemi causati a livello sociale e lavorativo e la compromissione di importanti attività fisiche, è facile comprendere perché il DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*) abbia catalogato l'etanolo come una vera e propria sostanza d'abuso.

3.3.1. *Sindrome da astinenza da alcol*

La prolungata esposizione all'etanolo induce lo sviluppo di fenomeni come tolleranza e dipendenza: tali effetti sarebbero il risultato di un processo di adattamento neuronale (Grobin et al., 1998).

In generale si può affermare che la prolungata assunzione di un farmaco o di una sostanza d'abuso, come l'alcol, sia associata ad una progressiva perdita di efficacia, e tale fenomeno è noto come tolleranza. La tolleranza richiede un aumento del dosaggio e questo spesso si traduce nell'insorgenza della dipendenza fisica, che si evidenzia con la presenza dei sintomi di astinenza in seguito alla brusca sospensione del trattamento. I sintomi di astinenza, sia in animali da esperimento che nell'uomo, si possono manifestare spontaneamente dopo l'improvvisa sospensione di un trattamento sufficientemente lungo o con una sintomatologia di intensità più accentuata, in seguito alla somministrazione di un antagonista.

La tolleranza all'etanolo è un fenomeno in parte legato alla diminuzione della risposta dei neuroni del sistema reticolare ascendente e del sistema ippocampo-corticale alla somministrazione prolungata di alcol. Tali modificazioni hanno come conseguenza la tolleranza agli effetti sedativi e di ricompensa dell'alcol.

La dipendenza fisica presenta le seguenti caratteristiche: impossibilità di controllarsi nel bere; persistenza nell'uso della sostanza nonostante la consapevolezza delle conseguenze negative (fisiche, psichiche e sociali); comparsa di malessere fisico e/o psichico in assenza del bere (sindrome d'astinenza).

I sintomi dell'astinenza possono essere molto gravi e si manifestano in seguito all'interruzione improvvisa della somministrazione cronica di etanolo. La sindrome d'astinenza presenta un quadro clinico con stadi diversi che possono includere tremori, nausea, insonnia, ipertensione, ansia, depressione, disforia, disturbi convulsivi e allucinazioni. Tali sintomi nei forti bevitori si manifestano già dopo poche ore dall'interruzione del bere, e persistono fino a 24-48 ore dopo. Nei casi più gravi i sintomi dell'astinenza si manifestano in associazione con altre complicanze quali infezioni, malnutrizione e squilibrio elettrolitico; in tal caso è possibile la comparsa del *delirium tremens*. Quest'ultimo è caratterizzato da gravi manifestazioni cliniche e disorganizzazione del comportamento: il soggetto presenta agitazione, insonnia, confusione, disorientamento, allucinazioni visive, disturbi dell'ideazione e crisi epilettiche generalizzate. Clinicamente si rilevano iperidrosi, tachicardia, ipertensione, ipertermia, tachipnea, fotofobia e, meno frequentemente, nausea e vomito.

Risulta evidente che lo sviluppo e il miglioramento dei mezzi terapeutici oggi disponibili per curare le patologie correlate all'abuso di alcol sono strettamente dipendenti dalla comprensione del meccanismo d'azione dell'etanolo, e dalle conoscenze sui meccanismi biologici responsabili delle modificazioni adattative che si instaurano in seguito all'assunzione cronica di questa sostanza.

I meccanismi molecolari responsabili dell'adattamento dei recettori GABA_A all'esposizione prolungata all'etanolo non sono ancora del tutto chiari, ma si ritiene siano coinvolti dei cambiamenti nella densità dei recettori a livello della superficie membranale, nelle modificazioni post-traduzionali, o nell'espressione delle varie subunità (Grobin et al., 1998; Metha e Ticku, 1999; Biggio et al., 2003; Follesa et al., 2006).

La terapia con benzodiazepine previene le manifestazioni cliniche più severe della sindrome da astinenza da etanolo (Mayo-Smith, 1997), quali convulsioni e deliri; purtroppo però si sa ben poco sui meccanismi molecolari che sono alla base di tali effetti terapeutici.

Recentemente si è osservato che la benzodiazepina diazepam risulta efficace nel bloccare alcuni effetti indotti dall'astinenza da etanolo sull'espressione genica delle subunità del recettore GABA_A e nell'inibire perciò anche i cambiamenti della funzione del recettore associati a tali effetti (Sanna et al., 2003; Follesa et al., 2003).

È importante sottolineare che negli alcolisti, durante la crisi d'astinenza, le benzodiazepine perdono efficacia nell'indurre sedazione, ma mantengono inalterata la loro azione ansiolitica. Questa evidenza può essere spiegata proprio col fatto che l'espressione genica di subunità come l' α_1 , che come noto media gli effetti ipnotici-sedativi (Mckernan et al., 2000), e l' α_2 , che media quelli ansiolitici (Low et al., 2000), vengono alterate durante la sindrome d'astinenza da etanolo. Questa osservazione può così dare una spiegazione del fatto che durante la crisi d'astinenza, la somministrazione delle benzodiazepine medi alcuni effetti e non altri.

3.4. Uso clinico

L'utilizzo terapeutico dell'etanolo è limitato, e le sue poche applicazioni cliniche comprendono l'uso esterno nella prevenzione delle piaghe da decubito e quello come disinfettante cutaneo. In passato l'etanolo veniva in qualche caso utilizzato anche per il controllo del dolore, iniettato in prossimità dei nervi o dei gangli simpatici per alleviare il dolore che si manifesta in alcune patologie quali la nevralgia del trigemino e il carcinoma non operabile. Trova inoltre impiego nel trattamento dell'intossicazione da metanolo e da glicol etilenico.

3.5. Meccanismo d'azione

3.5.1. Effetti sul SNC

La prima ipotesi sul meccanismo d'azione dell'alcol era basata sull'idea che questa sostanza potesse agire attraverso le membrane biologiche alterando così le proprietà chimico-fisiche della cellula, grazie alla sua capacità di sciogliersi in acqua e di essere accolto in un ambiente lipidico. Questa ipotesi, chiamata *teoria lipidica* dell'azione dell'alcol, col passare degli anni è cambiata per far posto a delle nuove concezioni secondo le quali l'alcol avrebbe un'azione diretta sulle proteine di membrana.

Oggi è ormai accertato che l'etanolo può agire su diversi sistemi di neurotrasmissione, sebbene alcune classi di proteine sembrano essere più sensibili di altre alla sua azione, come ad esempio i recettori glutammatergici, glicinerfici, colinergici, GABAergici.

È noto che l'etanolo agisce a livello del SNC alterando la trasmissione neuronale sinaptica, con conseguente riduzione della velocità dell'attività

cerebrale. Particolare importanza rivestono gli effetti esplicati a livello dei canali ionici, siano essi voltaggio- che recettore-dipendenti: gli effetti specifici che l'alcol esercita a livello della funzionalità di questi canali risultano modulati sia dalla composizione in subunità che dallo stato di fosforilazione dei canali ionici stessi.

Gli effetti derivanti dall'esposizione acuta all'alcol sono, almeno in parte, comuni a quelli indotti da molecole appartenenti ad altre classi farmacologiche che rientrano più genericamente nella definizione di sedativo-ipnotici: benzodiazepine, barbiturici ed anestetici generali. Comunemente si pensa che l'alcol sia una sostanza eccitante; in realtà l'etanolo, in funzione della sua dose, può indurre diversi effetti: ansiolitico, ipno-inducente, mentre a dosi più alte induce incoordinazione motoria, anestesia e depressione respiratoria e delle funzioni superiori del SNC.

Negli ultimi decenni numerosi dati sperimentali hanno dimostrato che l'etanolo agisce a livello neuronale alterando la funzione di specifici recettori di membrana per i neurotrasmettitori, l'attività dei quali modula le principali funzioni cerebrali inclusi i comportamenti complessi. Differenti ricerche hanno dimostrato il coinvolgimento dell'azione centrale dell'etanolo su numerosi sistemi di neurotrasmissione, quali quelli dopaminergico, noradrenergico, serotonergico e in particolar modo sui sistemi GABAergico, glutammatergico e anche su alcuni sistemi ormonali.

Di tutte le trasmissioni neuronali coinvolte nello sviluppo della condizione di alcolismo e nei diversi effetti acuti e cronici indotti dall'assunzione di etanolo, sembra che la neurotrasmissione eccitatoria glutammatergica e inibitoria GABAergica svolgano un ruolo fondamentale in alcuni effetti acuti e cronici indotti dall'assunzione di etanolo. La comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari sottesi agli effetti acuti dell'etanolo a livello neuronale fornisce ampie basi per una più vasta comprensione degli effetti derivanti dalla sua assunzione cronica, ovvero dei meccanismi sottesi all'istaurarsi di tolleranza, dipendenza ed astinenza. I recettori GABA_A presenti a livello del SNC mediano molteplici effetti tipici dell'alcol e, in virtù della loro plasticità, manifestano una modificazione della loro composizione in subunità in risposta alle esigenze fisiologiche e funzionali della cellula.

Da questa generale introduzione possiamo perciò dire che l'etanolo ha

un'attività inibitoria nel SNC dei mammiferi e che molte delle sue azioni farmacologiche coincidono con quelle delle benzodiazepine e dei barbiturici, molecole che potenziano la trasmissione GABAergica mediante l'attivazione dei recettori GABA_A (Grobin et al., 1998; Metha e Ticku, 1999).

Il sito di riconoscimento delle benzodiazepine, a livello del recettore GABA_A, risulta quindi un importante *target* d'azione nel trattamento terapeutico della sindrome d'astinenza da etanolo.

3.5.2. *Regolazione dell'espressione genica*

Diverse funzioni adattative o plastiche del cervello sono innescate da modificazioni dell'espressione genica, e questo è probabilmente il caso della tolleranza e dipendenza da alcol, così come quella da benzodiazepine.

La differente composizione in subunità del recettore GABA_A risulta di fondamentale importanza poiché conferisce al recettore diverse proprietà farmacologiche, come ad esempio la sensibilità allo stesso GABA, ai vari farmaci e ai diversi modulatori endogeni (Barnard et al., 1998).

Alcune evidenze sperimentali indicano che il consumo ripetuto di alcol, così come il trattamento prolungato con benzodiazepine (Holt et al., 1996, 1997), modificano i livelli di mRNA e di proteine dei recettori per i neurotrasmettitori e di enzimi neuronali.

È probabile inoltre che l'assunzione cronica e i trattamenti con etanolo alterino i livelli di centinaia, forse migliaia, di mRNA. Tutto ciò rende difficile la comprensione della regolazione dei geni responsabili dello sviluppo di fenomeni come tolleranza e dipendenza.

Inoltre l'espressione dei geni codificanti le subunità recettoriali e il successivo assemblamento delle subunità nelle varie combinazioni sono influenzati non solo dall'azione di farmaci o sostanze che modulano la neurotrasmissione mediata dal recettore GABA_A, ma anche dagli stessi processi fisiologici e dalle fluttuazioni di metaboliti endogeni come gli steroidi (Concas et al., 1998; Smith et al., 1998a; Biggio et al., 2003; Follesa et al., 2006; Maguire et al., 2005).

L'etanolo, oltre a influire sulla trasmissione GABAergica, agisce anche su altri sistemi di neurotrasmissione come per esempio quello eccitatorio glutammatergico. Il recettore glutammatergico *target* principale dell'etanolo è il recettore NMDA. Studi relativamente recenti hanno dimostrato che il consumo

cronico di etanolo aumenta l'espressione di alcune subunità del recettore NMDA (Follesa and Ticku, 1996; Snell et al., 1996) e l'espressione delle subunità α_4 e α_6 del recettore GABA_A, mentre diminuisce quella della subunità α_1 (Morrow, 1995; Devaud et al., 1997).

L'etanolo si lega a livello di una tasca idrofobica presente nel terzo dominio transmembranale della subunità NR1 bloccando l'attività del recettore NMDA e conseguentemente riducendo il tono glutammatergico. Con l'esposizione prolungata avvengono però una serie di fenomeni adattativi a livello recettoriale che tendono a ridurre la sensibilità del recettore NMDA alle azioni dell'etanolo. Un primo meccanismo di adattamento è la *up-regulation* dei recettori, associata ad un aumento della sintesi delle proteine NR1, NR2A, NR2B che formano le subunità recettoriali. Un secondo meccanismo è rappresentato da cambiamenti nello stato di fosforilazione del recettore: infatti l'esposizione cronica all'etanolo induce un aumento della fosforilazione a livello delle subunità NR2A e NR2B, mediante l'attivazione di una tirosinchinasi, con conseguente riduzione della sensibilità del recettore NMDA all'alcol.

L'aumento dei recettori NMDA potrebbe pertanto essere di cruciale importanza nella ipereccitabilità e neurotossicità dell'astinenza da etanolo osservate dopo la cessazione del consumo cronico di etanolo, mentre le modificazioni nella composizione dei recettori GABA_A potrebbero essere importanti per alcuni aspetti dell'astinenza da etanolo così come per la tolleranza e la tolleranza crociata verso altri modulatori GABAergici, come le benzodiazepine. Tuttavia, manca una prova diretta che colleghi le alterazioni nell'espressione genica con la tolleranza o dipendenza da etanolo.

È interessante notare che, sebbene le cellule transfettate stabilmente con subunità del recettore GABA_A mostrino *in vitro* alcuni fenomeni adattativi della funzione recettoriale simili a quelli osservati *in vivo*, in queste cellule tuttavia non si instauri alcuna alterazione nell'espressione genica del recettore GABA_A (Klein e Harris, 1996; Harris et al., 1998). Per gli studi sopra citati sono stati utilizzati sia modelli *in vitro* (colture neuronali primarie) che *in vivo* (roditori) che venivano sottoposti a trattamenti cronici, relativamente brevi (ore o settimane), con etanolo; vi sono però poche evidenze che simili alterazioni avvengano effettivamente negli alcolisti cronici (Lewohl et al., 1997).

Lo sviluppo di nuove e migliori tecniche porterà probabilmente all'identificazione

di diversi geni regolati dall'etanolo; sarà allora possibile determinare quale di questi geni sia importante per le specifiche conseguenze del consumo cronico di alcol.

3.5.3. *Etanolo e recettori GABA_B*

Inizialmente si pensava che l'etanolo interagisse solamente con i recettori postsinaptici di tipo GABA_A, che mediano la maggior parte dell'inibizione sinaptica veloce nel SNC dei mammiferi; viceversa un certo numero di studi recenti hanno identificato nuovi meccanismi pre- e postsinaptici che possono contribuire agli effetti acuti e di lunga durata dell'etanolo sul sistema inibitorio GABAergico. Questi meccanismi coinvolgerebbero anche l'attivazione dei recettori GABA_B che sembrerebbero differire in modo specifico nelle diverse regioni del cervello, ed è probabile che vengano influenzati da differenti fattori neuromodulatori endogeni come i neurosteroidi.

Per studiare il ruolo dei recettori GABA_B e gli effetti acuti dell'etanolo sulla trasmissione inibitoria GABAergica postsinaptica, sono stati effettuati degli esperimenti di elettrofisiologia misurando le correnti e i potenziali postsinaptici inibitori (IPSC/P), in presenza di etanolo, da neuroni piramidali della regione CA1 dell'ippocampo. È stato dimostrato che il blocco dei recettori GABA_B aumenta l'effetto di potenziamento dell'etanolo mediato dai recettori GABA_A (Wan et al., 1996). Diversi altri studi hanno dimostrato che il blocco dei recettori GABA_B permette di rivelare gli effetti del potenziamento dell'etanolo sulle sinapsi GABAergiche nell'ippocampo (Kang et al., 1998; Wu et al., 2005) e nel *nucleus accumbens* (Siggins et al., 1999). Questi risultati suggeriscono l'esistenza di un meccanismo GABA_B-dipendente che possa limitare l'aumento dell'inibizione GABAergica ippocampale mediata dall'etanolo.

Inoltre, recenti evidenze dimostrano che l'esposizione acuta dell'etanolo aumenta il rilascio di GABA in queste sinapsi (Carta et al., 2003; Sanna et al., 2004); è stato proposto che questo effetto presinaptico dell'etanolo possa elevare i livelli ambientali di GABA in maniera tale da aumentare l'attività dei recettori GABA_B presinaptici riducendo così il complessivo effetto facilitatorio dell'etanolo sulla risposte GABAergiche evocate. L'etanolo sembra, invece, non avere effetti diretti sui recettori GABA_B postsinaptici (Ariwodola e Weiner, 2004; Weiner et al., 1997; Poelchen et al., 2000; Frye & Fincher, 1996; Wan et al.,

1996). Tutti questi risultati rafforzano l'ipotesi che l'aumento del rilascio di GABA indotto dall'etanolo possa, attraverso l'attivazione di recettori GABA_B presinaptici, limitare l'effetto di potenziamento dell'etanolo su gli IPSP (Weiner e Valenzuela, 2006).

3.5.4. *Etanolo e neurosteroidi*

Una quantità crescente di dati in letteratura suggerisce che molte delle azioni farmacologiche acute dell'etanolo sono mediate dall'aumento dei livelli cerebrali degli steroidi neuroattivi (Morrow et al., 1999) derivati dal metabolismo del progesterone. Alcuni di questi neurosteroidi, come l'allopregnanolone (AP), sono potenti modulatori allosterici del recettore GABA_A. È stato dimostrato che la somministrazione sistemica acuta di etanolo nel ratto è in grado di indurre marcati aumenti nelle concentrazioni dello steroide AP nel plasma, nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo (Barbaccia et al., 1999; VanDoren et al., 2000; Morrow et al., 2001). Un altro indizio che suggerisce l'esistenza di un ruolo per gli steroidi neuroattivi negli effetti farmacologici dell'etanolo è dato dall'evidenza che il pretrattamento di animali con la finasteride, un inibitore dell'enzima 5 α -reduttasi e quindi della biosintesi dell'AP, riduce l'aumento dei livelli cerebrocorticali di AP indotto dall'etanolo e previene alcune azioni neurochimiche, elettrofisiologiche e comportamentali (per esempio l'effetto ipnotico) dell'etanolo (VanDoren et al., 2000; Khisti et al., 2002). Queste osservazioni hanno portato alla formulazione dell'ipotesi che l'etanolo possa esercitare alcuni dei suoi effetti comportamentali e cognitivi in modo indiretto attraverso un incremento dei livelli di neurosteroidi che modulano positivamente la neurotrasmissione GABAergica (Weiner e Valenzuela, 2006; Biggio et al., 2007).

È stato riportato anche che i livelli plasmatici di AP possano influenzare l'effetto di rinforzo dell'etanolo (Morrow et al., 2001). Infatti le femmine di topo, le cui concentrazioni plasmatiche di AP sono maggiori rispetto a quelle dei maschi, consumano quantità maggiori di etanolo rispetto a questi ultimi (Sinnott et al., 2002); ma la somministrazione sistemica di AP fa aumentare ai maschi il consumo di alcol.

Tuttavia è stato dimostrato anche che l'autosomministrazione di etanolo nelle femmine di ratto è stata minore durante la fase di estro, in cui i livelli cerebrali di

AP sono maggiori rispetto alle altre fasi del ciclo e i ratti socialmente isolati, nei quali tali livelli sono ridotti in modo marcato, consumano quantità maggiori di alcol (Schenk et al., 1990).

È stato proposto che il meccanismo principale attraverso il quale l'etanolo possa indurre un aumento dei livelli di AP consista in un effetto stimolante sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (Khisti et al., 2003; Biggio et al., 2007). Infatti l'alcol non induce né aumenti plasmatici di AP né i suoi tipici effetti comportamentali nei ratti surrenectomizzati (Khisti et al., 2002, 2003).

Nel loro insieme, tutte queste evidenze suggeriscono che gli steroidi neuroattivi sintetizzati negli organi periferici in risposta all'attivazione dell'asse HPA possano essere responsabili di certi effetti dell'alcol sui recettori GABA_A (Biggio et al., 2007).

Poiché gli steroidi neuroattivi possono venire sintetizzati anche *de novo* nel cervello, indipendentemente dagli organi periferici, si iniziò a vagliare l'ipotesi che questi meccanismi potessero essere indotti dall'alcol direttamente nel tessuto cerebrale. La prima evidenza diretta che i neurosteroidi possono contribuire al potenziamento delle sinapsi GABAergiche indotto dall'etanolo è stata ottenuta recentemente su fettine ippocampali: l'etanolo sembra avere un effetto postsinaptico diretto sui ricettori GABA_A, anche se temporaneo, che mostra una marcata tolleranza acuta entro 10 minuti (Sanna et al., 2004). Tuttavia, un lento sviluppo di un potenziamento postsinaptico, mediato dal rilascio di neurosteroidi, provoca il riemergere di un aumento nella neurotrasmissione GABAergica postsinaptica; in più, l'etanolo esercita un marcato effetto facilitatorio presinaptico sul rilascio di GABA indipendente dall'azione dei neurosteroidi (Sanna et al., 2004). I risultati di questo studio suggeriscono un'interazione complessa fra etanolo, biosintesi dei neurosteroidi e regolazione della trasmissione GABAergica. Tuttavia, rimane da stabilire in che modo l'etanolo a livello locale nel SNC possa aumentare la sintesi degli steroidi con un meccanismo indipendente dall'HPA.

