

CRAIG H. BAILEY

*Center for Neurobiology and Behavior  
College of Physicians and Surgeons of Columbia University  
New York State Psychiatric Institute  
New York, New York, USA*

TED ABEL

ERIC R. KANDEL

*Howard Hughes Medical Institute  
Center for Neurobiology and Behavior  
College of Physicians and Surgeons of Columbia University  
New York State Psychiatric Institute  
New York, New York, USA*

## Meccanismi molecolari dei processi di apprendimento e di memorizzazione

*Studi recenti condotti su un'ampia gamma di sistemi, la cui complessità varia dalle forme semplici di memoria implicita negli invertebrati a quelle più complesse di memoria esplicita nei mammiferi, suggeriscono che queste diverse forme di immagazzinamento mnemonico si accompagnano a differenze nella forza e nella struttura delle connessioni sinaptiche. Sono stati descritti, tanto per i processi impliciti quanto per quelli espliciti, due tipi di meccanismi di registrazione mnemonica. La memoria breve, che si protrae per alcuni minuti o alcune ore, comporta un'alterazione dell'efficienza delle connessioni sinaptiche preesistenti, determinata dalla modificazione covalente delle proteine preesistenti. Per contro, la memoria a lungo termine, che si protrae per giorni, settimane o anni, si associa alla crescita di nuove connessioni sinaptiche avviata da un programma di espressione genica che può essere indotto dal cAMP e dalla sintesi di nuove proteine.*

### Introduzione

I moderni studi di psicologia cognitiva hanno dimostrato che l'apprendimento non è una facoltà unitaria della mente ma è costituito da processi mentali distinti (Squire e Zola-Morgan, 1991). Le forme di *apprendimento esplicito* o *dichiarativo* sono connesse all'acquisizione di informazioni relative al prossimo, ai luoghi, alle cose. Per *apprendimento implicito* o *procedurale* si intende l'apprendimento di abilità motorie o di altro genere, tra cui i processi associativi semplici, quale per esempio il condizionamento classico, e i processi non associativi, quali la sensibilizzazione e l'assuefazione. Come è stato dimostrato per la prima volta attraverso studi di neuropsicologia condotti sul paziente H.M., l'apprendimento esplicito dipende fondamentalmente dalle strutture del lobo temporale della corteccia cerebrale, compreso l'ippocampo. L'apprendimento implicito interessa invece soltanto i percorsi sensoriali, motori o associativi reclutati per le abilità percettive o motorie particolari, uti-

lizzate durante il processo di apprendimento. Di conseguenza, l'apprendimento implicito è studiato con maggiore facilità in vari sistemi a riflessi semplici, inclusi quelli degli invertebrati superiori, mentre le forme esplicite sono studiate soprattutto nei mammiferi.

I risultati sperimentali di studi clinici condotti su esseri umani, nonché i numerosi studi condotti su differenti sistemi animali, suggeriscono che ogni forma di memoria è caratterizzata da stadi distinti: uno stadio a breve termine, che si protrae per alcuni secondi, minuti o ore, e uno a lungo termine, che permane per giorni, settimane e talvolta per tutta la vita. Gli studi condotti sulla memoria umana all'inizio del 20° secolo descrivevano un periodo di transizione dalla memoria a breve termine a quella a lungo termine. Durante questo periodo di consolidamento la registrazione mnemonica è labile e altamente suscettibile di cancellazione. Studi molecolari recenti sulle forme implicite ed esplicite di apprendimento suggeriscono che questa transizione corrisponde a un programma di espressione genica alterata. Questa cascata molecolare trasforma un processo transito-

rio, che comporta la modificazione covalente delle proteine preesistenti e un cambiamento dell'efficienza delle sinapsi preesistenti, in un processo stabile di autoconservazione che si accompagna alla crescita di nuove connessioni sinaptiche.

In questo saggio verrà preso in considerazione il livello di conservazione dei componenti di questa cascata molecolare nel processo di immagazzinamento della memoria a lungo termine per due diverse forme di apprendimento. In primo luogo verranno illustrati alcuni dei risultati ottenuti grazie agli studi molecolari condotti su forme elementari di apprendimento implicito in due sistemi modello di invertebrati: *Aplysia* e *Drosophila*. Successivamente verrà esaminato il potenziamento a lungo termine (LPT, *Long Term Potentiation*) dell'ippocampo, una forma di plasticità sinaptica che si ritiene contribuisca alla conservazione della memoria esplicita nei mammiferi.