2. Obiettivi

Sulla base di tutte queste premesse ho eseguito degli studi per comprendere meglio i meccanismi molecolari attraverso i quali l'etanolo possa interferire nel modificare la trasmissione GABAergica.

Per i miei esperimenti ho scelto di utilizzare l'isolamento sociale come modello sperimentale in grado di indurre dei cambiamenti comportamentali, alterazioni delle concentrazioni plasmatiche di steroidi neuroattivi e modificazioni a livello dell'espressione genica dei recettori GABA_A.

In particolare lo stress cronico determinato dall'isolamento sociale induce una *down regulation* della trasmissione GABAergica che porta ad una modificazione della conformazione del recettore GABA_A in seguito a variazione nell'espressione delle specifiche subunità che lo compongono. È stato inoltre dimostrato che variazioni fisiologiche o farmacologiche delle concentrazioni di steroidi neuroattivi inducono una selettiva modulazione della funzione e dell'espressione delle diverse subunità che compongono il recettore GABA_A in diverse aree cerebrali (Fenelon e Herbison, 1996; Concas et al., 1998; Follesa et al., 1998; Smith et al., 1998 a, b).

Considerando inoltre che gli animali sottoposti ad isolamento sociale rispondono in maniera differente ad una varietà di sostanze psicoattive, incluso l'etanolo, rispetto agli animali di controllo (Paivarinta, 1990; Lapiz et al., 2001), ho utilizzato il test sperimentale del *free choice drinking* (basato sulla libera scelta di consumo volontario di etanolo rispetto all'acqua da parte di topi C57BL/6J) con l'intento di studiare i meccanismi molecolari coinvolti negli effetti dell'etanolo sull'espressione genica e sulla funzione del recettore GABA_A.

3. Materiali e metodi

1. ANIMALI

Per i miei esperimenti ho utilizzato topi maschi di 21 giorni C57BL/6J, nati dall'accoppiamento di femmine di peso corporeo di circa 20-24 grammi con maschi di 25-28 grammi, mantenuti in un ciclo di luce-buio di 12 ore, in condizioni di temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidità (65%) costanti, con disponibilità *ad libitum* di acqua e cibo. Per l'accoppiamento, 1 topo maschio e 2-3 femmine sono stati riuniti in gabbie singole per circa 2-3 giorni. Trascorso questo periodo, le femmine sono state separate dai maschi e riunite insieme in una gabbia sino alla fine del periodo di gestazione (21 giorni). Trascorso tale periodo le femmine sono state isolate in gabbie singole, nelle quali hanno partorito.

2. PROTOCOLLO SPERIMENTALE DEL FREE CHOICE DRINKING

I topi maschi sono stati divisi in 2 principali gruppi sperimentali, fra cui i *group housed* (GH, 6 per gabbia) e *isolated* (ISO, 1 per gabbia) e ulteriormente divisi in 4 sottogruppi come segue:

- GH che bevono acqua
- ISO che bevono acqua ed etanolo
- GH che bevono acqua ed etanolo
- ISO che bevono acqua

L'intero esperimento prevede una durata di 6 settimane, periodo in cui agli animali è stata data l'opportunità di scegliere fra 2 biberon contenenti 1 acqua e 1 etanolo o 2 acqua; più precisamente tali biberon venivano somministrati per 2 ore al giorno, agli isolati e ai *group housed* separati in singole gabbie, circa 30 minuti prima del ciclo del buio. Al termine delle 2 ore, i *group housed* sono stati rimessi assieme nella loro gabbia di appartenenza e a tutti gli animali veniva nuovamente somministrato un unico biberon contenente acqua. I biberon sono

stati pesati tutti i giorni (all'inizio e al termine delle 2 ore di *free choice*), mentre i topi sono stati pesati ogni settimana. La posizione dei biberon veniva alternata giornalmente. Nei primi 8 giorni di esperimento è stato eseguito un *training* di facilitazione alla bevuta di etanolo attraverso l'aggiunta di saccarosio (w:v) (Samson, 1986) secondo lo schema:

- 2 giorni etanolo 10% più saccarosio 5%
- 2 giorni etanolo 12,5% più saccarosio 5%
- 2 giorni etanolo 15% più saccarosio 5%
- 2 giorni etanolo 15% più saccarosio 2%

Nei biberon contenenti acqua veniva aggiunta la stessa concentrazione di saccarosio.

Al termine del *training* e per tutto il periodo dell'esperimento, la concentrazione dell'etanolo somministrato era del 15% (v:v) diluito con acqua di fonte. Il consumo di etanolo ed acqua sono stati calcolati eseguendo le differenze di peso dei biberon all'inizio e al termine delle 2 ore di *free choice*. I dati analizzati sono stati: consumo di etanolo (g e g/Kg), consumo di acqua (g) e consumo di liquido totale (etanolo + acqua).

Trascorse le 6 settimane di esperimento e subito dopo il termine delle 2 ore di *free choice* dell'ultimo giorno, gli animali sono stati subito sacrificati ed è stato prelevato l'ippocampo e conservato in tubi da centrifuga a -80°C . Successivamente sono stati misurati i livelli degli mRNA codificanti per le subunità α_1 , α_4 e δ del recettore GABA_A attraverso la tecnica del saggio protetto dalle RNasi (RPA).

3. MISURAZIONE DEI LIVELLI DI MRNA

3.1. Preparazione dei cloni di cDNA

Il cDNA codificante per ciascuna subunità del recettore GABA_A è stato ottenuto tramite trascrizione inversa e reazione a catena della polimerasi (PCR) a partire dall'RNA totale isolato dall'ippocampo di topo. Ogni molecola di mRNA contiene una coda di poli-(A) a cui si appaiano le catene di oligo-(dT), le quali fungono così da innesco per l'enzima trascrittasi inversa *SuperScript II* (Life Technologies), una DNA polimerasi RNA dipendente che sintetizza un filamento di DNA complementare a quello dell'mRNA. Il prodotto della trascrizione inversa (compreso tra 1 e 10 ng) è stato sottoposto a digestione con RNasi H per la

rimozione dell'RNA stampo e soggetto ad amplificazione tramite la DNA polimerasi DNA dipendente termostabile estratta dal batterio *Thermus aquaticus* (Taq) (2,5 U; Perkin-Elmer/Cetus) in 100 μ L di *buffer* standard (tris-HCl pH=8,3 100mM, KCl 500mM, MgCl₂ 15mM, gelatina 0,01%) contenente 1 μ M dei *primer* senso e antisenso e 200 μ M di ciascun desossinucleoside trifosfato. I *primer* sono stati "disegnati" in modo tale da includere una sequenza di cDNA con il minor grado possibile di analogia con le sequenze di altre subunità del recettore GABA_A, evitando così eventuali appaiamenti aspecifici con mRNA aventi sequenze simili. Le sequenze degli inneschi utilizzati per la produzione dei cDNA specifici per le subunità analizzate sono indicati in tabella 2. La reazione, avvenuta in un termociclatore (Eppendorf), era composta da 30 cicli, ciascuno dei quali suddiviso in tre fasi:

- denaturazione (*denaturing*): la temperatura è stata portata a 94°C per 45 secondi in modo da denaturare la doppia elica di cDNA;
- appaiamento (*annealing*): la temperatura ha raggiunto rapidamente i 60°C per 1 minuto per permettere al primer di appaiarsi alla terminazione del filamento che si voleva amplificare;
- sintesi (*extension*): alla temperatura di 72°C per 1 minuto, durante il quale la DNA polimerasi Taq ha sintetizzato una copia completa del DNA stampo.

I trenta cicli sono stati preceduti dall'attivazione dell'enzima a 94°C per 2 minuti e al termine della PCR è avvenuta un'estensione finale di 15 minuti a 72°C per permettere alla DNA polimerasi di duplicare gli eventuali frammenti di cDNA non sintetizzati completamente. Il prodotto di amplificazione, la cui lunghezza espressa in paia di basi (pb) era nota, è stato separato mediante elettroforesi su un gel d'agarosio a basso punto di fusione all'1,8%, visualizzato con etidio bromuro e luce ultravioletta, tagliato con un bisturi dal gel, purificato tramite il *kit Wizard PCR DNA Purification System* (Promega) e inserito nel vettore di clonazione pAMP 1 (Life-Technologies).

3.2. Trasformazione batterica e amplificazione del vettore plasmidico

Il vettore di clonazione pAMP 1 (Life-Technologies) contenente l'inserito di cDNA codificante per una porzione della subunità desiderata del recettore GABA_A è stato utilizzato per la trasformazione di cellule del batterio *Escherichia coli* appartenenti al ceppo DH5 α . Le cellule batteriche sono state in precedenza

rese competenti al fine di aumentare la permeabilità di membrana e quindi facilitare l'ingresso del plasmide. Una singola colonia è stata fatta crescere in 100 mL di brodo di coltura in uno *shaker* alla velocità di 250 rpm dentro un termostato a 37°C per una notte; tramite centrifugazione a 2500 rpm i batteri sono poi stati recuperati, risospesi in una soluzione 100mM di CaCl₂ e incubati in ghiaccio per 30 minuti, ottenendo in questo modo lo stato di competenza. In seguito la soluzione di cellule batteriche è stata centrifugata e il *pellet* così ottenuto è stato risospeso in una soluzione costituita all'80% da CaCl₂ 100mM e per il 20% da glicerolo. Le cellule sono state quindi conservate a -80°C fino al giorno dell'utilizzo. La trasformazione batterica è stata effettuata aggiungendo 0,1 µg del vettore plasmidico pAMP 1 contenente l'inserito di cDNA in un tubo contenente 50 µL di cellule competenti; poi, dopo un'incubazione per 30 minuti in ghiaccio allo scopo di uniformare la fase di crescita, i batteri sono stati sottoposti ad uno *shock* termico per 45 secondi in un bagno a 42°C per poi essere riposti nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. Dopo l'aggiunta di 1 mL di brodo le cellule sono state incubate per 1 ora a 37°C in agitazione a 220 rpm allo scopo di far sviluppare loro la resistenza all'ampicillina, conferita da un gene *reporter* presente nel plasmide. Le cellule batteriche trasformate sono state quindi piastrate diluendo in maniera empirica (50, 100 e 250 µL) i batteri su terreni di coltura solidi contenenti 25 mL di agar ai quali sono stati aggiunti ampicillina (100 µL/mL, Sigma), 40 µL di isopropiltio β-D-tiogalattopiranoside (IPTG, Sigma) e 4 µL di una soluzione al 2 % di 5-bromo-4-cloro-3-indoil β -D-galattopiranoside (X-GAL); l'IPTG funge da induttore per il gene *lac*, mentre l'X-GAL è un substrato cromogenico dell'enzima β-galattosidasi che permette l'identificazione delle colonie batteriche "*lac*⁺". Le piastre sono state quindi tenute in incubazione per una notte a 37°C. L'inserimento del cDNA esogeno nel plasmide è avvenuto all'interno di un sito di clonazione multipla presente nel gene che codifica per l'enzima β-galattosidasi, determinandone l'inattivazione inserzionale; quindi le cellule nelle quali la trasformazione risultava correttamente avvenuta, essendo incapaci di metabolizzare il galattosio e il suo analogo cromogenico X-GAL, erano di colore bianco; tutte le altre cellule batteriche contenenti il plasmide privo dell'inserito erano riconoscibili da una colorazione blu, determinata dalla precipitazione di un derivato del metabolismo dell'X-GAL. Sono state quindi prelevate da 4 a 6 colonie batteriche di colore

bianco, trasferite ciascuna in un tubo contenente 5 mL di brodo Luria / Bertani (Sigma) e 5 μ L di ampicillina 100 mg/mL (Sigma) e fatte crescere per tutta la notte a 37°C e in agitazione a 220 rpm. Un'aliquota (1,5 mL) di coltura batterica è stata utilizzata per la *mini-prep*, realizzata con il *kit Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), e il successivo *screening* con gli enzimi di restrizione appropriati, per verificare la presenza e le dimensioni dell'insero, mentre le cellule batteriche rimanenti sono state trasferite in tubi con 20 mL di brodo e 35 μ L di ampicillina e lasciate crescere a 37°C in agitazione a 220 rpm per un'altra notte. I 20 mL di brodo sono stati poi diluiti in ulteriori 250 mL e incubati per un'altra notte.

3.3. Isolamento e purificazione dei plasmidi

Dalle cellule batteriche trasformate sono stati poi estratti e purificati i plasmidi contenenti l'insero di cDNA. I batteri sono stati centrifugati a 4000 rpm per 15 minuti a 4°C. Una volta eliminato il supernatante, il *pellet* è stato lavato con 100 mL di STE *buffer* (NaCl 0,1M, tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) raffreddato in ghiaccio, ricentrifugato a 4000 rpm per 15 minuti a 4°C e risospeso in 10 mL di soluzione Plaz-I (contenente glucosio 50mM, tris-HCl pH=8 25mM e EDTA pH=8 10mM) in modo da eliminare il brodo rimasto. Sono stati quindi aggiunti 1 mL di lisozima (Sigma) per lisare le cellule batteriche e 20 mL di soluzione Plaz-II (NaOH 0,2N e SDS 1%), dopodiché è stata fatta un'incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti. Per facilitare la denaturazione sono poi stati aggiunti 15 mL di soluzione Plaz-III (composta da acetato di potassio 5M e acido acetico glaciale pH=4,8) e i batteri sono stati lasciati in ghiaccio per 10 minuti; l'azione del freddo ha facilitato ulteriormente la lisi cellulare. In seguito a centrifugazione a 8800 rpm per 10 minuti a 4°C il DNA plasmidico è rimasto nel supernatante, mentre si è formato un precipitato contenente DNA cromosomiale, RNA ad alto peso molecolare e complessi K⁺/SDS/proteine/membrane. Il supernatante è stato quindi filtrato, attraverso colini di *nylon*, dentro nuovi tubi, ad esso sono stati aggiunti 0,6 volumi di isopropanolo (Carlo Erba), è stato agitato con delicatezza e lasciato poi a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo una centrifugazione a 5000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente è stato eliminato il supernatante, ed il *pellet* è stato lavato con etanolo 70% e ricentrifugato a 5000 rpm per 5 minuti a

temperatura ambiente. Eliminato il supernatante, il *pellet* è stato sospeso in 3 mL di buffer tris-EDTA pH=8. Per disidratare, rendere insolubile e far precipitare l'RNA a grosso peso molecolare e dissociare la frazione proteica dalla cromatina, è stato aggiunto cloruro di litio 0,8M ed è stata eseguita una centrifugazione a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C. Al supernatante contenente il DNA plasmidico sono stati aggiunti 2 volumi di etanolo 96% (Carlo Erba). In seguito a centrifugazione il *pellet* è stato lavato con etanolo 70%, quindi ricentrifugato e risospeso in 4 mL di *buffer* tris-EDTA + NaCl 50mM pH=8 contenenti 40 µL di RNasi A (concentrazione finale 100 µg/mL, Sigma) e poi incubato a 37°C per 30 minuti. Quindi è stato aggiunto il detergente cationico a bassa forza ionica esadeciltrimetilammonio bromuro (CTAB, 3mM, Sigma) per far precipitare il DNA durante un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo una centrifugazione a 8250 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente il *pellet* risultante è stato risospeso in 3 mL di tampone tris-EDTA + NaCl 1M pH=8, a cui sono stati aggiunti 6 mL di etanolo 96%; dopo una prima centrifugazione, un lavaggio con etanolo al 70%, ed una seconda centrifugazione, il *pellet* è stato risospeso in 1 mL di tampone tris-EDTA + NaCl 50mM pH=8. Per denaturare il DNA, la sospensione è stata poi incubata per 5 minuti a 100°C per essere poi raffreddata in ghiaccio. La sospensione è stata poi centrifugata per 2 minuti a 1000 rpm con delle colonne di *benzoylated naphthoylated diethylaminoethyl cellulose* (BNDC, Sigma), che è stata utilizzata per separare il DNA a singolo filamento da quello a doppio filamento in presenza di NaCl. Infatti, mentre il DNA batterico di grandi dimensioni resta denaturato dopo il rapido passaggio da 100°C al ghiaccio, il DNA plasmidico, di piccole dimensioni, rinatura velocemente. Il DNA è stato trasferito nella colonna di BNDC compattata ed essa è stata centrifugata a 1000 rpm per 2 minuti; l'eluato è stato raccolto in un tubo da centrifuga da 50 mL. Questa procedura è stata ripetuta utilizzando la stessa colonna e lo stesso tubo. Al termine della seconda centrifugata, alla colonna sono stati aggiunti 0,25 mL di buffer TE + NaCl 1M, pH=8 per lavarla, centrifugandola poi a 1000 rpm per 2 minuti. Alla fine nel tubo erano contenuti approssimativamente 2,25 mL di DNA plasmidico eluito. Il DNA batterico denaturato era invece rimasto intrappolato nella cellulosa. Al DNA plasmidico sono stati quindi aggiunti 6 mL di etanolo al 96%. Dopo una centrifugazione a 10000 rpm di 15 minuti, un lavaggio con etanolo al

70% e ricentrifugazione, il *pellet* precipitato conteneva il plasmide purificato. Il DNA plasmidico è stato risospeso in 400 μ L di acqua sterile ed è stata prelevata un'aliquota di 5 μ L per determinarne la concentrazione mediante lettura allo spettrofotometro (modello 7800, Japan Spectroscopic Co. Ltd), alle lunghezze d'onda di 260 nm e 280 nm. Una volta determinata la concentrazione il DNA plasmidico è stato aliquotato e conservato ad una temperatura di -80°C .

3.4. Sequenziamento

Gli inserti di cDNA sono stati sequenziati, per verificarne l'identità, utilizzando un *kit Sequenase DNA Sequencing (USB)* basato sul metodo di Sanger. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono risultate identiche al 100% alle rispettive sequenze codificanti per le diverse subunità del recettore GABA_A clonate presenti in *GENBANK*.

3.5. Linearizzazione plasmidica

Lo scopo della linearizzazione è la produzione di un filamento di DNA che serve come stampo per la sintesi di sonde antisenso di cRNA complementari a specifici mRNA. I plasmidi contenenti gli inserti di cDNA sono stati linearizzati utilizzando gli appropriati enzimi di restrizione deputati al riconoscimento di particolari sequenze presenti sul vettore di clonazione, nella regione denominata *poly-linker-region (PLR)*. Ogni enzima di restrizione è in grado di riconoscere una sequenza specifica di DNA, e quindi di tagliare in un punto diverso. Nel mio studio ho utilizzato inserti di cDNA codificanti per le diverse subunità del recettore GABA_A e per la proteina ciclofillina (P1B15) utilizzata come standard interno per normalizzare i dati. I plasmidi contenenti i frammenti di cDNA corrispondenti alle varie subunità sono stati linearizzati utilizzando degli enzimi di restrizione specifici. La miscela di reazione è stata incubata alle temperature indicate per il corrispondente enzima per 60 minuti. Dopo la digestione la miscela è stata purificata aggiungendo 250 μ L di SEVAC (fenolo + cloroformio + alcol isoamilico in un rapporto di 25:24:1); la fase acquosa contenente il DNA in soluzione è stata recuperata e trasferita in un nuovo tubo, nel quale sono stati aggiunti 25 μ L di acetato di sodio e 2,5 volumi di etanolo al 96%, quindi è stata conservata a -80°C per una notte. Il giorno seguente la sospensione è stata centrifugata, lavata con 500 μ L di etanolo al 70% e

ricentrifugata per 5 minuti. Il DNA è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio all'1% (Sigma), che ha permesso di verificare l'effettiva linearizzazione del plasmide tramite visualizzazione mediante etidio bromuro (Sigma) e luce ultravioletta.

3.6. Preparazione delle sonde di cRNA marcate

I plasmidi linearizzati contenenti gli inserti di cDNA sono stati utilizzati come stampo per la appropriata RNA polimerasi DNA dipendente batteriofagica, estratta da *Salmonella typhimurium* (SP6) o dal batteriofago T7 di *Escherichia coli* (T7), per sintetizzare sonde di cRNA marcate con ^{32}P nel CTP in posizione α da utilizzare nei saggi dell'RNA protetti da RNasi (RPA). Le sonde marcate sono state preparate fornendo alle RNA polimerasi DNA dipendenti i nucleotidi ATP, GTP e UTP non marcati e il nucleotide CTP marcato con l'isotopo radioattivo ^{32}P . Nella sintesi del filamento di cRNA, l'RNA polimerasi DNA dipendente ha inserito i nucleotidi non marcati e quelli corrispondenti alle molecole di CTP che recavano il gruppo fosforico in posizione α marcato con il ^{32}P . Non tutte le posizioni corrispondenti sono state occupate da molecole di citidina radioattiva, in quanto nella miscela di reazione è stata fornita anche una certa quantità di molecole di CTP non marcate al fine di abbassare l'attività specifica della sonda (espressa in cpm/ μg di RNA) e quindi ottenere un maggior potere risolutivo nel processo autoradiografico (vedi più avanti). Per ogni sonda sono stati utilizzati 5 μL di CTP radioattivo (corrispondenti a 50 μCi) e a questi è stata aggiunta una miscela contenente tampone di incubazione 5X (tris-HCl 200mM, MgCl_2 30mM, spermidina 10mM), l'antiossidante DTT 100mM, una soluzione acquosa dei nucleotidi (ATP, UTP, GTP), una soluzione acquosa di CTP non marcato 100mM, acqua sterile e un inibitore delle RNasi. Una volta addizionati 18 μL di tale miscela a 1 μL del plasmide linearizzato, è stato aggiunto 1 μL della soluzione contenente la RNA polimerasi DNA dipendente SP6 o T7 (Promega), per un volume finale di 20 μL . I campioni sono stati poi incubati a 37°C per 1 ora, durante la quale è avvenuta la reazione di polimerizzazione del cRNA. Al termine dell'incubazione in ogni campione sono stati aggiunti 2 μL di DNasi RQ1 (Promega) e in seguito la miscela di reazione è stata lasciata in incubazione a 37°C per 15 minuti allo scopo di digerire il plasmide utilizzato come stampo. Successivamente, la sonda di cRNA è stata

separata e purificata dal DNA frammentato e dai nucleotidi non incorporati per ridurre il *background* aspecifico degli esperimenti di ibridazione. Per fare ciò è stato utilizzato il *kit* Micro Bio-Spin P-30 Tris (Bio-Rad), composto da delle colonnine riempite di una resina che, attraverso un sistema di filtrazione, ha separato le sonde da tutti gli altri reagenti presenti nel tubo di reazione. Per verificare se la sonda era stata effettivamente marcata con ^{32}P e per determinare la quantità di cRNA sintetizzato è stata calcolata la quantità di fosforo radioattivo incorporata per ogni sonda: un'aliquota di 2 μL di ogni sonda è stata quindi quantificata mediante la determinazione delle conte per minuto (cpm) incorporate utilizzando un β -counter a scintillazione liquida (modello TRI-CARB 2100 TR, Packard). In tal modo si è potuta conoscere la stima della concentrazione delle sonde e di conseguenza la quantità necessaria da usare per ciascun campione.

3.7. Estrazione dell'RNA totale dall'ippocampo di topo

Per l'estrazione dell'RNA totale dall'ippocampo di topo è stato utilizzato il metodo della guanidina isotiocianato (Chomczynski e Sacchi, 1987, 2006). Questo metodo permette l'isolamento totale dell'RNA mediante l'uso di una soluzione contenente acido guanidico tiocianato, fenolo e cloroformio, e fornisce una preparazione pura di RNA non degradato ad alta resa. Dopo aver sacrificato gli animali, è stato prelevato l'ippocampo, messo in tubi da centrifuga e conservato a -80°C . Il giorno dell'estrazione sono stati aggiunti, al tessuto, 1,5 mL di una soluzione denaturante (Sol-D) costituita da guanidio isotiocianato 4M (Sigma), potente agente denaturante, sarcosyl 0,5% (Sigma), detergente, e sodio citrato 25M pH=7 (Sigma), fissativo. A questa soluzione poi sono stati aggiunti 10,8 μL di β -mercaptoetanololo (Sigma) e successivamente il tessuto è stato omogenato (Ystral T1500 homogeniser). Il guanidio isotiocianato è un sale caotropico ed è tra i più efficaci agenti denaturanti le proteine, che perdono in esso qualsiasi traccia della loro struttura secondaria e quindi anche la loro attività biologica; inoltre risulta essere anche un forte inibitore delle ribonucleasi. Esso ha anche la funzione di lisare le varie strutture cellulari affinché gli acidi nucleici siano rilasciati dalle cellule. L'inibizione delle ribonucleasi viene potenziata dal β -mercaptoetanololo, un agente riducente che spezza i ponti

disolfuro responsabili del mantenimento delle strutture e quindi dell'attività delle ribonucleasi. Successivamente sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- un uguale volume di fenolo saturato con acqua (pH acido); il fenolo ha la funzione di denaturare e dissolvere le proteine essendo un agente deproteinizzante;
- un volume di NaOAc 2M pH=4 pari a 1/10 del volume iniziale: favorisce la precipitazione dell'RNA;
- una soluzione costituita da cloroformio ed alcol isoamilico in rapporto di 24:1, per un volume pari a 3/10 di quello formato dalla fase acquosa (guanidio + acetato di sodio). Il cloroformio è deproteinizzante, mentre l'alcol isoamilico dissolve la schiuma formata dopo l'aggiunta della Sol-D.

Successivamente i campioni sono stati vorticati per 1 minuto e quindi messi in ghiaccio per 15 minuti: la bassa temperatura favorisce la separazione delle due fasi immiscibili, organica e acquosa. In seguito a centrifugazione per 20 minuti a 9000 rpm a 4°C si osservano due fasi: quella superiore, acquosa, contenente l'RNA totale, e quella inferiore, organica, che contiene DNA e proteine; tra le due, inoltre, è presente un'interfaccia biancastra costituita da proteine. L'RNA e il restante materiale citoplasmatico vengono separati in virtù della loro differente solubilità nelle due fasi che si sono formate.

La fase acquosa quindi è stata recuperata e trasferita in nuovi tubi, è stato aggiunto un ugual volume di isopropanolo, che favorisce la precipitazione dell'RNA in seguito alla formazione di aggregati tra RNA e sali rendendo l'RNA insolubile, e i campioni, dopo essere stati agitati, sono stati conservati a -80°C per una notte; anche in questo caso la bassa temperatura facilita ulteriormente la precipitazione dell'RNA.

I campioni sono stati quindi centrifugati per 20 minuti a 9000 rpm a 4°C, dopo di che è stato possibile osservare sul fondo del tubo un precipitato (*pellet*) composto da RNA e sali. Eliminato il supernatante aspirandolo con una pompa a vuoto, il *pellet* è stato sciolto in 300 µL di acqua sterile, quindi è stata aggiunta una soluzione ad alta forza ionica costituita da sodio acetato 3M pH=5,2 (1/10 del volume iniziale) e 2,5 volumi di etanolo al 96%. I campioni sono stati conservati nuovamente a -80°C per almeno un'ora, dopodichè sono stati centrifugati per 15 minuti a 9000 rpm a 4°C; eliminato il supernatante, il *pellet* è stato lavato con etanolo al 70% in modo da eliminare i sali residui precipitati,

ricentrifugato per 5 minuti ed essiccato in un liofilizzatore (Eppendorf) in modo da eliminare ogni traccia di etanolo. Il *pellet* è stato quindi sospeso in 50 μL di acqua sterile.

3.8. Analisi quali-quantitativa dell'RNA totale estratto

Per determinare la concentrazione dell'RNA estratto e il suo grado di purezza, da ogni campione è stata prelevata un'aliquota di 4 μL e miscelata con 996 μL di acqua sterile, e per ogni campione sono state eseguite due letture allo spettrofotometro (modello 7800, Japan Spectroscopic Co. Ltd): una a 260 nm e una a 280 nm. L'RNA ha un massimo di assorbimento a 260 nm, quindi questa lettura permette di determinare la sua concentrazione in ogni campione.

Considerando che: $1 \text{ O.D.} \cong 40 \mu\text{g di RNA}$ (dove O.D. sta per densità ottica), la concentrazione di RNA nei campioni, espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sarà data dalla relazione:

$$[\text{RNA}] = \frac{\text{O.D.}_{260} \times 40 \mu\text{g}}{4 \mu\text{L}}$$

La purezza dell'RNA si determina attraverso il rapporto tra la lettura a 260 nm e la lettura a 280 nm, che rappresenta la lunghezza d'onda in cui le proteine hanno il massimo di assorbimento; tale rapporto deve essere compreso possibilmente tra 1,8 e 2. L'RNA totale estratto è stato quindi aliquotato (25 μg per tubo) e conservato a -20°C in una soluzione di acetato di sodio 3M pH=5,2 (1/10 del volume iniziale) ed etanolo al 96% (2,5 volumi).

3.9. Ibridazione delle sonde di cRNA marcato con l'RNA totale estratto

L'RNA totale estratto è stato messo a contatto con la sonda di cRNA marcata con ^{32}P . La sonda specifica per l'mRNA che codifica per la subunità di interesse del recettore GABA_A si lega alla porzione di un mRNA che avrà la sequenza complementare. Le sonde sono state utilizzate in forte eccesso molare rispetto all'mRNA per essere sicuri che tutto l'RNA messaggero da misurare possa ibridare. Nello stesso ambiente di reazione è stata messa anche la sonda complementare all'mRNA che codifica per la proteina ciclofillina. La ciclofillina è una proteina citoplasmatica la cui espressione è regolata per lo più in maniera *on-off* e, salvo qualche rara occasione, non viene alterata dai trattamenti farmacologici; per questo motivo è utilizzata come standard interno. Il saggio

dell'RNA protetto da RNasi (Follesa e Mocchetti, 1993; Follesa e Ticku, 1996) è stato eseguito utilizzando 25 µg di RNA totale per ogni campione. Tale aliquota di RNA totale è stata disciolta in 20 µL di soluzione di ibridazione contenente 150000 cpm della sonda di cRNA per la subunità di interesse del recettore GABA_A marcata con ³²P (attività specifica di 6-7 x 10⁷ cpm/µg RNA), e 15000 cpm della sonda di cRNA per la proteina costitutiva ciclofillina (attività specifica 1,5 x 10⁶ cpm/µg RNA). Il rapporto 1:10 tra le cpm utilizzate per la sonda della ciclofillina e quelle per la subunità del recettore GABA_A è stato adottato per via della più alta espressione del gene per la ciclofillina; questo rapporto permette di ottenere una intensità di banda del frammento protetto comparabile con quella della ciclofillina nella stessa lastra autoradiografica. Una volta aggiunto il *buffer* denaturante di ibridazione (formamide 80%, PIPES 40mM, EDTA 1mM pH=8, NaOAc 400mM pH=6,4) i campioni sono stati incubati in un bagnetto a secco per due minuti a 85°C al fine di denaturare le strutture secondarie dell'RNA, vorticati in modo che la soluzione si mescolasse bene, centrifugati brevemente e reincubati per 10 minuti a 85°C. Al termine di tale incubazione sono stati rapidamente spostati in un bagnetto a 50°C, e il rapido sbalzo di temperatura ha fatto sì che rimanessero denaturati. Quindi sono stati lasciati tutta la notte alla temperatura di 50°C per permettere l'ibridazione delle sonde antisense di cRNA con i corrispondenti mRNA.

3.10. Saggio dell'RNA protetto da RNasi (RPA)

Il giorno seguente l'ibridazione, i frammenti di RNA non ibridati sono stati digeriti con una soluzione contenente una miscela di RNasi A III (1 U/mL, Ambion) e RNasi T1 (200 U/mL, Ambion) in presenza di un *digestion buffer* costituito da LiCl₂ 0,1M, tris 10mM pH=7,5, EDTA 1mM pH=8, e NaOAc 0,2M pH=6,4. L'RNasi A, isolata dal pancreas bovino, attacca le molecole di RNA all'estremità 3' dei residui pirimidinici (C e U) e idrolizza il legame fosfato del nucleotide adiacente, lasciando gruppi 5'-OH e 3'-fosfato. La reazione non richiede cofattori né cationi bivalenti. I prodotti della digestione sono oligonucleotidi che terminano con pirimidina-3'-fosfato. L'RNasi T1 viene isolata dal fungo *Aspergillus*, attacca il 3'-fosfato delle guanine e taglia il legame fosfato con il nucleotide adiacente rilasciando oligonucleotidi col terminale guanosina-3'-fosfato (5'-nnn-G-3'-P). Le due RNasi sono in grado di digerire solo l'RNA a

singolo filamento, quindi tutto l'RNA e le sonde non ibridati. Nel corso della formazione dell'ibrido cRNA-mRNA si avrà la formazione di una regione a doppio filamento (che costituirà di fatto l'RNA protetto sul quale l'RNasi non può agire) e due regioni laterali di mRNA a singolo filamento (dato che la sonda è complementare all'mRNA solo per una porzione), che verranno digerite dall'RNasi proprio nel corso di questo passaggio. Anche la sonda presenta due porzioni laterali non ibridate; ciò è dovuto al fatto che durante la sua sintesi per trascrizione dal plasmide linearizzato, viene trascritta anche una regione più o meno ampia delle *poly linker region* (PLR) a seconda della posizione del sito di restrizione per la linearizzazione del plasmide. La conseguenza di ciò è quindi la sintesi di sonde con la regione effettivamente complementare all'mRNA d'interesse, più una porzione trascritta dalla PLR che verrà digerita dalle RNasi. Per la digestione dei singoli filamenti di RNA i campioni sono stati incubati per 30 minuti a 37°C. Al termine della digestione l'RNA si è stata degradata con una miscela di proteinasi K (Sigma) e sodio dodecilsolfato (SDS, Sigma) incubando i campioni per 15 minuti a 37°C. Il SDS denatura le proteine nelle loro subunità polipeptidiche, mentre la proteinasi K degrada le proteine denaturate catalizzando l'idrolisi dei legami peptidici interni. A questo punto per estrarre l'ibrido cRNA-mRNA in modo da purificarlo dalle proteine rimaste (proteinasi K e i frammenti digeriti delle RNasi) a ciascun campione sono stati aggiunti 250 µL di SEVAC, una miscela costituita da fenolo a pH basico, cloroformio ed alcol isoamilico in un rapporto di 25:24:1. Il fenolo (Carlo Erba), in natura acido, è stato reso basico saturandolo con tris 1M (che ha un pH di circa 9-10); per fare ciò è stato lavato più volte con questo tampone fino a quando la fase acquosa che sovrasta la fase organica non ha raggiunto il pH di 7,5-8. A questo punto al fenolo è stata aggiunta l'idrossichinolina (Sigma), che svolge diverse funzioni: conferisce una colorazione gialla al fenolo, rendendo maggiormente visibile la fase organica durante l'estrazione; virando in arancione, segnala se il fenolo, dopo un lungo periodo di conservazione, si è trasformato in acido benzoico e deve essere quindi eliminato; ha un'azione RNasica; è un antiossidante. Il cloroformio denatura le proteine e favorisce la separazione della miscela in due fasi (organica e acquosa). L'alcol isoamilico evita la formazione di schiuma da parte del SDS precedentemente aggiunto. La soluzione acquosa contenente l'RNA è stata agitata energicamente fino ad ottenere un'emulsione. Le

goccioline microscopiche di acqua e fenolo sono così entrate in contatto tra loro favorendo scambi molecolari di soluti: le proteine si sono disciolte nel fenolo (fase organica) mentre gli acidi nucleici sono rimasti nella fase acquosa. Le due fasi sono state quindi separate per centrifugazione. Spesso tra le due fasi è presente un residuo biancastro semisolido, costituito da proteine denaturate che non sono potute passare nella fase fenolica, in quanto già saturata. A questo punto è stata prelevata la fase acquosa superiore aspirandola con una pipetta, avendo cura di non prelevare né la fase organica inferiore, né lo strato proteico. Alla fase acquosa è stato poi aggiunto un uguale volume di cloroformio in modo da dissolvere il fenolo accidentalmente aspirato nel passaggio precedente. Anche in questo caso il cloroformio e la soluzione acquosa sono stati agitati energicamente e centrifugati in modo da ottenere una fase organica (inferiore) e una fase acquosa (superiore). Il cloroformio è stato quindi aspirato con una pipetta ed eliminato. Il passaggio successivo è consistito nella precipitazione dell'RNA, allo scopo di recuperarlo in forma solida; dopo essiccazione, è stato quindi ridisciolto alla concentrazione desiderata nel tampone usato per la successiva corsa elettroforetica. Per la precipitazione dell'RNA è stato usato alcol etilico ad alta concentrazione (2,5 volumi di etanolo puro per volume di campione). L'alcol etilico, insieme ai sali ad alta forza ionica presenti nella soluzione acquosa, (precedentemente introdotti con i tamponi usati per l'ibridizzazione e la digestione con RNasi), e al freddo (i campioni vengono incubati per 20 minuti in ghiaccio secco) fanno precipitare facilmente l'RNA. Il precipitato ottenuto è stato recuperato dopo centrifugazione. Gli acidi nucleici precipitati sono stati lavati con etanolo al 70% per essere ripuliti dai sali. I campioni sono stati poi essiccati e sospesi in un tampone denaturante, lo stesso mezzo con cui sono stati poi caricati nel gel di poliacrilamide. Questo tampone contiene due coloranti: lo xilene cianolo (Sigma) e il blu di bromofenolo (Sigma), che hanno una importante funzione indicativa durante la corsa elettroforetica, essendo possibile rilevare la posizione dei due coloranti e dei frammenti nucleotidici di peso molecolare noto. Scegliendo opportunamente la concentrazione del gel si può stabilire in maniera approssimativa in quale regione del gel stesso si trovano i campioni. Il tampone contiene anche formamide, che favorisce la denaturazione dell'ibrido, e glicerolo, che avendo una densità maggiore del tampone in cui è immerso il

gel per la corsa elettroforetica, facilita la deposizione dei campioni sul fondo dei pozzetti.

3.11. Separazione degli ibridi cRNA-mRNA per mezzo dell'elettroforesi su gel di poliacrilamide

Gli ibridi cRNA-mRNA formati sono stati individuati mediante una corsa elettroforetica su un gel denaturante di poliacrilamide al 5% (*poly-acrylamide-gel-electrophoresis, PAGE*). L'agente denaturante presente nel gel è l'urea 8M (USB). L'urea favorisce la denaturazione delle strutture secondarie dell'ibrido durante la corsa elettroforetica in modo tale che l'RNA migri in un campo elettrico solo in funzione del peso molecolare. Il gel di poliacrilamide si forma per polimerizzazione di monomeri di acrilamide in presenza di una piccola quantità di bis-acrilamide (NN'-metilene bis-acrilamide, Fluka). La bis-acrilamide è l'equivalente di due monomeri di acrilamide legati tra loro attraverso un gruppo metilico, ed è l'agente che forma legami trasversali con catene adiacenti di poliacrilamide per formare un reticolo tridimensionale. La reazione di polimerizzazione avviene per un meccanismo a catena di radicali liberi in presenza di ammonio persolfato (APS, Sigma) e N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED, Sigma): il TEMED catalizza la decomposizione degli ioni dell'ammonio per solfato, mentre l'ammonio persolfato è l'estere disolfato dell'acqua ossigenata, ed osmolizza rapidamente formando radicali liberi $SO_4^{\cdot-}$. I radicali liberi formati reagiscono a loro volta con l'acrilamide inducendo la polimerizzazione, che prosegue finché non si hanno più monomeri di acrilamide liberi. Le dimensioni dei pori di un gel di poliacrilamide possono essere controllate variando la quantità di monomero usato oppure aumentando il numero di legami trasversali in modo da ottenere dei pori più stretti. Nella pratica però il grado dei legami trasversali viene mantenuto costante, mentre si varia la percentuale di monomero. La temperatura ottimale di polimerizzazione è compresa tra i 25 e i 30°C, e si effettua in assenza di ossigeno, che ha una potente azione inibitrice nei confronti della reazione. La corsa elettroforetica avviene in celle in cui il gel è disposto verticalmente a ponte tra due elettrodi. I pozzetti in cui si caricano i campioni sono ricavati nella parte superiore del gel in prossimità del catodo. Poiché gli acidi nucleici sono molecole cariche negativamente, in un tampone a pH neutro o leggermente alcalino migrano

verso il polo positivo (anodo) che si trova nella parte inferiore del gel. Il gel allo stato liquido viene versato fra due lastre di vetro, alte 40 cm, separate tra loro da due spaziatori sottilissimi in *teflon* di circa 0,4 mm. In questo tipo di elettroforesi si sfrutta la lunghezza del gel per separare maggiormente le singole bande. Lo spessore sottilissimo del gel è necessario per aumentare la risoluzione delle bande stesse, inoltre assicura una miglior polimerizzazione tra acrilamide e poliacrilamide, garantendo un gel uniforme, ed infine disperde più rapidamente il calore. Infatti affinché l'RNA migri con una certa velocità questi gel molto grandi sono sottoposti a voltaggi e amperaggi elevatissimi, si genera quindi molto calore che tende a sciogliere il gel o a produrre una distorsione nelle corsie dando un effetto detto *smile*, per il fatto che i campioni caricati nelle corsie centrali migrano più velocemente di quelli caricati lateralmente. La temperatura ottimale per una corsa elettroforetica è di 50-60°C. Per la corsa è stato utilizzato un tampone a bassa forza ionica. Si tratta di una soluzione salina (borato di sodio) di trimetil-aminometano (tris-HCl) tamponato a pH=8 che ha garantito un'adeguata forza ionica e conducibilità del sistema elettroforetico. Il tampone conteneva anche sodio edatato, necessario per complessare i cationi bivalenti, cofattori di numerose nucleasi.