### Studi molecolari di una forma implicita di apprendimento in *Aplysia*

Il sistema nervoso della lumaca marina *Aplysia californica* si è dimostrato utile come sistema modello per lo studio delle basi cellulari e molecolari dell'apprendimento e della memoria (fig.1). Questo sistema contiene soltanto circa 20.000 grandi cellule nervose identificabili, raggruppate in dieci gangli principali. La possibilità di identificare i singoli neuroni e di registrarne l'attività ha permesso di definire i principali componenti dei circuiti neuronali connessi a comportamenti specifici nonché di delineare i punti critici e i relativi meccanismi utilizzati per immagazzinare le rappresentazioni connesse alla memoria.

I meccanismi molecolari che contribuiscono all'immagazzinamento della memoria implicita sono stati studiati (fig.2) in modo particolarmente esteso per il riflesso di ritrazione della branchia in *Aplysia* (Hawkins *et al.*, 1993; Byrne e Kandel, 1996). Così come si verifica per altri tipi di riflessi difensivi, quello di ritrazione della branchia può venire modificato da numerose forme di apprendimento implicito. Verrà qui considerata la sensibilizzazione, una forma elementare di apprendimento non associativo grazie al quale un animale perviene alla conoscenza delle proprietà di un singolo stimolo nocivo. Dopo essere stato esposto a uno stimolo potenzialmente pericoloso, l'animale impara a rafforzare i propri riflessi difensivi e a rispondere vigorosamente a stimoli che in precedenza davano risposte neutre. In *Aplysia* è possibile sensibilizzare il riflesso di ritrazione della branchia mediante uno stimolo forte a livello della coda (v. figura 2). In questo modo si attivano gli interneuroni di facilitazione che formano collegamenti sinaptici con determinati neuroni sensoriali e rafforzano la connessione sinaptica tra i neuroni sensoriali e i loro neuroni motori (motoneuroni) bersaglio. Così come avviene per altri riflessi difensivi di ritrazione, la memoria comportamentale di sensibilizzazione del riflesso di ritrazione della branchia è graduale e la ritenzione è proporzionale al numero di prove di addestramento. Un singolo stimolo alla coda produce una sensibilizzazione a breve termine che si protrae per minuti o ore. La ripetizione di questo stimolo produce una sensibi-

lizzazione comportamentale a lungo termine che può protrarsi per giorni o settimane.

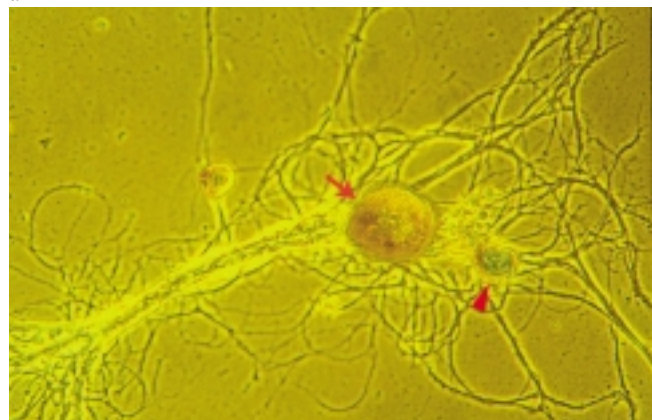
La sensibilizzazione a breve o a lungo termine intensifica la trasmissione sinaptica a livello del collegamento monosinaptico tra i meccanorecettori dei neuroni sensoriali e dei neuroni motori (v. figure 1 e 2). Sebbene sia attribuibile a questa componente solo una parte della modificazione comportamentale misurata nell'animale integro, la sua semplicità ha facilitato l'analisi cellulare e molecolare sia della forma di sensibilizzazione a breve termine sia di quella a lungo termine. Il percorso monosinaptico può essere ricostituito in coltura cellulare dissociata (v. figura 1), dove la serotonina (5-HT, 5-idrossitriptamina), un neurotrasmettitore modulatore rilasciato normalmente con stimoli di sensibilizzazione, può sostituire la scossa inviata alla coda durante l'addestramento comportamentale dell'animale integro. Analogamente alla sensibilizzazione comportamentale, una singola applicazione di 5-HT produce cambiamenti a breve termine nell'efficacia sinaptica, mentre cinque applicazioni distanziate, somministrate durante un periodo di 1,5 h, determinano cambiamenti a lungo termine che durano uno o più giorni. Le scoperte relative a una rappresentazione cellulare elementare della memoria a breve e a lungo termine della sensibilizzazione hanno permesso di affrontare direttamente il problema di quali sono, cioè, i substrati molecolari e i meccanismi regolatori che presiedono all'immagazzinamento della memoria. Gli studi biofisici e biochimici delle connessioni che collegano i neuroni sensoriali a quelli motori, sia nell'animale integro sia nelle cellule in coltura, indicano che nei cambiamenti a breve e a lun-