3.12. Autoradiografia e analisi d'immagine

Al termine della corsa elettroforetica le bande relative ai frammenti di mRNA protetti, separati in base al loro peso molecolare, sono state visualizzate tramite autoradiografia, mettendo il gel a contatto con una lastra fotografica. I livelli di mRNA codificante per la subunità di interesse del recettore GABA_A e di mRNA codificante per la ciclofillina sono stati determinati misurando la densità ottica delle bande corrispondenti sull'autoradiogramma, attraverso il software di scansione *Molecular Analyst* (Bio-Rad) e un densitometro (modello G-800, Bio-Rad). Tale strumento è calibrato per individuare i valori saturati, in modo tale che tutte le misure risultino comprese in un intervallo lineare. I dati sono stati normalizzati dividendo la densità ottica di ciascun frammento protetto di mRNA codificante per la subunità di interesse del recettore GABA_A per quelle del corrispondente frammento protetto di mRNA per la ciclofillina. La quantità degli mRNA per la subunità da misurare è stata quindi espressa in unità arbitrarie, e non ha consentito di determinare il valore assoluto della concentrazione degli

mRNA, bensì le sole variazioni percentuali dei singoli gruppi sperimentali rispetto a quelli di controllo.

4. ANALISI STATISTICA

I dati sono presentati come medie \pm SEM. Il significato statistico delle differenze è stato accertato tramite analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Scheffé. Un valore di probabilità inferiore allo 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

4. Risultati

1. EFFETTI DELL' ISOLAMENTO SOCIALE SUL CONSUMO VOLONTARIO DI ETANOLO IN TOPI SOCIALMENTE ISOLATI E IN GRUPPO

1.1. Analisi del consumo di acqua ed etanolo per animale singolo

Allo scopo di valutare gli effetti indotti dall'isolamento sociale sul consumo volontario di etanolo, gli animali sono stati isolati per 6 settimane e sono stati messi nelle condizioni di scegliere se bere acqua o etanolo per 2 ore di tempo, a partire da 30 minuti prima del ciclo del buio. Le bottiglie contenenti i liquidi sono state pesate all'inizio e al termine delle 2 ore di *free choice*; dopodiché, sono state calcolate le differenze di peso e successivamente riportate in un grafico (figura 4) dove in ascissa viene indicato il numero singolo degli animali (considerando solamente i GH EtOH e gli ISO EtOH) mentre in ordinata il consumo di acqua ed etanolo espresso in g/2h. Quello che si evince da tale grafico è che, al termine delle 6 settimane di esperimento, sia i GH che gli ISO che bevono etanolo mostrano una sensibile, ma non significativa, preferenza all'alcol rispetto all'acqua nelle 2 ore di tempo in cui avevano a disposizione la scelta dei due liquidi.

1.2. Analisi della preferenza al consumo di etanolo

Per valutare il consumo settimanale di solo etanolo, è stato preso in considerazione il peso settimanale di ogni singolo topo rapportato al consumo di etanolo in grammi. Tali dati sono serviti per costruire un grafico (figura 5) in cui in ascissa viene indicato il numero delle settimane mentre in ordinata il consumo di etanolo espresso in g/Kg di animale. Da notare che il numero delle settimane partono dalla seconda in poi dato che i primi 8 giorni di esperimento sono serviti come *training* di facilitazione alla bevuta di alcol. Da questo grafico emerge un dato di notevole importanza, e cioè che il gruppo degli isolati che bevono etanolo hanno una preferenza significativa alla bevuta di tale sostanza

rispetto agli animali in gruppo che bevono lo stesso liquido. La stessa cosa è stata fatta per valutare quale rapporto vi era fra il consumo di etanolo ed acqua degli ISO rispetto ai GH; ovvero di quante volte gli isolati preferiscono bere etanolo piuttosto che acqua rispetto agli animali in gruppo. Dal grafico di figura 6 si può notare infatti una preferenza significativa all'etanolo da parte degli animali isolati rispetto agli animali *group housed*.

Considerando i valori ottenuti da questi grafici, è stato interessante valutare anche quale fosse il consumo settimanale di acqua ed etanolo rispetto al liquido totale consumato. Nel grafico mostrato in figura 7, viene espressa la variazione percentuale, settimana per settimana, di acqua ed etanolo rispetto al liquido totale e si evince che, a differenza dei grafici precedenti, non vi è una significativa preferenza al consumo di un liquido rispetto all'altro sia nei GH che negli ISO che hanno libera scelta di bere alcol o acqua.

Un altro dato interessante è che esaminando tutti e 4 i gruppi sperimentali, si nota che ancora una volta gli animali isolati tendono a preferire il consumo di etanolo invece dell'acqua rispetto agli altri gruppi. Tale evidenza la si può notare nella figura 8, in cui viene illustrato un grafico in cui il consumo dei due liquidi viene indicato come variazione percentuale rispetto al liquido totale consumato e dove appare che gli isolati che bevono etanolo hanno una preferenza significativa per tale sostanza se paragonati al gruppo di controllo GH EtOH.

2. EFFETTI DELL'ISOLAMENTO SOCIALE E DEL CONSUMO VOLONTARIO DI ETANOLO SULLE MODIFICAZIONI DELL'ESPRESSIONE GENICA DELLE SUBUNITÀ α_1 , α_4 E δ DEL RECETTORE $GABA_A$ NELL'IPPOCAMPO

2.1. Analisi dei livelli degli mRNA codificanti per le subunità α_1 e α_4

Nell'ippocampo di topi C57BL/6J, l'isolamento sociale e il consumo volontario di etanolo non hanno portato ad una variazione dei livelli del trascritto codificante per la subunità α_1 (figura 9) in tutti i gruppi sperimentali. Tale evidenza risulterebbe in contrasto con l'ipotesi che l'esposizione prolungata all'etanolo ridurrebbe l'espressione genica della subunità α_1 (Devaud et al., 1995).

In contrasto, l'isolamento sociale e il consumo volontario di etanolo hanno portato ad una variazione dei livelli del trascritto codificante per la subunità α_4 (figura 10); in particolare vi è stato un significativo incremento dei livelli del

messaggero codificante per la subunità α_4 del recettore GABA_A. Tale incremento è stato pari a $+20 \pm 2,94\%$ per quanto riguarda il gruppo sperimentale degli isolati che bevono solo acqua in confronto al gruppo di controllo GH H₂O. Negli altri gruppi sperimentali non si è avuta nessuna variazione significativa di espressione per tale messaggero. Il dato interessante da notare è che l'aumento di espressione genica della subunità α_4 è avvenuto negli animali isolati che hanno bevuto solo acqua, quindi fenomeno probabilmente attribuibile all'effetto dell'isolamento sociale e non all'abuso di etanolo.

2.2. Analisi dei livelli degli mRNA codificanti per la subunità δ

Nell'ippocampo di topi C57BL/6J, l'isolamento sociale e il consumo volontario di etanolo hanno portato ad una variazione dei livelli del trascritto codificante per la subunità δ (figura 11); in particolare c'è stato un incremento nell'espressione genica della subunità δ per tutti i gruppi sperimentali rispetto al gruppo di controllo GH H₂O; più precisamente tali incrementi sono stati pari a: $+37 \pm 3,51\%$ per quanto riguarda gli isolati che bevono solo acqua; $+89 \pm 15,74\%$ per quanto riguarda gli animali in gruppo che bevono acqua ed etanolo; $+37 \pm 3\%$ per quanto riguarda gli isolati che bevono acqua ed etanolo.

Questi risultati indicano quindi che nell'ippocampo dei topi sottoposti allo stress dell'isolamento sociale si crea un riarrangiamento delle proprietà plastiche e funzionali dei recettori GABA_A.

5. Discussione

1. ISOLAMENTO SOCIALE E SENSIBILITÀ ALL'ETANOLO

1.1. Steroidi neuroattivi

L'etanolo, come lo stress e i farmaci inibitori del recettore GABA_A (Barbaccia et al., 1997), incrementa i livelli di 3 α ,5 α -THP e 3 α ,5 α -THDOC nel cervello e nel plasma (Barbaccia et al., 1999; VanDoren et al., 2000), tali effetti si è pensato fossero dipendenti dalla stimolazione dell'asse HPA, dato che i loro incrementi vengono aboliti in seguito ad adrenalectomia (Khisti et al., 2002; O'Dell et al., 2004). La somministrazione acuta di etanolo incrementa i livelli cerebrocorticali e plasmatici di progesterone, 3 α ,5 α -THP e 3 α ,5 α -THDOC in un gran numero di campioni di ratti sottoposti ad isolamento sociale rispetto agli animali in gruppo (Serra et al., 2003). Questa incrementata sensibilità dei ratti isolati agli effetti dell'etanolo potrebbe essere spiegata dalla *facilitatory trace*; ovvero una iperattività dell'asse HPA ai nuovi stimoli, sviluppata durante lo stress cronico (Akana et al., 1992). Questo è in accordo col fatto che vi è un incremento della risposta funzionale dell'HPA su ratti isolati in seguito ad uno stimolo stressante acuto (Serra et al., 2000). Inoltre, la somministrazione acuta di etanolo in ratti isolati aumenta le concentrazioni di 3 α ,5 α -THP soprattutto nella corteccia cerebrale rispetto al plasma (Serra et al., 2003), dato coerente con l'osservazione che l'etanolo incrementa la sintesi locale di neurosteroidi nel cervello indipendentemente dall'asse HPA (Sanna et al., 2004).

1.2. StAR

In accordo con precedenti studi (Kim et al., 2003), è stato osservato che la somministrazione acuta di etanolo induce un rapido cambiamento dell'espressione della proteina StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) nel cervello (Serra et al., 2006). Tuttavia, è stato inoltre visto che l'etanolo induce un marcato incremento dei livelli di mRNA di tale proteina nella corteccia cerebrale di ratti isolati (+38 \pm 12%) rispetto agli animali di gruppo (+24 \pm 10%).

Inoltre, l'etanolo induce una riduzione dell'isoforma di 37-kDa del peptide ($+55 \pm 13\%$) nella corteccia cerebrale di ratti socialmente isolati, mentre induce un incremento dei livelli di entrambe le isoforme della proteina StAR nella corteccia degli animali di gruppo. Dal momento che i meccanismi molecolari sulla funzione della proteina StAR risultano essere ancora ancora poco chiari (Sierra, 2004), non è ancora possibile spiegare gli effetti opposti dell'etanolo sui livelli delle due isoforme della proteina nella corteccia cerebrale di ratti socialmente isolati. Altri ricercatori hanno dimostrato che vi è un incremento dei livelli dell'isoforma 32 (o 30)-kDa della StAR rispetto a un decremento dei livelli dell'isoforma di 37-kDa (Kimoto et al., 2001; Shibuya et al., 2003). Considerando il fatto che il precursore dell'isoforma di 37-kDa viene sintetizzato nel citoplasma e successivamente convertito nella forma di 32-kDa durante il suo incorporamento all'interno della membrana mitocondriale (Lin et al., 1995), i nostri dati suggeriscono che la velocità di conversione della forma definitiva (32-kDa) della proteina StAR nella corteccia cerebrale potrebbe essere incrementata dagli effetti dell'etanolo in ratti isolati. Quindi, l'incrementata sensibilità alla produzione di steroidi neuroattivi da parte dell'etanolo in ratti socialmente isolati potrebbe essere attribuibile, almeno in parte, all'incremento dei livelli della proteina StAR nel cervello.

1.3. Funzionalità del recettore GABA_A

La capacità dell'etanolo di incrementare l'ampiezza degli mIPSCs (iperpolarizzazioni postsinaptiche in miniatura) risulta marcatamente più grande in fettine di ippocampo di ratti isolati rispetto ai ratti di gruppo. Infatti, è stato osservato che l'etanolo ad una concentrazione di 50 mM incrementa significativamente l'ampiezza degli mIPSCs nei neuroni di ratti isolati (Serra et al., 2006). Inoltre, l'osservazione che il ritardato effetto dell'etanolo sull'ampiezza degli mIPSCs viene inibita dalla finasteride supporta l'idea che quest'azione dell'etanolo venga mediata da un aumentato incremento della produzione di $3\alpha,5\alpha$ -THP. Queste osservazioni suggeriscono che l'iperattività dell'asse HPA non sia l'unico meccanismo responsabile del marcato effetto dell'etanolo sulle concentrazioni di steroidi neuroattivi nel cervello di ratti socialmente isolati. L'incrementata sensibilità da parte dell'etanolo in neuroni di ratti isolati può essere ricondotta ad un aumento delle concentrazioni di $3\alpha,5\alpha$ -

THP indotta dall'etanolo stesso in questi animali piuttosto che ad un cambiamento della risposta dei recettori GABA_A postsinaptici da parte degli steroidi neuroattivi. Tale conclusione viene supportata dal fatto che vi è una differenza negli effetti del 3 α ,5 α -THP a concentrazioni di 1 o 3 μ M nell'evocare un ampiezza sinaptica degli IPSCs in neuroni piramidali della regione CA1 tra animali isolati e di gruppo (Serra et al., 2006).

1.4. Studi comportamentali

L'effetto anticonvulsivante dell'etanolo può essere ricondotto all'incremento che tale molecola produce sulle concentrazioni di 3 α ,5 α -THP nel cervello e alla conseguente azione che si ha a livello della funzione dei recettori GABA_A. infatti, l'inibizione della sintesi degli steroidi da parte della finasteride previene l'effetto anticonvulsivante dell'etanolo (VanDoren et al., 2000). La straordinaria efficacia dell'etanolo nell'incrementare i livelli di 3 α ,5 α -THP nel cervello di ratti isolati viene associata ad un'ulteriore capacità che ha l'etanolo di antagonizzare le convulsioni indotte dalla molecola isoniazide. Infatti, l'etanolo in acuto è in grado di inibire le convulsioni indotte dall'isoniazide in ratti isolati, come osservato dal grande ritardo nell'insorgenza dei sintomi convulsivi e dalla ridotta percentuale di animali che manifestano le convulsioni, ma non ha nessun effetto sulle convulsioni indotte dall'isoniazide nei ratti di gruppo (Serra et al., 2006). L'incremento dell'efficacia anticonvulsivante dell'etanolo indotta sui ratti isolati, viene abolita dal pre-trattamento con finasteride. Tale molecola riduce il ritardo di insorgenza delle convulsioni indotte dall'isoniazide negli animali di gruppo ma non nei ratti isolati; questo è in accordo col fatto che i livelli basali di 3 α ,5 α -THP nel cervello vengono ridotti dall'isolamento sociale. La riduzione dei livelli di 3 α ,5 α -THP nel cervello indotta dall'isolamento sociale è anche responsabile, almeno in parte, del fatto che vi è un incremento della vulnerabilità alle convulsioni negli animali isolati. I topi isolati inoltre risultano essere più suscettibili agli attacchi epilettici indotti dalla picrotossina rispetto ai topi di gruppo (Matsumoto et al., 2003). Tutte queste osservazioni, sono in accordo col fatto che vi è un incremento della suscettibilità alle convulsioni indotte da molecole come l'acido kainico, il pentilentetrazolo, la picrotossina, o le β -carboline osservate in animali soggetti ad astinenza da 3 α ,5 α -THP (Frye & Bayon, 1998; Moran & Smith, 1998; Frye & Bayon, 1999; Reddy et al., 2001).

In contrasto, gli animali isolati mostrano una riduzione della sensibilità agli effetti dell'etanolo e del 3 α ,5 α -THP nel test dell'*elevated plus-maze*. L'effettiva dose di etanolo (2 g/kg, IP) o di 3 α ,5 α -THP (2,5 μ g per animale, intracerebroventricolare) somministrata agli animali di gruppo, non è in grado di suscitare un effetto ansiolitico negli animali isolati. Infatti, si è resa necessaria un'alta dose di etanolo (da 3 a 3,5 g/kg) o di 3 α ,5 α -THP (3 μ g per ratto) per incrementare le entrate e il tempo speso nei bracci aperti del *maze* da parte degli animali isolati (Hirani et al., 2005). Inoltre, è stato osservato che l'isolamento sociale è in grado di inibire, nei topi, l'azione ipnotica dell'etanolo (Matsumoto et al., 1996).

2. EFFETTI CRONICI DELL'ETANOLO E ISOLAMENTO SOCIALE

2.1. Steroidi neuroattivi

Nonostante alcuni gruppi di ricerca abbiano studiato l'influenza dell'esposizione cronica all'etanolo nei livelli di steroidi neuroattivi, molti di questi studi hanno esaminato il possibile ruolo di tali steroidi sui meccanismi molecolari di tolleranza e dipendenza dall'etanolo. Studi differenti hanno mostrato che la somministrazione cronica dell'etanolo altera le concentrazioni del 3 α ,5 α -THP. Attraverso l'utilizzo di un modello sperimentale di dipendenza da alcol, Cagetti et al. (2004) hanno dimostrato che i ratti esposti ad intossicazione intermittente di etanolo manifestavano una riduzione dei livelli di 3 α ,5 α -THP nell'ippocampo, due giorni dopo l'astinenza. Gli autori hanno ipotizzato che questo decremento potrebbe contribuire alla manifestazione dei sintomi nella sindrome da astinenza da alcol. Infatti, sono state riscontrate delle riduzioni dei livelli di steroidi neuroattivi nel plasma di pazienti affetti da sindrome da astinenza (Romeo et al., 1996).

I livelli cecrebrocorticali di 3 α ,5 α -THP sono significativamente ridotti in ratti e topi etanolo-dipendenti (Janis et al., 1998). Devaud et al. (1996) scoprirono che l'effetto anticonvulsivante degli steroidi neuroattivi si riduceva, eccetto per il 3 α ,5 α -THP, nei ratti in seguito a trattamento cronico con etanolo. In accordo con questi risultati, è stato visto che il consumo volontario di etanolo non modifica i livelli cerebrocorticali del 3 α ,5 α -THP nei ratti di gruppo (10,8 \pm 3,1 *versus* 9,7 \pm 2,0 ng per grammo di proteina).

Dal momento che l'isolamento sociale rappresenta un modello di stress cronico,

che il $3\alpha,5\alpha$ -THP è fra i più potenti modulatori positivi endogeni del sistema GABAergico (Majewska, 1992) e che le concentrazioni di questo steroide risultano essere ridotte negli animali socialmente isolati (Serra et al., 2000), l'incremento del consumo di etanolo nei ratti isolati potrebbe essere la conseguenza di un effetto compensatorio di questa sostanza attribuibile all'incremento delle concentrazioni di questo steroide endogeno, ad azione ansiolitica, indotto dal consumo di etanolo.

2.2. Plasticità e funzionalità del recettore GABA_A

L'isolamento sociale incrementa l'espressione dei livelli delle subunità α_4 e δ del recettore GABA_A nell'ippocampo (Serra et al., 2006): da una parte il consumo volontario di etanolo fallisce nel modificare i livelli di immunoreattività della subunità α_4 nell'ippocampo di ratti isolati o in gruppo, mentre dall'altra vi è un piccolo incremento dei livelli di immunoreattività della subunità δ nell'ippocampo di ratti isolati e in gruppo. I recettori GABA_A contenenti la subunità δ sono presenti peculiarmente a livello extrasinaptico (Nusser et al., 1998) e sono capaci di mediare la conduttanza delle correnti toniche GABAergiche (Nusser e Mody, 2002; Stell e Mody, 2002). L'ampiezza della corrente tonica mediata dai recettori GABA_A in cellule granulari del giro dentato nell'ippocampo, risulta maggiore nei ratti isolati rispetto agli animali di gruppo (Serra et al., 2006) ed inoltre risulta essere incrementata negli animali socialmente isolati sottoposti a consumo volontario di etanolo; come dimostrato da un'ulteriore riduzione della corrente tonica di fondo indotta dalla bicucullina 20 μ M, un antagonista del recettore GABA_A. Tali dati suggeriscono che il consumo volontario di etanolo in animali socialmente isolati potrebbe indurre nuova sintesi di recettori GABA_A contenenti la subunità α_4 i quali presentano già la subunità δ .

Inoltre, si evidenzia il fatto che vi è una ridotta risposta sinaptica da parte dei recettori GABA_A nell'ippocampo di animali socialmente isolati con libero accesso all'etanolo, come dimostrato dall'osservazione che l'etanolo 50 mM incrementa l'ampiezza degli mIPSCs mediata dai recettori GABA_A in neuroni piramidali della regione CA1 in ratti socialmente isolati ma non negli animali isolati e sottoposti a consumo volontario di etanolo per 30 giorni. Tutti questi dati avvalorano l'ipotesi che la presenza della subunità δ non è un requisito fondamentale per avere una maggiore sensibilità, a basse concentrazioni di

etanolo, da parte dei recettori GABA_A (Carta et al., 2004; Borghese et al., 2006).

3. CONCLUSIONI

Sin dal momento della scoperta che i recettori GABA_A sono il target di molecole come le benzodiazepine, barbiturici, etanolo ecc. capaci di modulare la soglia di eccitabilità cellulare e lo stato emozionale, un grande sforzo è stato fatto per definire quali siano i componenti endogeni putativi in grado di agire su questi recettori. Le scoperte che alcuni derivati degli steroidi, come il 3 α ,5 α -THP e il 3 α ,5 α -THDOC, sono fra i più efficaci e potenti modulatori positivi dei recettori GABA_A hanno aperto una visione rivoluzionaria sui meccanismi endogeni capaci di modulare le funzioni di queste popolazioni neuronali che in specifiche aree cerebrali giocano un ruolo cruciale sul controllo affettivo ed emozionale strettamente collegato alle funzioni cognitive. Ancora, le susseguenti evidenze cliniche che mostrano che i livelli plasmatici di questi steroidi neuroattivi vanno incontro a grandi fluttuazioni non solamente in condizioni fisiologiche (quali stress, ciclo mestruale, gravidanza, menopausa) ma anche in condizioni patologiche associate ad alterazione della sfera emozionale ed affettiva assieme alla scoperta che molecole psicotrope (come gli antidepressivi, antipsicotici atipici, stabilizzanti dell'umore) sono capaci di incrementare i livelli di questi ormoni nel plasma, nel liquido cerebrospinale e nel cervello, danno un importante indicazione sul ruolo cruciale che questi ormoni hanno nel modulare svariate funzioni cerebrali. Quindi, l'evidenza che fluttuazioni naturali di steroidi neuroattivi durante condizioni fisiologiche siano associate a cambiamenti dell'attività da parte dei recettori GABA_A e all'espressione genica di specifiche subunità di tali recettori, è stata recentemente seguita da scoperte che mostrano che altre condizioni fisiologiche, sperimentali o farmacologiche, come il ciclo mestruale, lo stress cronico (ad es. l'isolamento sociale), la somministrazione cronica di etanolo e la sua astinenza, sono in grado di modificare drammaticamente l'espressione genica e la funzionalità dei recettori GABA_A e il conseguente comportamento sociale attraverso selettivi cambiamenti nella funzione dei meccanismi capaci di controllare la steroidogenesi periferica e centrale.

Da tutte queste considerazioni, viene supportata l'idea che gli steroidi neuroattivi giochino un ruolo cruciale nella modulazione fisiologica e

farmacologica dell'espressione genica e della funzionalità dei recettori GABA_A nel cervello dei mammiferi. Quindi, uno scompenso nella sintesi e nel rilascio di questi ormoni potrebbe essere un fattore importante nella patofisiologia di alcuni disordini mentali, e nella plasticità, a breve e a lungo termine, del sistema nervoso centrale di adattarsi in risposta ai cambiamenti ambientali.

Uno dei principali scopi di questo studio è stato quello di cercare di capire se l'isolamento sociale post-svezzamento dei topi C57BL/6J potesse rappresentare un valido modello di autosomministrazione di etanolo per poter cercare di capire poi quali meccanismi siano coinvolti nell'interazione fra stress ed etanolo. In accordo coi risultati di altri studi condotti nei ratti (Hall et al., 1998; Schenk et al., 1990) e nei topi C57BL/6J (Advani et al., 2007; Lopez et al., 2010; Yanai e Ginsburg, 1976) i risultati proposti mostrano che in topi dello stesso ceppo esposti al test del *free choice*, durante un periodo di isolamento di sei settimane post-svezzamento, si è avuta una significativa preferenza alla scelta dell'etanolo rispetto all'acqua se comparati ai rispettivi controlli non isolati. È interessante notare che l'incremento dell'autosomministrazione di etanolo, vista nel mio studio, era già evidente a due settimane dall'isolamento sociale, ovvero durante la prima esposizione alla libera scelta fra etanolo 15% ed acqua, suggerendo che questi giovani animali avrebbero accumulato un livello di stress tale da indurre un incremento alla suscettibilità all'etanolo già nei primi giorni dell'isolamento sociale. In accordo con tali osservazioni, lo stress neonatale indotto dalla separazione materna, solitamente durante le prime due settimane di vita, porterebbe ad un incremento del consumo di etanolo nel ratto adulto (Gustafsson e Nylander, 2006; Huot et al., 2001; Ploj et al., 2003; Roman et al., 2005) e nei topi (Cruz et al., 2008). D'altro canto, Lopez et al., hanno mostrato che se si isolano dei topi adulti, questi consumano etanolo in egual misura dei topi abituati all'isolamento da più tempo. Questi risultati, suggeriscono che l'isolamento sociale post-svezzamento dei topi maschi C57BL/6J rappresenta un valido modello di autosomministrazione di etanolo utilizzabile per lo studio dei meccanismi neurochimici e molecolari coinvolti nell'interazione fra stress cronico post-natale ed abuso di etanolo in età adulta. Numerose alterazioni comportamentali, incluse l'attività locomotoria e il comportamento esploratorio causate dall'isolamento sociale, sono state studiate sia nei ratti che nei topi (Arndt et al., 2009; Fone e Porkess, 2008;

Pietropaolo et al., 2008; Voikar et al., 2005). Nel mio studio, i topi isolati mostrano una ridotta attività locomotoria spontanea se sottoposti a nuovo ambiente rispetto agli animali di gruppo. Questi risultati sono in contrasto con altri studi dove si è visto che gli animali socialmente isolati mostrano iperattività motoria (Pietropaolo et al., 2008). Tuttavia, altri autori non hanno riscontrato dei cambiamenti, se non in maniera lieve, riguardo l'attività motoria (Arndt et al., 2009; Voikar et al., 2005), mentre altri (Valzelli et al., 1974) hanno riportato una riduzione dell'attività simile ai miei dati. Le ragioni di tale variabilità locomotoria risulta essere ancora poco chiara.

L'osservazione che vi è una riduzione dei livelli di concentrazione del 3 α ,5 α -TH PROG nell'ippocampo di topi socialmente isolati, è in accordo con precedenti studi che mostrano un risultato simile nella corteccia cerebrale e nel plasma di topi (Matsumoto et al., 1999) e di ratti (Serra et al., 2000). Il libero accesso all'etanolo in entrambi i gruppi sperimentali (topi GH e ISO) tende leggermente a ridurre la concentrazione del 3 α ,5 α -TH PROG nell'ippocampo; anche se questa differenza non risulta essere statisticamente significativa. Tali risultati sono in accordo con dei recenti studi eseguiti nel ratto in cui si è visto che i livelli cerebrocorticali del 3 α ,5 α -TH PROG risultano essere ridotti negli animali isolati sottoposti a consumo libero di etanolo (Pisu et al., 2010). Ciononostante, nello stesso studio è stato visto che il consumo volontario di etanolo abolisce l'ipersensibilità degli animali socialmente isolati sottoposti a nuovi stress acuti, come dimostrato dal lieve incremento delle concentrazioni nei livelli cerebrocorticali del 3 α ,5 α -TH PROG indotto dal test del *foot-schock* (Pisu et al., 2010).

L'analisi dei potenziali post-sinaptici eccitatori di campo (fEPSPs), registrati nella regione CA1 dell'ippocampo dei topi socialmente isolati, hanno rivelato che lo stress dell'isolamento causa uno spostamento verso destra della relazione I/O se comparata con gli animali di gruppo; questo dato suggerisce che l'isolamento sociale porterebbe ad un decremento dell'eccitabilità neuronale. Tale evidenza sembra essere in accordo con altri studi che mostrano dei cambiamenti simili nella regione CA1 della cavia (Bartesaghi, 2004) e risultano essere in linea anche con altri risultati dove si è visto un certo grado di riduzione del potenziamento a lungo termine (LTP) indotto dalla stimolazione ad alta frequenza (HFS) nella regione CA1 di animali socialmente

isolati. D'altra parte, la riduzione dell'eccitabilità ippocampale e della plasticità sinaptica a lungo termine potrebbe essere rilevante per quanto concerne i deficit di apprendimento e di memoria che sono stati riportati nei topi C57BL/6J socialmente isolati (Voikar et al., 2005) così come nei ratti (Bianchi et al., 2006; Lu et al., 2003).

In accordo con le osservazioni precedenti viste nel ratto (Pisu et al., 2010; Serra et al., 2006) l'isolamento sociale indurrebbe delle alterazioni dell'espressione genica delle subunità del recettore GABA_A nell'ippocampo di topi C57BL/6J; più precisamente un incremento dell'espressione genica delle subunità α_4 e δ , un decremento dell'espressione genica della subunità γ_2 ma nessuna modificazione riguardo la subunità α_1 .

Una delle principali evidenze di questo studio è che l'autosomministrazione di etanolo in topi socialmente isolati, blocca selettivamente l'incremento dell'espressione genica della subunità α_4 ma non delle subunità δ e γ_2 . L'azione specifica dell'etanolo sull'espressione della subunità α_4 potrebbe essere spiegata dall'effetto ansiolitico che l'etanolo esplicherebbe. In accordo con questa ipotesi, la presenza della subunità α_4 è stata associata ad un incremento dello stato ansioso (Smith et al., 1998b) e la soppressione della sua espressione preverrebbe le proprietà d'astinenza degli steroidi endogeni (Smith et al., 1998a). Inoltre, l'incrementata espressione genica della subunità α_4 indotta dall'astinenza da etanolo può essere prevenuta dal trattamento con diazepam e con GHB durante l'astinenza (Follesa et al., 2003).

I risultati di questa tesi mostrano, inoltre, che il consumo di etanolo induce dei cambiamenti dell'espressione genica del recettore GABA_A nei topi di gruppo; in particolare riduce i livelli ippocampali della subunità γ_2 ed incrementa l'espressione genica della subunità δ . Questi effetti molecolari sembrerebbero in accordo col fatto che l'etanolo somministrato cronicamente potrebbe portare a dei marcati cambiamenti dell'espressione delle subunità del recettore GABA_A sia a livello di espressione degli mRNA e sia a livello di traduzione proteica in varie regioni cerebrali (Grobin et al., 2000). È stato inoltre dimostrato, che l'esposizione cronica all'etanolo induce degli aumenti significativi della subunità δ e delle riduzioni di espressione della subunità γ_2 in neuroni ippocampali (Follesa et al., 2005), mentre non si hanno effetti per quanto riguarda l'espressione della subunità α_4 (Matthews et al., 1998), la quale aumenta di

livello di espressione solamente dopo aver indotto l'astinenza da etanolo (Sanna et al., 2003). I risultati da me riportati dimostrano che l'assunzione volontaria di etanolo, in topi socialmente isolati, ha una selettiva influenza sull'espressione genica della subunità α_4 e potrebbe non antagonizzare l'*up-regulation* della subunità δ e la *down regulation* della subunità γ_2 ; risultato che sembra in accordo col fatto che l'etanolo cronico, di per se, induce degli aumenti e delle riduzioni di espressione genica rispettivamente delle subunità δ e γ_2 (Follesa et al., 2005, Sanna et al., 2003).

Agli incrementi di espressione delle subunità α_4 e δ nell'ippocampo di topi isolati, si associa anche un incremento dell'azione modulatoria da parte della molecola THIP (agonista selettivo dei recettori GABA_A) sulle correnti toniche GABAergiche registrate in cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo. Tali evidenze sono in accordo con precedenti studi eseguiti sui ratti (Serra et al., 2006), in cui si evince che lo stress da isolamento sociale induce un incremento di espressione dei recettori GABA_A extrasinaptici responsabili della componente tonica dell'inibizione GABAergica in questi sottotipi cellulari.

In aggiunta, nel mio studio, è stato mostrato che l'assunzione volontaria di etanolo ha prodotto un debole effetto sugli aumenti delle correnti toniche THIP-stimolate rispetto agli effetti misurati nelle cellule granulari dei topi socialmente isolati, ed inoltre, questi deboli aumenti, non risultano statisticamente significativi se comparati con gli animali di controllo. Considerando che il consumo di etanolo in topi socialmente isolati contrasta gli aumenti di espressione della subunità α_4 , ma non della δ , l'attenuazione delle correnti toniche potrebbe essere dipendente da queste opposte regolazioni di espressione genica della subunità α_4 da parte dell'etanolo. D'altro canto, i marcati incrementi delle correnti toniche THIP-stimolate osservate nelle cellule granulari dei topi *group housed*, potrebbero essere collegati ad un incremento dei livelli di espressione genica della sola subunità δ ; dimostrando ancora una volta, che l'autosomministrazione volontaria di etanolo potrebbe regolare selettivamente l'espressione e la funzionalità dei recettori che presentano le subunità α_4 e δ .

Al consumo volontario di etanolo, in topi socialmente isolati, è stato inoltre associato un selettivo incremento della frequenza delle correnti spontanee post-sinaptiche (sIPSCs) mediate dai recettori GABA_A nelle cellule granulari del giro

dentato; effetto probabilmente in linea con l'aumento del rilascio di GABA da parte dei terminali pre-sinaptici. Un gran numero di studi eseguiti in diverse aree cerebrali, hanno riportato che la somministrazione acuta di etanolo coinvolgerebbe il rilascio di GABA pre-sinaptico (Ariwodola e Weiner, 2004, Carta et al., 2003, Roberto et al., 2003; Sanna et al., 2004), anche se il meccanismo molecolare alla base di tali effetti risulta essere ancora poco chiaro. Nel mio studio, non sono state eseguite delle applicazioni acute di etanolo su fettine di ippocampo; ciononostante, i risultati ottenuti suggeriscono che il consumo volontario di etanolo in topi socialmente isolati avrebbe degli effetti specifici sui meccanismi coinvolti nel rilascio pre-sinaptico di GABA.

L'analisi dell'ampiezza e della costante del tempo di decadimento delle sIPSCs fasiche registrate nelle cellule granulari del giro dentato, hanno rivelato che non vi è alcuna alterazione significativa in risposta all'isolamento sociale o al consumo volontario di etanolo, nonostante vi sia una *down regulation* di espressione genica della subunità γ_2 in queste popolazioni neuronali. Tali evidenze risultano essere simili ad altre riportate in diversi studi in cui si dimostra che alla *down regulation* della subunità γ_2 durante il ciclo ovarico (Maguire et al., 2005) e durante la gravidanza (Maguire e Mody, 2008, Sanna et al., 2009) non vengono associati cambiamenti dei parametri cinetici delle correnti sinaptiche.

In conclusione, i risultati riportati in questa tesi suggeriscono che l'etanolo, in seguito a consumo volontario, potrebbe esplicare la sua azione ansiolitica a livello molecolare attraverso il blocco selettivo dell'espressione genica della subunità α_4 del recettore GABA_A: subunità che risulta essere associata agli effetti ansiogeni (Smith et al., 1998b).

Alla luce di tutte queste osservazioni, risulta evidente che l'autosomministrazione volontaria di etanolo potrebbe non essere sufficiente per poter spiegare i punti ancora poco chiari; quindi saranno necessari ulteriori studi che faranno luce su nuovi meccanismi neurochimici, molecolari e funzionali alla base delle modificazioni indotte dallo stress dell'isolamento sociale.

6. Bibliografia

- Adkins CE, Pillai GV, Kerby J, Bonnert TP, Haldon C, McKernan RM, Gonzales JE, Oades K, Whiting PJ, Simpson PB. (2001). $\alpha_4\beta_3\delta$ GABA_A receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J. Biol. Chem.* 276:38934-38939.
- Advani T, Hensler JG, Koek W. (2007). *Effect of early rearing conditions on alcohol drinking and 5-HT_{1A} receptor function in C57BL/6J mice.* *Int J Neuropsychopharmacol.* 2007 Oct;10(5):595-607. Epub 2006 Nov 30.
- Akana SF, Dallman MF, Bradbury MJ, Scribner KA, Strack AM, Walker CD. (1992). *Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress.* *Endocrinology.* 1992 Jul;131(1):57-68.
- Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Horsley CJ, Milligan ED, Bhatnagar S, Dallman MF. (1999). *Interactions among chronic cold, corticosterone and puberty on energy intake and deposition.* *Stress.* 1999 Dec;3(2):131-46.
- Albeck DS, McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, Nikulina J, McEwen BS, Sakai RR. (1997). *Chronic social stress alters levels of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin mRNA in rat brain.* *J Neurosci.* 1997 Jun 15;17(12):4895-903.
- Ariwodola OJ, Weiner JL. (2004). *Ethanol potentiation of GABAergic synaptic transmission may be self-limiting: role of presynaptic GABA(B) receptors.* *J. Neurosci.* 24(47):10679-86.
- Arndt SS, Laarakker MC, van Lith HA, van der Staay FJ, Gieling E, Salomons AR, van't Klooster J, Ohl F. (2009). *Individual housing of mice--impact on behaviour and stress responses.* *Physiol Behav.* 2009 Jun 22;97(3-4):385-93. Epub 2009 Mar 18.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Purdy RH, Mostallino MC, Concas A, Biggio G. (1997). *The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations.* *Br J Pharmacol.* 1997 Apr;120(8):1582-8.
- Barbaccia ML, Affricano D, Trabucchi M, Purdy RH, Colombo G, Agabio R, Gessa GL. (1999). *Ethanol markedly increases "GABAergic" neurosteroids in alcohol-preferring rats.* *Eur J Pharmacol.* 1999 Nov 19;384(2-3):R1-2.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. (1998). *International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function.* *Pharmacol. Rev.* 50:291-310.
- Bartesaghi R. (2004). *Effect of early isolation on the synaptic function in the dentate gyrus and field CA1 of the guinea pig.* *Hippocampus.* 2004;14(4):482-98.
- Bianchi M, Fone KF, Azmi N, Heidbreder CA, Hagan JJ, Marsden CA. (2006). *Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus.* *Eur J Neurosci.* 2006 Nov;24(10):2894-902. Epub 2006 Nov 20.
- Biggio G, Dazzi L, Biggio F, Mancuso L, Talani G, Busonero F, Mostallino MC, Sanna E, Follesa P. (2003). *Molecular mechanisms of tolerance to and withdrawal of GABA(A) receptor modulators.* *Eur. Neuropsychopharmacol.* 13(6):411-23.
- Biggio G, Concas A, Follesa P, Serra M. (2007). *Stress, ethanol, and neuroactive steroids.* *Pharmacol Ther.* 2007 Oct;116(1):140-71. Epub 2007 May 8.

- Borghese CM, Stórustovu S, Ebert B, Herd MB, Belelli D, Lambert JJ, Marshall G, Wafford KA, Harris RA. (2006). *The δ subunit of γ -aminobutyric acid type A receptors does not confer sensitivity to low concentrations of ethanol*. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Mar;316(3):1360-8. Epub 2005 Nov 4.
- Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M. (1996). *Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA_A receptors*. J. Physiol. (Lond.) 497:753–759.
- Britton DR, Varela M, Garcia A, Rosenthal M. (1986). *Dexamethasone suppresses pituitary-adrenal but not behavioral effects of centrally administered CRF*. Life Sci. 1986 Jan 20;38(3):211-6.
- Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA. (2002). *Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human $\alpha_4\beta_3\delta$ GABA_A receptors*. Brit. J. Pharmacol. 136:965-974.
- Cagetti E, Liang J, Spigelman I, Olsen RW. (2003). *Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABA_A receptors*. Mol. Pharmacol. 63:53-64.
- Cagetti E, Pinna G, Guidotti A, Baicy K, Olsen RW. (2004). *Chronic intermittent ethanol (CIE) administration in rats decreases levels of neurosteroids in hippocampus, accompanied by altered behavioral responses to neurosteroids and memory function*. Neuropharmacology. 2004 Mar;46(4):570-9.
- Carta M, Ariwodola OJ, Weiner JL, Valenzuela CF. (2003). *Alcohol potently inhibits the kainate receptor-dependent excitatory drive of hippocampal interneurons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 6813-6818.
- Carta M, Mameli M, Valenzuela CF. (2004). *Alcohol enhances GABAergic transmission to cerebellar granule cells via an increase in Golgi cell excitability*. J Neurosci. 2004 Apr 14;24(15):3746-51.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal. Biochem. 162(1):156-9.
- Chomczynski P, Sacchi N. (2006). *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. Nat. Protoc. 1(2):581-5.
- Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G. (1998). *Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27;95(22):13284-9.
- Cruz FC, Quadros IM, Planeta Cda S, Miczek KA. (2008). *Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake*. Psychopharmacology (Berl). 2008 Dec;201(3):459-68. Epub 2008 Sep 3.
- De Goeij DC, Kvetnansky R, Whitnall MH, Jezova D, Berkenbosch F, Tilders FJ. (1991). *Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats*. Neuroendocrinology. 1991 Feb;53(2):150-9.
- Devaud LL, Smith FD, Grayson DR, Morrow AL. (1995). *Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of gamma-aminobutyric acidA receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis*. Mol. Pharmacol. 48(5):861-8.
- Devaud LL, Purdy RH, Finn DA, Morrow AL. (1996). *Sensitization of gamma-aminobutyric acidA receptors to neuroactive steroids in rats during ethanol withdrawal*. J Pharmacol Exp Ther. 1996 Aug;278(2):510-7.