**fig.1. a.** La lumaca marina *Aplysia californica*, utilizzata in numerosi studi sulle basi cellulari e molecolari di forme non associative e associative di apprendimento.

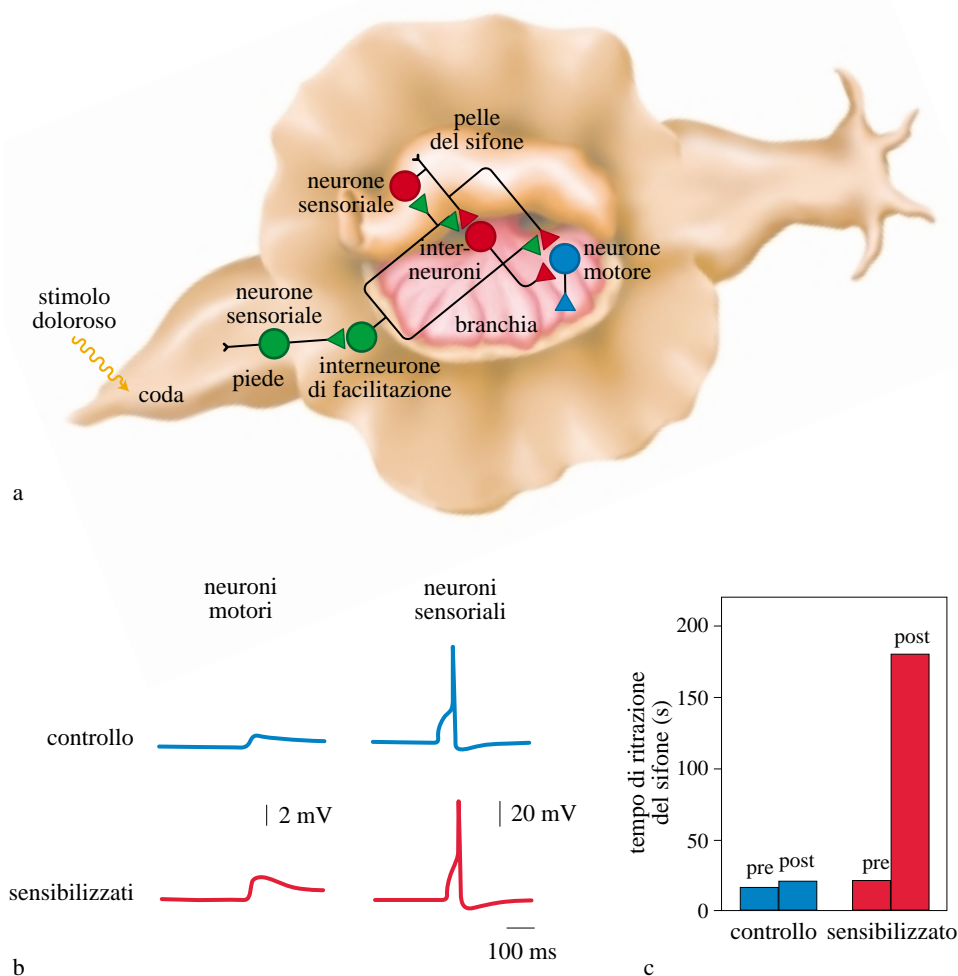
**b.** Un motoneurone (freccia) e un neurone sensoriale (punta di freccia) che, studiati in colture cellulari separate, permettono di studiare i cambiamenti della forza sinaptica associata alla sensibilizzazione. Cortesia degli autori.