- Devaud LL, Fritschy JM, Sieghart W, Morrow AL. (1997). *Bidirectional alterations of GABA(A) receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal*. J. Neurochem. 69(1):126-30.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B. (1998). *Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the γ_2 subunit and gephyrin*. Nat. Neurosci. 1(7):563-571.
- Fénelon VS, Herbison AE. (1996). *Plasticity in GABA_A receptor subunit mRNA expression by hypothalamic magnocellular neurons in the adult rat*. J Neurosci. 1996 Aug 15;16(16):4872-80.
- Follesa P, Mocchetti I. (1993). *Regulation of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor mRNA by beta-adrenergic receptor activation and adrenal steroids in rat central nervous system*. Mol.Pharmacol. 43(2):132-8.
- Follesa P, Ticku MK. (1996). *Chronic ethanol treatment produces a selective upregulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons*. Brain Res. Mol. Brain Res. 36:211-218.
- Follesa P, Floris S, Tuligi G, Mostallino MC, Concas A, Biggio G. (1998). *Molecular and functional adaptation of the GABA(A) receptor complex during pregnancy and after delivery in the rat brain*. Eur J Neurosci. 1998 Sep;10(9):2905-12.
- Follesa P, Serra M, Cagetti E, Pisu MG, Porta S, Massa F, Sanna E, Biggio G. (2000). *Allopregnagnolone Synthesis in Cerebellar Granule Cells: Roles in Regulation of GABA_A Receptor Expression and Function During Progesterone Treatment and Withdrawal*. Mol. Pharmacol. 57:1262-1270.
- Follesa P, Cagetti E, Mancuso L, Biggio F, Manca A, Maciocco E, Massa F, Desole MS, Carta M, Busonero F, Sanna E, Biggio G. (2001). *Increase in expression of the GABA(A) receptor alpha(4) subunit gene induced by withdrawal of, but not by long-term treatment with, benzodiazepine full or partial agonists*. Brain. Res. Mol. Brain. Res. 92:138-148.
- Follesa P, Mancuso L, Biggio F, Cagetti E, Franco M, Trapani G, Biggio G. (2002). *Changes in GABA(A) receptor gene expression induced by withdrawal of, but not by long-term exposure to, zaleplon or zolpidem*. Neuropharmacology 42:191-198.
- Follesa P, Mancuso L, Biggio F, Mostallino MC, Manca A, Mascia MP, Busonero F, Talani G, Sanna E, Biggio G. (2003). *Gamma-hydroxybutyric acid and diazepam antagonize a rapid increase in GABA(A) receptors alpha(4) subunit mRNA abundance induced by ethanol withdrawal in cerebellar granule cells*. Molecular Pharmacology Mol Pharmacol. 63(4):896-907.
- Follesa P, Mostallino MC, Biggio F, Gorini G, Caria S, Busonero F, Murru L, Mura ML, Sanna E, Biggio G. (2005). *Distinct patterns of expression and regulation of GABA receptors containing the delta subunit in cerebellar granule and hippocampal neurons*. J Neurochem. 2005 Aug;94(3):659-71. Epub 2005 Jul 5.
- Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, Biggio G. (2006). *Neurosteroids, GABA_A receptors, and ethanol dependence*. Psychopharmacology 186:267-280.
- Fone KC, Porkess MV. (2008). *Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders*. Neurosci Biobehav Rev. 2008 Aug;32(6):1087-102. Epub 2008 Mar 18.
- Frye CA, Bayon LE. (1998). *Seizure activity is increased in endocrine states characterized by decline in endogenous levels of the neurosteroid 3 alpha,5 alpha-THP*. Neuroendocrinology. 1998 Oct;68(4):272-80.
- Frye CA, Bayon LE. (1999). *Cyclic withdrawal from endogenous and exogenous progesterone increases kainic acid and perforant pathway induced seizures*. Pharmacol Biochem Behav. 1999 Feb;62(2):315-21.
- Frye GD, Fincher A. (1996). *Sensitivity of postsynaptic GABA_B receptors on hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons to ethanol*. Brain Res. 735(2):239-48.

- Grobin AC, Matthews DB, Devaud LL, Morrow AL. (1998). *The role of GABA_A receptors in the acute and chronic effects of ethanol*. Psychopharmacology (Berl.) 139:2-19.
- Grobin AC, Papadeas ST, Morrow AL. (2000). *Regional variations in the effects of chronic ethanol administration on GABA(A) receptor expression: potential mechanisms*. Neurochem Int. 2000 Nov-Dec;37(5-6):453-61.
- Gustafsson L, Nylander I. (2006). *Time-dependent alterations in ethanol intake in male wistar rats exposed to short and prolonged daily maternal separation in a 4-bottle free-choice paradigm*. Alcohol Clin Exp Res. 2006 Dec;30(12):2008-16.
- Hall FS, Huang S, Fong GW, Pert A, Linnoila M. (1998). *Effects of isolation-rearing on voluntary consumption of ethanol, sucrose and saccharin solutions in Fawn Hooded and Wistar rats*. Psychopharmacology (Berl). 1998 Oct;139(3):210-6.
- Hamann M, Rossi DJ, Attwell D. (2002). *Tonic and spillover inhibition of granule cells control information flow through cerebellar cortex*. Neuron 33:625-633.
- Harris RA, Valenzuela CF, Brozowski S, Chuang L, Hadingham K, Whiting PJ. (1998). *Adaptation of γ -aminobutyric acid type A receptors to alcohol exposure: studies with stably transfected cells*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 284(1):180-8.
- Hilakivi LA, Ota M, Lister RG. (1989). *Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral 'despair'*. Pharmacol Biochem Behav. 1989 Jun;33(2):371-4.
- Hirani K, Sharma AN, Jain NS, Ugale RR, Chopde CT. (2005). *Evaluation of GABAergic neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnane-20-one as a neurobiological substrate for the anti-anxiety effect of ethanol in rats*. Psychopharmacology (Berl). 2005 Jul;180(2):267-78. Epub 2005 Feb 18.
- Hoffman AR, Ceda G, Reisine TD. (1985). *Corticotropin-releasing factor desensitization of adrenocorticotrophic hormone release is augmented by arginine vasopressin*. J Neurosci. 1985 Jan;5(1):234-42.
- Holt RA, Bateson AN, Martin IL. (1996). *Chronic treatment with diazepam or abecarnil differently affects the expression of GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat cortex*. Neuropharmacology 35:1457-1463.
- Holt RA, Martin IL, Bateson AN. (1997). *Chronic diazepam exposure decreases transcription of the rat GABA(A) receptor gamma2-subunit gene*. Brain Res. Mol. Brain Res. 48(1):164-6.
- Huot RL, Thivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM. (2001). *Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment*. Psychopharmacology (Berl). 2001 Dec;158(4):366-73. Epub 2001 May 16.
- Janis GC, Devaud LL, Mitsuyama H, Morrow AL. (1998). *Effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on the neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in male and female rats*. Alcohol Clin Exp Res. 1998 Dec;22(9):2055-61.
- Juárez J, Vázquez-Cortés C. (2003). *Alcohol intake in social housing and in isolation before puberty and its effects on voluntary alcohol consumption in adulthood*. Dev Psychobiol. 2003 Nov;43(3):200-7.
- Kang MG, Spigelman I, Olsen RW. (1998). *Alteration in the sensitivity of GABA_A receptors to allosteric modulatory drugs in rat hippocampus after chronic intermittent ethanol treatment*. Alcohol Clin. Exp. Res. 22:2165-2173.
- Khisti RT, Penland SN, VanDoren MJ, Grobin AC, Morrow AL. (2002). *GABAergic neurosteroid modulation of ethanol actions*. World J. Biol. Psychiatry. 3(2):87-95.
- Khisti RT, VanDoren MJ, O'Buckley T, Morrow AL. (2003). *Neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one modulates ethanol-induced loss of righting reflex in rats*. Brain Res. 8;980(2):255-65.

- Kim HJ, Ha M, Park CH, Park SJ, Youn SM, Kang SS, Cho GJ, Choi WS. (2003). *StAR and steroidogenic enzyme transcriptional regulation in the rat brain: effects of acute alcohol administration*. Brain Res Mol Brain Res. 2003 Jul 4;115(1):39-49.
- Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, Makino J, Tamura Ho, Hojo Y, Takata N, Kawato S. (2001). *Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis*. Endocrinology. 2001 Aug;142(8):3578-89.
- Klein RL, Harris RA. (1996). *Regulation of GABA_A receptor structure and function by chronic drug treatments in vivo and with stably transfected cells*. Jpn. J. Pharmacol. 70(1):1-15.
- Lapiz MD, Fulford A, Muchimapura S, Mason R, Parker T, Marsden CA. (2001). *Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behaviour and neurotransmission*. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2001 Jun;87(6):730-51.
- Laurie DJ, Seeburg PH, Wisden W. (1992). *The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum*. J. Neurosci. 12: 1063-1076.
- Lewohl JM, Crane DI, Dodd PR. (1997). *Expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$ isoforms of the GABA_A receptor in human alcoholic brain*. Brain Res. 751(1):102-12.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. (1995). *Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis*. Science. 1995 Mar 24;267(5205):1828-31.
- Lopez MF, Doremus-Fitzwater TL, Becker HC. (2010). *Chronic social isolation and chronic variable stress during early development induce later elevated ethanol intake in adult C57BL/6J mice*. Alcohol. 2010 Sep 28.
- Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Bluethmann H, Mohler H, Rudolph U. (2000). *Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety*. Science 290:131-134.
- Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L. (2003). *Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments*. Exp Neurol. 2003 Oct;183(2):600-9.
- Ma L, Song L, Radoi GE, Harrison NL. (2004). *Transcriptional regulation of the mouse gene encoding the alpha-4 subunit of the GABA_A receptor*. J Biol Chem. 2004 Sep 24;279(39):40451-61. Epub 2004 Jul 20.
- Macdonald RL, Olsen RW. (1994). *GABA_A receptor channels*. Annu. Rev. Neurosci. 17: 569-602.
- Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I. (2005). *Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety*. Nat. Neurosci. 8(6):797-804.
- Maguire JL, Mody I. (2008). *GABA(A)R plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression*. Neuron. 2008 Jul 31;59(2):207-13.
- Majewska MD. (1992). *Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance*. Prog Neurobiol. 1992;38(4):379-95.
- Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacák K, Palkovits M, Gold PW. (1995). *Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress*. Endocrinology. 1995 Oct;136(10):4517-25.
- Matsumoto K, Ojima K, Watanabe H. (1996). *Neurosteroidal modulation of social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep in mice*. Brain Res. 1996 Feb 5;708(1-2):1-6.
- Matsumoto K, Uzunova V, Pinna G, Taki K, Uzunov DP, Watanabe H, Mienville JM, Guidotti A, Costa E. (1999). *Permissive role of brain allopregnanolone content in the regulation of pentobarbital-induced righting reflex loss*. Neuropharmacology. 1999 Jul;38(7):955-63.

- Matsumoto K, Nomura H, Murakami Y, Taki K, Takahata H, Watanabe H. (2003). *Long-term social isolation enhances picrotoxin seizure susceptibility in mice: up-regulatory role of endogenous brain allopregnanolone in GABAergic systems*. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003 Jul;75(4):831-5.
- Matthews DB, Devaud LL, Fritschy JM, Sieghart W, Morrow AL. (1998). *Differential regulation of GABA(A) receptor gene expression by ethanol in the rat hippocampus versus cerebral cortex*. *J Neurochem.* 1998 Mar;70(3):1160-6.
- Mayo-Smith MF. (1997). *Pharmacological management of alcohol withdrawal. A meta-analysis and evidence-based practice guideline. American Society of Addiction Medicine Working Group on Pharmacological Management of Alcohol Withdrawal*. *The J. of the American Medical Association* 278:144-151.
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack R, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whitig PJ. (2000). *Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor α 1 subtype*. *Nature Neuroscience* 3:587-592.
- Mehta AK, Ticku MK. (1999). *An update on GABA_A receptors*. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999 Apr;29(2-3):196-217.
- Mody I. (2001). *Distinguishing between GABA_A receptors responsible for tonic and phasic conductances*. *Neurochem. Res.* 26:907-913.
- Moran MH, Smith SS. (1998). *Progesterone withdrawal I: pro-convulsant effects*. *Brain Res.* 1998 Oct 5;807(1-2):84-90.
- Morrow AL. (1995). *Regulation of GABA_A receptor function and gene expression in the central nervous system*. *Int. Rev. Neurobiol.* 38:1-41. Review.
- Morrow AL, Janis GC, VanDoren MJ, Matthews DB, Samson HH, Janak PH, Grant KA. (1999). *Neurosteroids mediate pharmacological effects of ethanol: a new mechanism of ethanol action?* *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23(12):1933-40.
- Morrow AL, VanDoren MJ, Penland SN, Matthews DB. (2001). *The role of GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence*. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37(1-3):98-109. Review.
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. (1998). *Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells*. *J Neurosci.* 1998 Mar 1;18(5):1693-703.
- Nusser Z, Mody I. (2002). *Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells*. *J Neurophysiol.* 2002 May;87(5):2624-8.
- O'Dell LE, Alomary AA, Vallée M, Koob GF, Fitzgerald RL, Purdy RH. (2004). *Ethanol-induced increases in neuroactive steroids in the rat brain and plasma are absent in adrenalectomized and gonadectomized rats*. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jan 26;484(2-3):241-7.
- Ojima K, Matsumoto K, Tohda M, Watanabe H. (1995). *Hyperactivity of central noradrenergic and CRF systems is involved in social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep*. *Brain Res.* 1995 Jun 26;684(1):87-94.
- Olsen RW, Tobin AJ. (1990). *Molecular biology of GABA_A receptors*. *FASEB J.* 4: 1469-1480.
- Paivarinta P. (1990). *Social isolation increases the stimulatory effect of ethanol on locomotor activity*. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990 Jun;36(2):401-3.
- Parker V, Morinan A. (1986). *The socially-isolated rat as a model for anxiety*. *Neuropharmacol.* 25: 663-664.
- Pietropaolo S, Singer P, Feldon J, Yee BK. (2008). *The postweaning social isolation in C57BL/6 mice: preferential vulnerability in the male sex*. *Psychopharmacology (Berl).* 2008 May;197(4):613-28. Epub 2008 Mar 4.

- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. (2000). *GABA_A receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain*. Neuroscience 101:815-850.
- Pisu MG, Mostallino MC, Dore R, Maciocco E, Secci PP, Serra M. (2010). *Effects of voluntary ethanol consumption on emotional state and stress responsiveness in socially isolated rats*. Eur Neuropsychopharmacol. 2010 Nov 8.
- Ploj K, Roman E, Nylander I. (2003). *Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats*. Neuroscience. 2003;121(3):787-99.
- Poelchen W, Proctor WR, Dunwiddie TV. (2000). *The in vitro ethanol sensitivity of hippocampal synaptic gamma-aminobutyric acid(A) responses differs in lines of mice and rats genetically selected for behavioral sensitivity or insensitivity to ethanol*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 295(2):741-6.
- Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers BB, Ymer S, Kettenmann H, Shofield PR, Seeburg PH. (1989). *Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology*. Nature (Lond.) 338: 582-585.
- Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM. (1991). *Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 May 15;88(10):4553-7.
- Reddy DS, Kim HY, Rogawski MA. (2001). *Neurosteroid withdrawal model of perimenstrual catamenial epilepsy*. Epilepsia 42, 328–336.
- Rivier C, Bruhn T, Vale W. (1984). *Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF)*. J Pharmacol Exp Ther. 1984 Apr;229(1):127-31.
- Rivier C, Vale W. (1987). *Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: a pituitary-mediated mechanism*. Endocrinology. 1987 Oct;121(4):1320-8.
- Rivier C, Rivier J, Lee S. (1996). *Importance of pituitary and brain receptors for corticotrophin-releasing factor in modulating alcohol-induced ACTH secretion in the rat*. Brain Res. 1996 May 20;721(1-2):83-90.
- Roberto M, Madamba SG, Moore SD, Tallent MK, Siggins GR. (2003). *Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Feb 18;100(4):2053-8. Epub 2003 Feb 3.
- Roman E, Gustafsson L, Hyytiä P, Nylander I. (2005). *Short and prolonged periods of maternal separation and voluntary ethanol intake in male and female ethanol-preferring AA and ethanol-avoiding ANA rats*. Alcohol Clin Exp Res. 2005 Apr;29(4):591-601.
- Romeo E, Brancati A, De Lorenzo A, Fucci P, Furnari C, Pompili E, Sasso GF, Spalletta G, Troisi A, Pasini A. (1996). *Marked decrease of plasma neuroactive steroids during alcohol withdrawal*. Clin Neuropharmacol. 1996 Aug;19(4):366-9.
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Mohler H. (1999). *Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes*. Nature 401:796-800.
- Samson HH. (1986). *Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats*. Alcohol Clin Exp Res. 1986 Aug;10(4):436-42.
- Sanna E, Busonero F, Talani G, Carta M, Massa F, Peis M, Maciocco E, Biggio G. (2002). *Comparison of the effects of zaleplon, zolpidem, and triazolam at various GABA_A receptor subtypes*. Eur. J. of Pharmacol. 451:103-110.
- Sanna E, Mostallino MC, Busonero F, Talani G, Tranquilli S, Mamei M, Spiga S, Follesa P, Biggio G. (2003). *Changes in GABA_A receptor gene expression associated with selective alterations in receptor function and pharmacology after ethanol withdrawal*. J. Neurosci. 23:11711-11724.

- Sanna E, Talani G, Busonero F, Pisu MG, Purdy RH, Serra M, Biggio G. (2004). *Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABA_A receptor activity in rat hippocampus*. J. Neurosci. 24(29):6521-30.
- Sanna E, Mostallino MC, Murru L, Carta M, Talani G, Zucca S, Mura ML, Maciocco E, Biggio G. (2009). *Changes in expression and function of extrasynaptic GABAA receptors in the rat hippocampus during pregnancy and after delivery*. J Neurosci. 2009 Feb 11;29(6):1755-65.
- Saxena NC, Macdonald RL. (1994). *Assembly of GABA_A receptor subunits role of the δ subunit*. J. Neurosci. 14(11 Pt 2):7077-86.
- Saxena NC, Macdonald RL. (1996). *Properties of putative cerebellar γ -aminobutyric acid A receptor isoforms*. Mol. Pharmacol. 49:567-579.
- Schenk S, Gorman K, Amit Z. (1990). *Age-dependent effects of isolation housing on the self-administration of ethanol in laboratory rats*. Alcohol. 1990 Jul-Aug;7(4):321-6.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM. (2003). *GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition*. Nat. Neurosci. 6:484-490.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA. (2004). *Tonically active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone*. Trends Neurosci. 27:262-269.
- Serra M, Pisu MG, Littera M, Papi G, Sanna E, Tuveri F, Usala L, Purdy RH, Biggio G. (2000). *Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain*. J Neurochem. 2000 Aug;75(2):732-40.
- Serra M, Pisu MG, Floris I, Cara V, Purdy RH, Biggio G. (2003). *Social isolation-induced increase in the sensitivity of rats to the steroidogenic effect of ethanol*. J Neurochem. 2003 Apr;85(1):257-63.
- Serra M, Mostallino MC, Talani G, Pisu MG, Carta M, Mura ML, Floris I, Maciocco E, Sanna E, Biggio G. (2006). *Social isolation-induced increase in alpha and delta subunit gene expression is associated with a greater efficacy of ethanol on steroidogenesis and GABA receptor function*. J Neurochem. 2006 Jul;98(1):122-33.
- Shibuya K, Takata N, Hojo Y, Furukawa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T, Suzuki K, Tanabe N, Ishii H, Mukai H, Takahashi T, Hattori TA, Kawato S. (2003). *Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction*. Biochim Biophys Acta. 2003 Feb 17;1619(3):301-16.
- Sierra A. (2004). *Neurosteroids: the StAR protein in the brain*. J Neuroendocrinol. 2004 Sep;16(9):787-93.
- Siggins GR, Nie Z, Madamba SG. (1999). *A metabotropic hypothesis for ethanol sensitivity of GABAergic and glutamatergic central synapses*. In Y. Liu & W.A. Hunt (Eds.), *The Drunken Synapse* (pp. 135-143). New York: Plenum.
- Sinnott RS, Phillips TJ, Finn DA. (2002). *Alteration of voluntary ethanol and saccharin consumption by the neurosteroid allopregnanolone in mice*. Psychopharmacology (Berl). 162(4):438-47.
- Smith SS, Gong QH, Hsu FC, Markowitz RS, French-Mullen JM, Li X. (1998a). *GABA(A) receptor alpha4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid*. Nature 392:926-930.
- Smith SS, Gong QH, Li X, Moran MH, Bitran D, Frye CA, Hsu FC. (1998b). *Withdrawal from 3alpha-OH-5alpha-pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABAA-gated current and increases the GABAA receptor alpha4 subunit in association with increased anxiety*. J Neurosci. 1998 Jul 15;18(14):5275-84.
- Snell LD, Nunley KR, Lickteig RL, Browning MD, Tabakoff B, Hoffman PL. (1996). *Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoreactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion*. Brain Res Mol Brain Res. 1996 Aug;40(1):71-8.

- Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Fuchs K, Sieghart W. (1997). *GABA_A receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits*. Neuroscience 80:987-1000.
- Stell BM, Mody I. (2002). *Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons*. J Neurosci. 2002 May 15;22(10):RC223. Epub 2002 May 10.
- Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong QH, Sabado TN, Li X, Light A, Wiedmann M, Williams K, Smith SS. (2002). *Hormonally regulated alpha(4)beta(2)delta GABA(A) receptors are a target for alcohol*. Nat Neurosci. 5(8):721-722.
- Thorsell A, Slawecki CJ, Khoury A, Mathe AA, Ehlers CL. (2005). *Effect of social isolation on ethanol consumption and substance P/neurokinin expression in Wistar rats*. Alcohol. 2005 Jun;36(2):91-7.
- Tian J, Lu Y, Zhang H, Chau CH, Dang HN, Kaufman DL. (2004). *Gamma-aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model*. J Immunol. 2004 Oct 15;173(8):5298-304.
- Valzelli L, Bernasconi S, Gomba P. (1974). *Effect of isolation on some behavioral characteristics in three strains of mice*. Biol Psychiatry. 1974 Dec;9(3):329-34.
- VanDoren MJ, Matthews DB, Janis GC, Grobin AC, Devaud LL, Morrow AL. (2000). *Neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one modulates electrophysiological and behavioral actions of ethanol*. J Neurosci. 2000 Mar 1;20(5):1982-9.
- Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA. (2000). *Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity*. Biol Psychiatry. 2000 May 15;47(10):864-73.
- Voikar V, Polus A, Vasar E, Rauvala H. (2005). *Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences*. Genes Brain Behav. 2005 Jun;4(4):240-52.
- Wafford KA, Burnett DM, Leidenheimer NJ, Burt DR, Wang JB, Kofuji P, Dunwiddie TV, Harris RA, Sikela JM. (1991). *Ethanol sensitivity of the GABA_A receptor expressed in Xenopus oocytes requires 8 amino acids contained in the gamma 2L subunit*. Neuron. 7(1):27-33.
- Wallner M, Hancher HJ, Olsen RW. (2003). *Ethanol enhances $\alpha_4 \beta_3 \delta$ and $\alpha_6 \beta_3 \delta \gamma$ -aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100(25):15218-15223.
- Wan FJ, Berton F, Madamba SG, Francesconi W, Siggins GR. (1996). *Low ethanol concentrations enhance GABAergic inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal pyramidal neurons only after block of GABA_B receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93(10):5049-54.
- Weiner JL, Gu C, Dunwiddie TV. (1997). *Differential ethanol sensitivity of subpopulations of GABA_A synapses onto rat hippocampal CA1 pyramidal neurons*. J. Neurophysiol. 77(3):1306-12.
- Weiner JL, Valenzuela CF. (2006). *Ethanol modulation of GABAergic transmission: the view from the slice*. Pharmacol. Ther. 11(3):533-54.
- Whiting PJ, McKernan RM, Iversen LL. (1990). *Another mechanism for creating diversity in GABA_A receptors: RNA-splicing direct expression of two forms of γ_2 subunit, one which contains a protein Kinase C phosphorylation site*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:9966-9970.
- Willner P. (1984). *The validity of animal models of depression*. Psychopharmacology (Berl). 1984;83(1):1-16.
- Wisden W, Herb A, Wieland H, Keinanen K, Luddens H, Seeburg PH. (1991). *Cloning, pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABA(A) receptor alpha(4) subunit*. FEBS Lett. 289:227-230.

- Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH. (1992). *The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon diencephalon, mesencephalon*. J. Neurosci. 12:1040-1062.
- Wohlfarth KM, Bianchi MT, Macdonald RL. (2002). *Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA_A receptors containing the δ subunit*. J. Neurosci. 22:1541-1549.
- Wolffgramm J. (1990). *Free choice ethanol intake of laboratory rats under different social conditions*. Psychopharmacology (Berl). 1990;101(2):233-9.
- Wongwitdecha N, Mardsen CA. (1996). *Effects of social isolation rearing on learning in the Morris water maze*. Brain Res. 1996 Apr 9;715(1-2):119-24.
- Wu PH, Poelchen W, Proctor WR. (2005). *Differential GABA_B Receptor Modulation of Ethanol Effects on GABA(A) synaptic activity in hippocampal CA1 neurons*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 312(3):1082-9.
- Yanai J, Ginsburg BE. (1976). *Increased sensitivity to chronic ethanol in isolated mice*. Psychopharmacologia. 1976 Mar 16;46(2):185-9.

7. Figure e tabelle

Subunità del recettore GABA _A	Localizzazione cromosomica
δ	1
$\alpha_2, \alpha_4, \beta_1, \gamma_1$	4
$\alpha_1, \alpha_6, \beta_2, \gamma_2$	5
ρ_1, ρ_2	6
$\alpha_5, \beta_3, \gamma_3$	15
$\alpha_3, \beta_4, \epsilon$	X

Tabella 1

Cluster dei geni codificanti per le subunità dei recettori GABA_A sui cromosomi umani.

INSERTO cDNA	SEQUENZA DEI PRIMER
α_1	5'-CCAGAAAAGCCAAAGAAAGTGAAGGATCCT-3' 5'-GGGTTCTGGCGGTTTTGTCTCAGGCTTGAC-3' (Tian et al., 2004)
α_4	5'-TACACCTGGACCAAAGGCC-3' 5'-TCTGTGTGTTTCTCCTTCAGCACA-3' (Ma et al., 2004)
δ	5'-GACTACGTGGGCTCCAACCTGGA-3' 5'-ACTGTGGAGGTGATGCGGATGCT-3' (Tian et al., 2004)

Tabella 2

Sequenze nucleotidiche degli inneschi (*primer*) utilizzati per la sintesi di frammenti di cDNA complementari agli mRNA codificanti per le varie subunità del recettore GABA_A, come descritto nei metodi. Per evitare appaiamenti errati con mRNA di sequenza simile, ciascun paio di *primer* per le varie subunità del recettore GABA_A è stato progettato per includere le sequenze di cDNA con il minor grado possibile di omologia tra le subunità e per originare molecole di lunghezza tale da poter essere utilizzate insieme nello stesso esperimento, in modo tale da poter misurare mRNA diversi nello stesso campione.

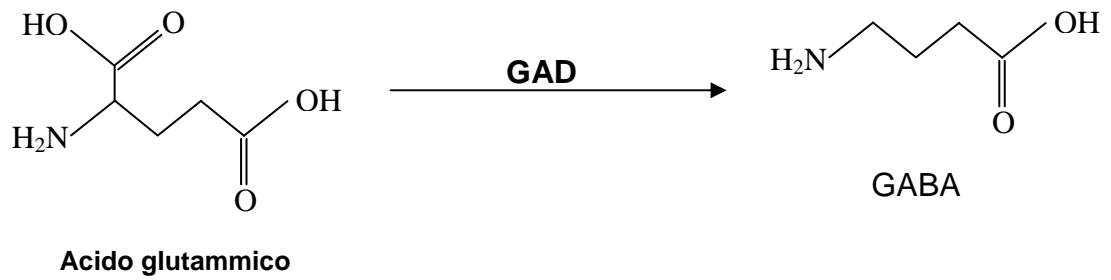


Figura 1

Rappresentazione schematica della sintesi e della formula di struttura del GABA a partire dall'acido glutammico.

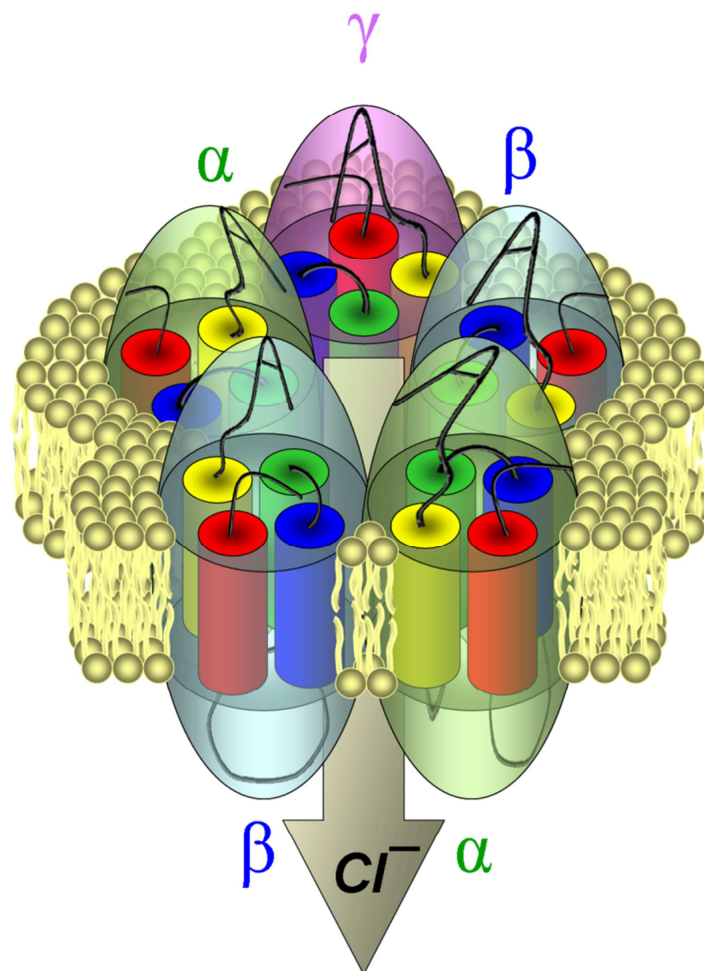


Figura 2

Rappresentazione schematica della struttura molecolare del recettore GABA_A. Sono indicate le tre differenti subunità α , β e γ , necessarie per costituire un recettore funzionalmente sensibile all'azione delle benzodiazepine. Le cinque subunità sono assemblate a formare un canale permeabile allo ione Cl^- .

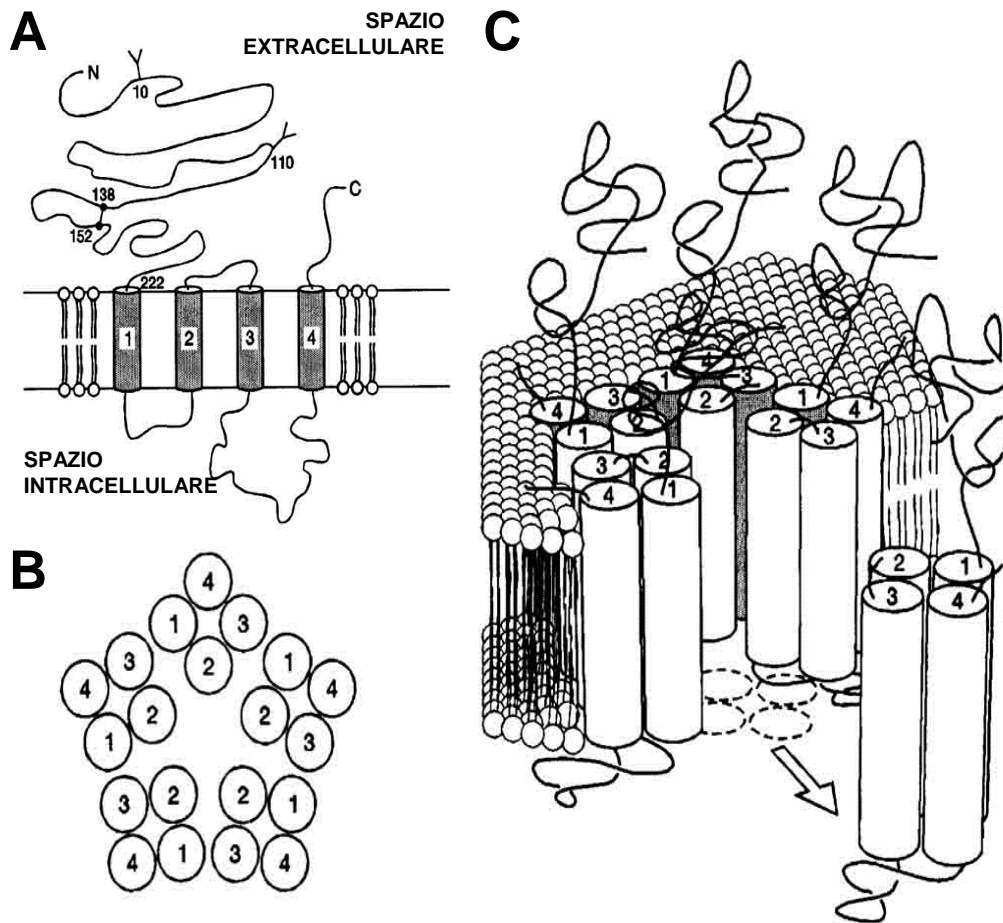


Figura 3

Rappresentazione schematica della struttura molecolare pentamerica del recettore GABA_A. In ciascuna subunità **(A)** il residuo N-terminale consiste in una lunga sequenza (222 Aa) che si estende nel compartimento extracellulare. I residui di Asn in posizione 10 e 110 sono glicosilati e un ponte disolfuro unisce le due Cys in posizione 138 e 152. La catena aminoacidica è composta da quattro passi transmembrana, e una lunga ansa intracellulare collega i domini transmembrana 3 e 4. Cinque subunità, ognuna formata da quattro domini **(B)**, sono assemblate a formare un canale centrale permeabile allo ione Cl⁻ **(C)** (modificata da [MacDonald e Olsen, 1994](#)).

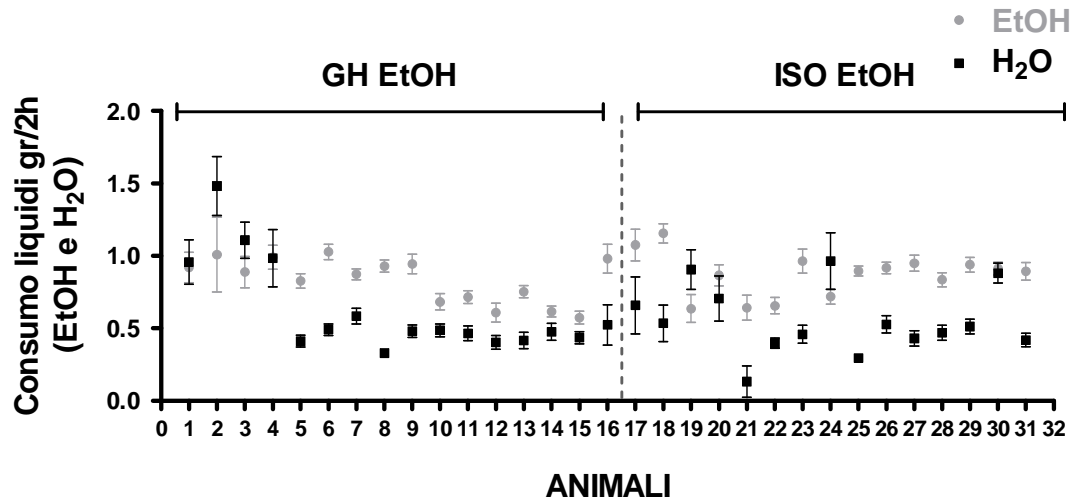


Figura 4

Effetto dell'isolamento sociale sul consumo volontario di etanolo in topi socialmente isolati e non. Il consumo volontario di acqua ed etanolo viene espresso in grammi sulle due ore per ogni singolo animale dei due gruppi sperimentali. I dati vengono presentati come medie \pm SEM per 16 animali in ogni gruppo.

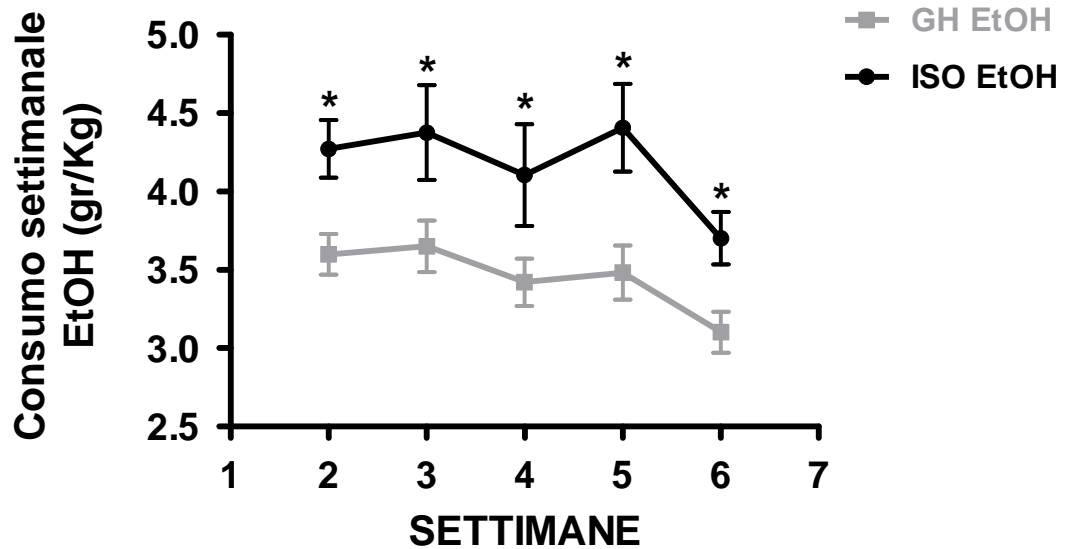


Figura 5

Effetto dell'isolamento sociale sul consumo volontario di etanolo in topi socialmente isolati e non. Il consumo volontario di etanolo viene espresso in grammi su chilo di topo per ogni settimana dell'esperimento a partire dalla seconda fino alla sesta per i due gruppi sperimentali. I dati vengono presentati come medie \pm SEM per 16 animali in ogni gruppo. * $p < 0,005$ verso i valori corrispondenti agli animali di controllo (GH EtOH); ANOVA e Scheffé test.

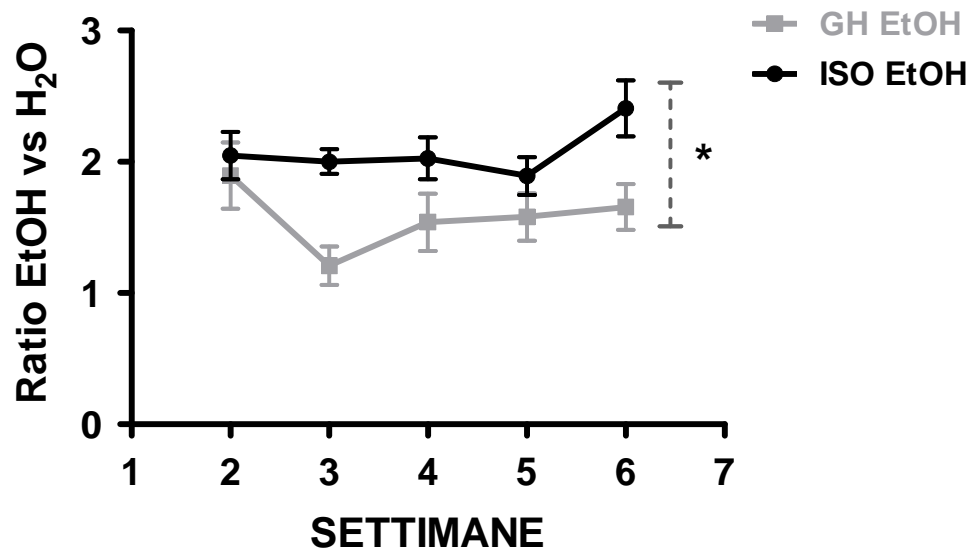


Figura 6

Effetto dell'isolamento sociale sul consumo volontario di etanolo in topi socialmente isolati e non. Il consumo volontario di etanolo viene espresso come rapporto fra i due gruppi sperimentali. I dati vengono presentati come medie \pm SEM per 16 animali in ogni gruppo. * $p < 0,01$ verso i valori corrispondenti agli animali di controllo (GH EtOH); ANOVA e Scheffé test.

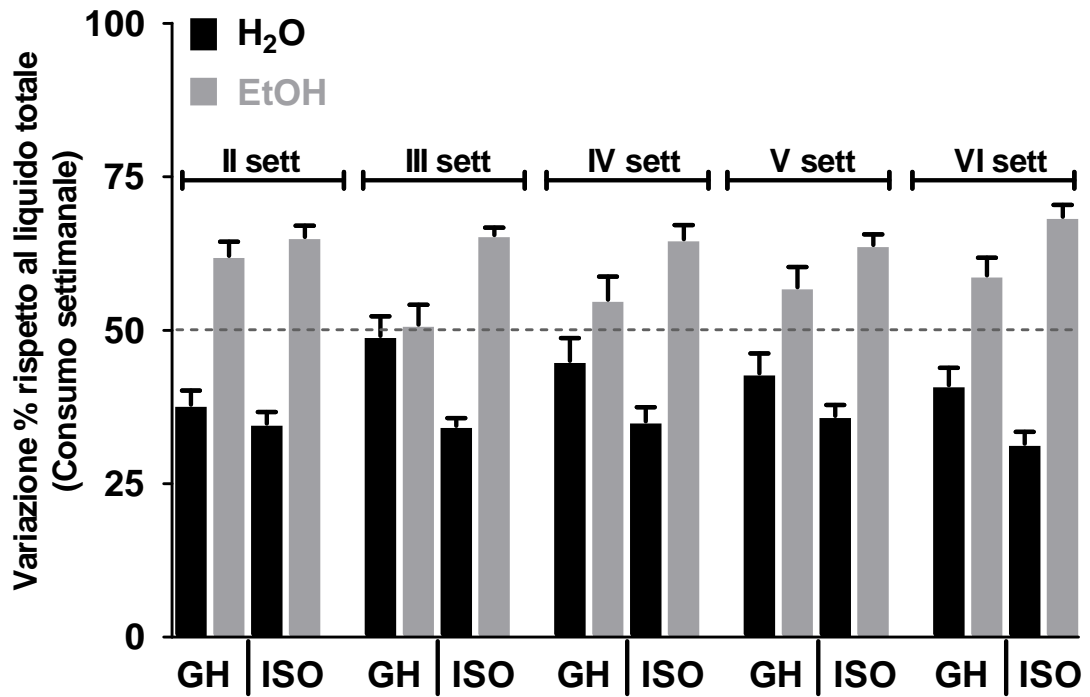
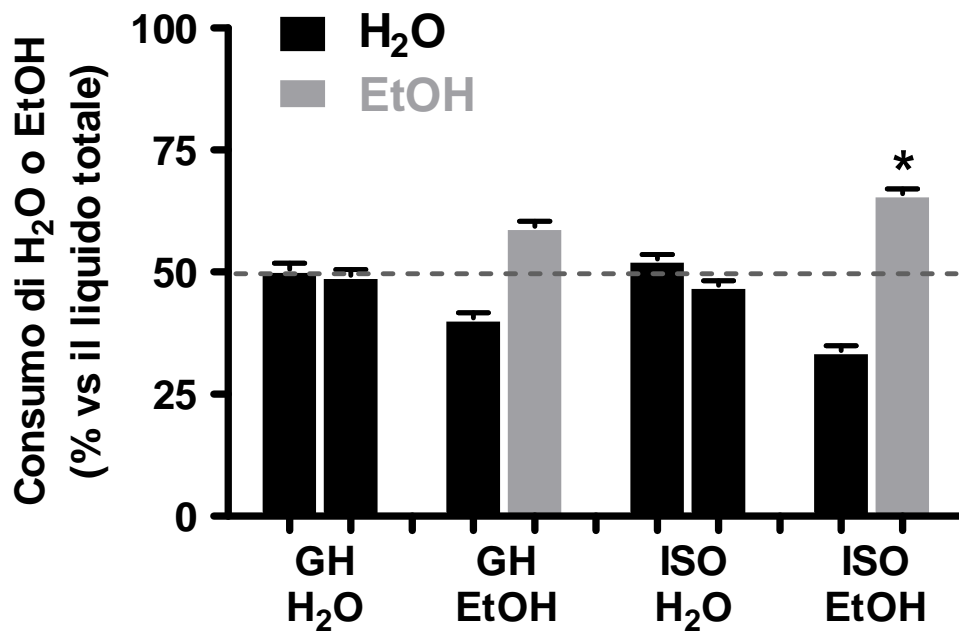


Figura 7

Effetto dell'isolamento sociale sul consumo volontario di etanolo in topi socialmente isolati e non. Il consumo volontario di acqua ed etanolo viene espresso come variazione percentuale rispetto al liquido totale consumato per ogni settimana dell'esperimento a partire dalla seconda fino alla sesta per i due gruppi sperimentali. I dati vengono presentati come medie \pm SEM per 16 animali in ogni gruppo.

**Figura 8**

Effetto dell'isolamento sociale sul consumo volontario di etanolo in topi socialmente isolati e non. Il consumo volontario di acqua ed etanolo viene espresso come variazione percentuale rispetto al liquido totale consumato per ogni gruppo sperimentale. I dati vengono presentati come medie \pm SEM per 16 animali in ogni gruppo. * $p < 0,0001$ verso i valori corrispondenti agli animali di controllo (GH EtOH); ANOVA e Scheffé test.

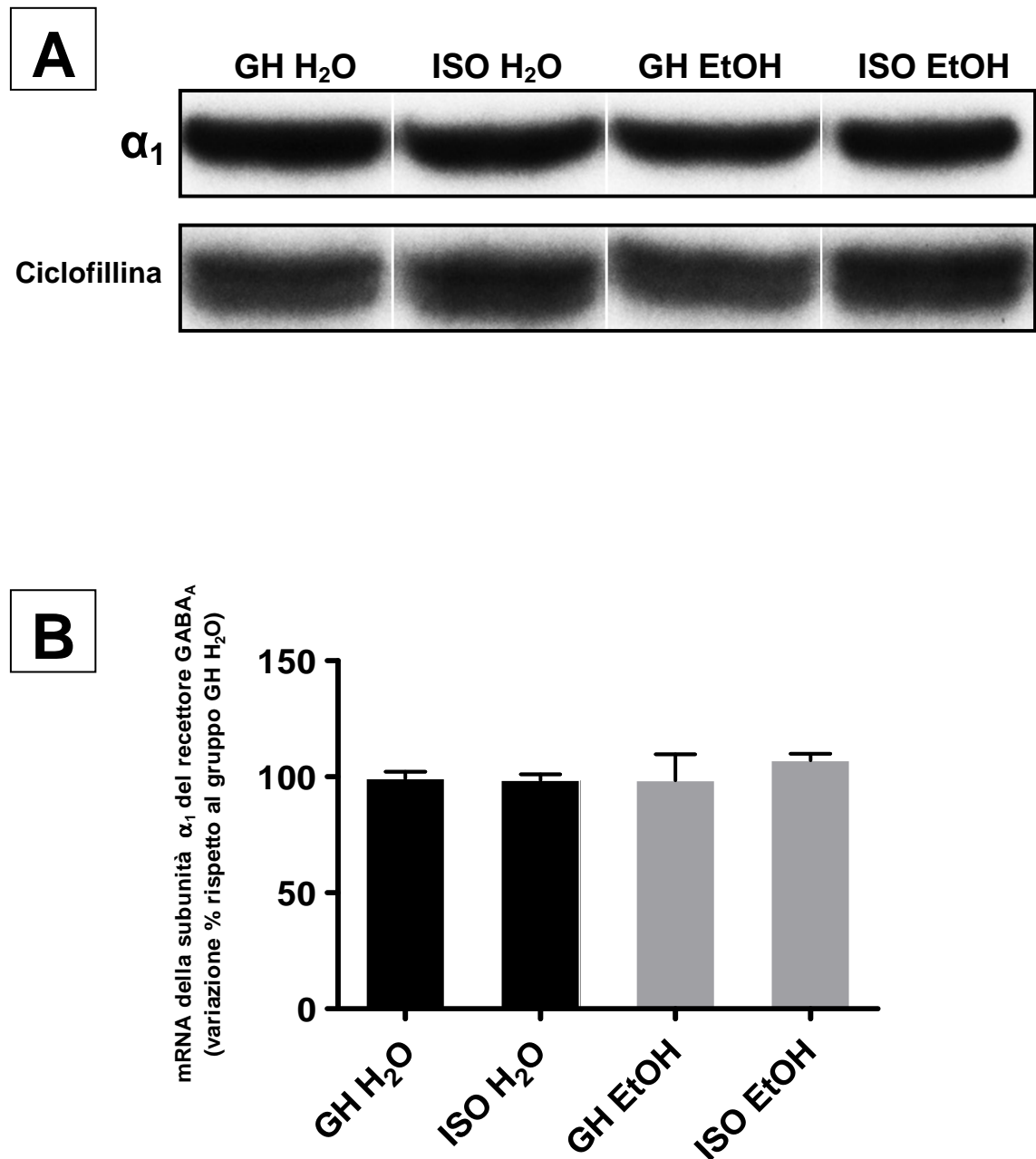


Figura 9

Effetto dell'isolamento sociale e del consumo volontario di etanolo sull'espressione genica dell'mRNA codificante le subunità α_1 del recettore GABA_A nell'ippocampo. **(A)** Determinazione dei livelli degli mRNA codificanti per la subunità α_1 mediante saggio dell'RNA protetto dalle RNasi. Autoradiogramma rappresentativo ottenuto con l'utilizzo della tecnica RPA, che mostra gli ibridi cRNA-mRNA per la subunità α_1 (pannello in alto) e gli ibridi cRNA-mRNA per la ciclofillina (pannello in basso), usata come standard interno. Gli ibridi sono stati separati per elettroforesi su un gel denaturante di urea e poliacrilammide. **(B)** Dati quantitativi riferiti ai livelli normalizzati dell'mRNA codificante per la subunità del recettore riportati come medie \pm SEM dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti ed espressi come variazioni percentuali dei valori riferiti al gruppo di controllo (GH H₂O).

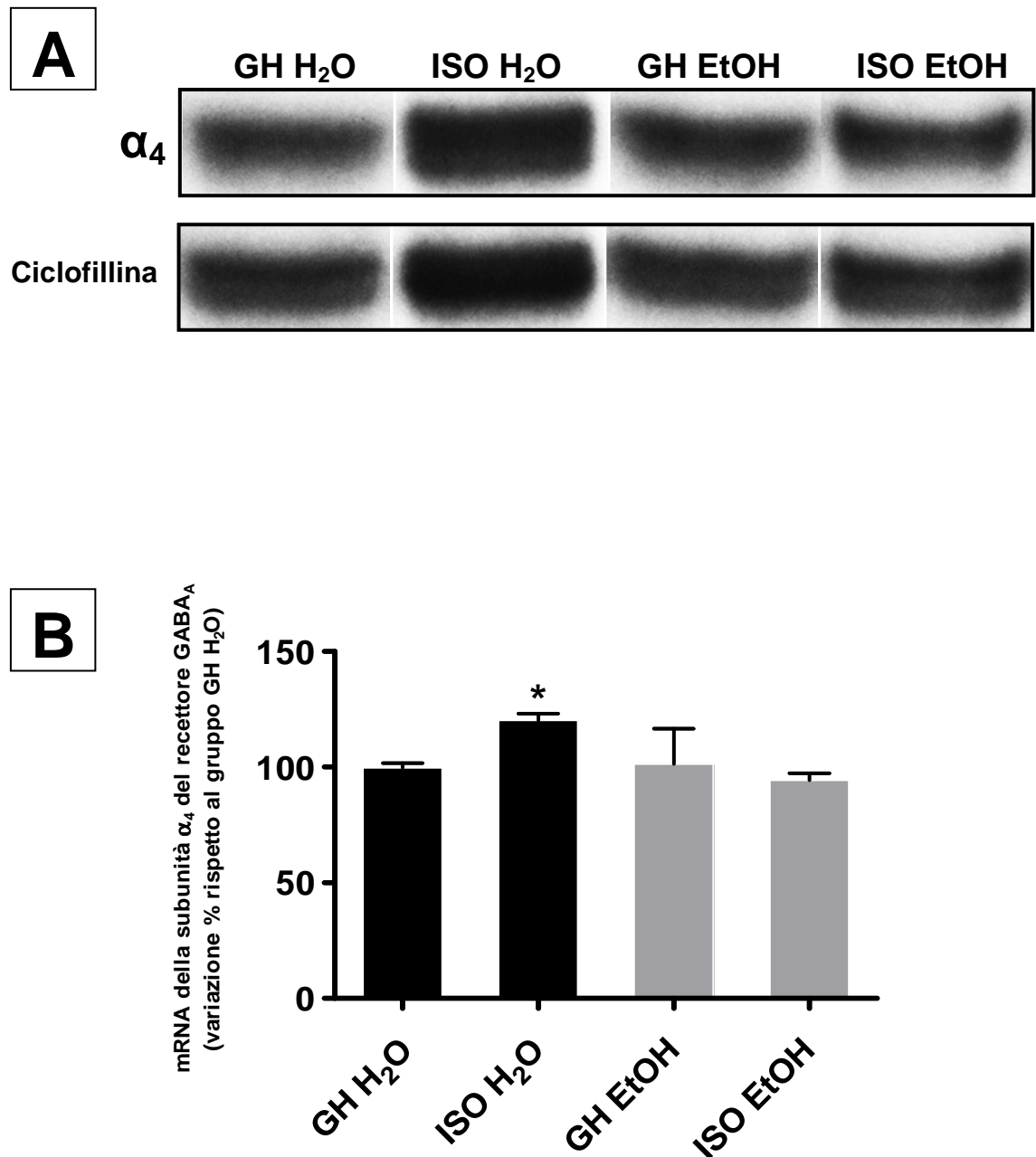


Figura 10

Effetto dell'isolamento sociale e del consumo volontario di etanolo sull'espressione genica dell'mRNA codificante le subunità α_4 del recettore GABA_A nell'ippocampo. **(A)** Determinazione dei livelli degli mRNA codificanti per la subunità α_4 mediante saggio dell'RNA protetto dalle RNasi. Autoradiogramma rappresentativo ottenuto con l'utilizzo della tecnica RPA, che mostra gli ibridi cRNA-mRNA per la subunità α_4 (pannello in alto) e gli ibridi cRNA-mRNA per la ciclofillina (pannello in basso), usata come standard interno. Gli ibridi sono stati separati per elettroforesi su un gel denaturante di urea e poliacrilammide. **(B)** Dati quantitativi riferiti ai livelli normalizzati dell'mRNA codificante per la subunità del recettore riportati come medie \pm SEM dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti ed espressi come variazioni percentuali dei valori riferiti al gruppo di controllo. * $p < 0,01$ verso i valori corrispondenti agli animali di controllo (GH H₂O); ANOVA e Scheffé test.

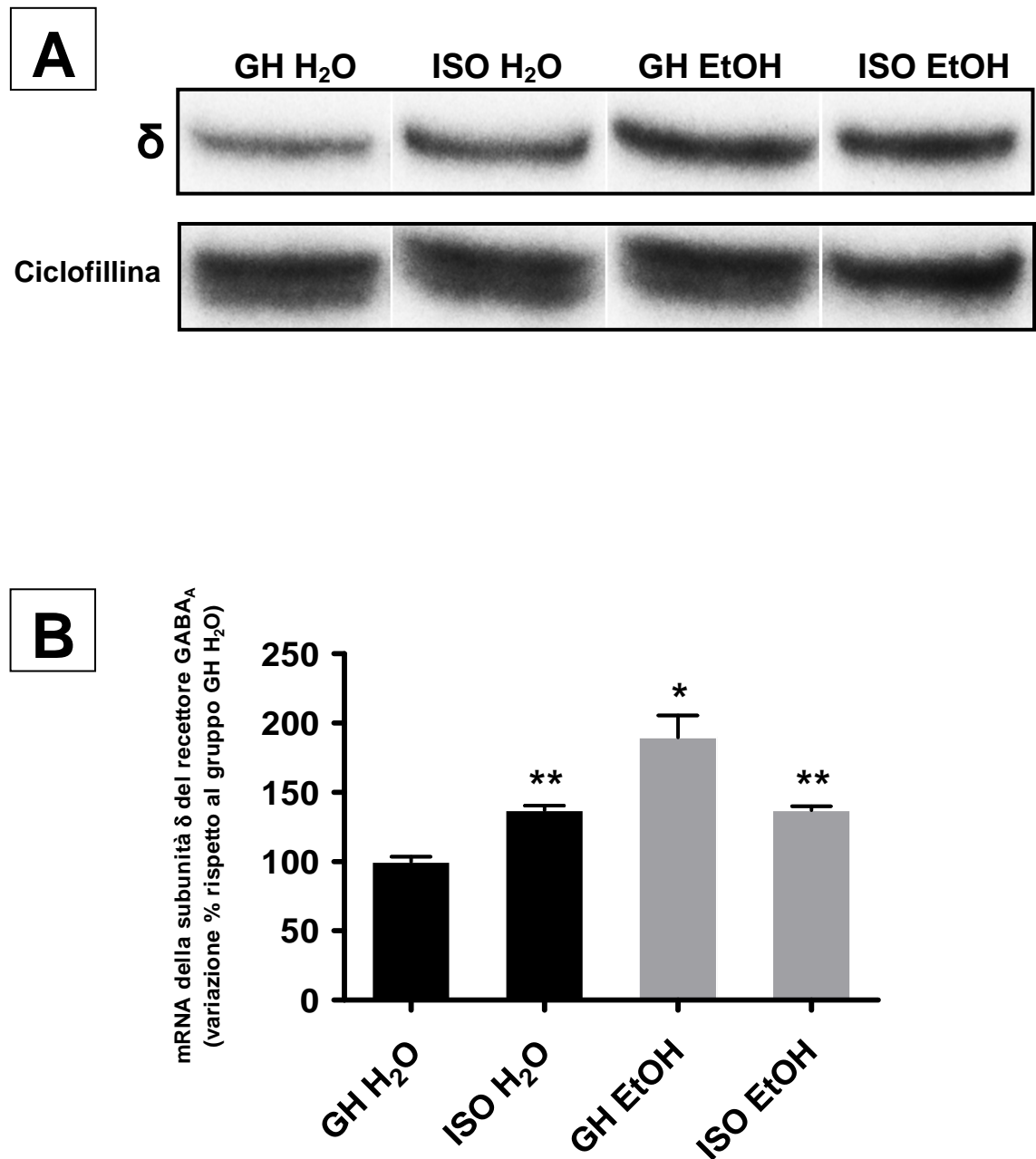


Figura 11

Effetto dell'isolamento sociale e del consumo volontario di etanolo sull'espressione genica dell'mRNA codificante le subunità δ del recettore GABA_A nell'ippocampo. **(A)** Determinazione dei livelli degli mRNA codificanti per la subunità δ mediante saggio dell'RNA protetto dalle RNasi. Autoradiogramma rappresentativo ottenuto con l'utilizzo della tecnica RPA, che mostra gli ibridi cRNA-mRNA per la subunità δ (pannello in alto) e gli ibridi cRNA-mRNA per la ciclofillina (pannello in basso), usata come standard interno. Gli ibridi sono stati separati per elettroforesi su un gel denaturante di urea e poliacrilammide. **(B)** Dati quantitativi riferiti ai livelli normalizzati dell'mRNA codificante per la subunità del recettore riportati come medie \pm SEM dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti ed espressi come variazioni percentuali dei valori riferiti al gruppo di controllo. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ verso i valori corrispondenti agli animali di controllo (GH H₂O); ANOVA e Scheffé test.