a



b



**fig.2.** Sensibilizzazione del riflesso di ritrazione della branchia in *Aplysia*.

**a.** Uno stimolo doloroso sulla coda potenzia in maniera rilevante il riflesso di ritrazione della branchia, attivato da un colpo al sifone. I neuroni sensoriali del piede (in verde) attivano gli interneuroni di facilitazione (in verde), alcuni dei quali utilizzano serotonina (5-HT) come trasmettitore. Queste cellule di facilitazione agiscono a livello presinaptico per modulare l'attività a livello della sinapsi tra i neuroni sensoriali della pelle del sifone (in rosso) e i motoneuroni della branchia (in blu).

**b.** I potenziali postsinaptici registrati in un motoneurone della branchia permangono rafforzati ancora il giorno successivo alla sensibilizzazione, effettuata per mezzo della stimolazione elettrica del piede.

**c.** Dal punto di vista comportamentale, questa facilitazione a lungo termine si riflette in una maggiore durata della ritrazione della branchia e del sifone, in seguito a sensibilizzazione. pre: presensibilizzazione, post: postsensibilizzazione. Modificato da: Kandel E.R. *et al.* a c. di (1995) *Essentials of neural science and behavior*, Norwalk, Appleton and Lange.

go termine si ritrovano aspetti di un meccanismo molecolare comune. Ambedue i processi vengono avviati dalla 5-HT e l'aumento della forza sinaptica, osservato sia durante il cambiamento a breve termine sia durante quello a lungo termine, deriva in parte da un aumento del rilascio di trasmettitori dai neuroni sensoriali. Questo aumento presinaptico dell'eccitabilità è dovuto all'allungamento nel tempo del potenziale d'azione, determinato dalla modulazione per mezzo di 5-HT delle correnti di potassio (Byrne e Kandel, 1996).

Nonostante le numerose analogie, i cambiamenti cellulari a breve termine differiscono dalle modificazioni a lungo termine per due aspetti importanti. In primo luogo, il cambiamento a breve termine comporta soltanto la modificazione covalente di proteine preesistenti e un'alterazione delle preesistenti connessioni. Sia la sensibilizzazione comportamentale a breve termine nell'animale, sia la facilitazione a breve termine in coltura cellulare dissociata non richiedono una sintesi macromolecolare continua. Per contro, gli inibitori della trascrizione o della traduzione bloccano l'induzione dei cambiamenti a lungo termine sia nella preparazione semintatta sia nella coltura cellulare primaria (Montarolo *et al.*, 1986). Particolarmente interessante è la scoperta che l'induzione della facilitazione a lungo termine, a livello di questa singola sinapsi di *Aplysia*, richiede la sintesi di proteine e di RNA durante la finestra temporale critica (o periodo di consolidamento). Numerose forme

di memoria, sia nei vertebrati sia negli invertebrati, condividono, durante il periodo di consolidamento, questa necessità di sintesi di macromolecole. Da un punto di vista molecolare, questi studi indicano che per i cambiamenti comportamentali e cellulari a lungo termine è necessaria l'espressione di geni e proteine, diversamente che per i processi a breve termine. L'identificazione dei prodotti genici richiesti per questo consolidamento rimane il principale obiettivo della ricerca molecolare sui processi della memoria.

In secondo luogo, il processo a lungo termine, ma non quello a breve termine, comporta un cambiamento strutturale (Bailey e Kandel, 1993). C.H. Bailey (1983) e M. Chen (1988) hanno dimostrato che in *Aplysia* l'addestramento della sensibilizzazione a lungo termine si associa alla crescita di nuove connessioni sinaptiche tra i neuroni sensoriali e i neuroni motori. Cambiamenti analoghi possono essere ricostituiti nelle coculture di neuroni sensoriali e motori per mezzo di presentazioni ripetute di 5-HT (Glanzman *et al.*, 1990).

### Ruolo del cAMP come secondo messaggero

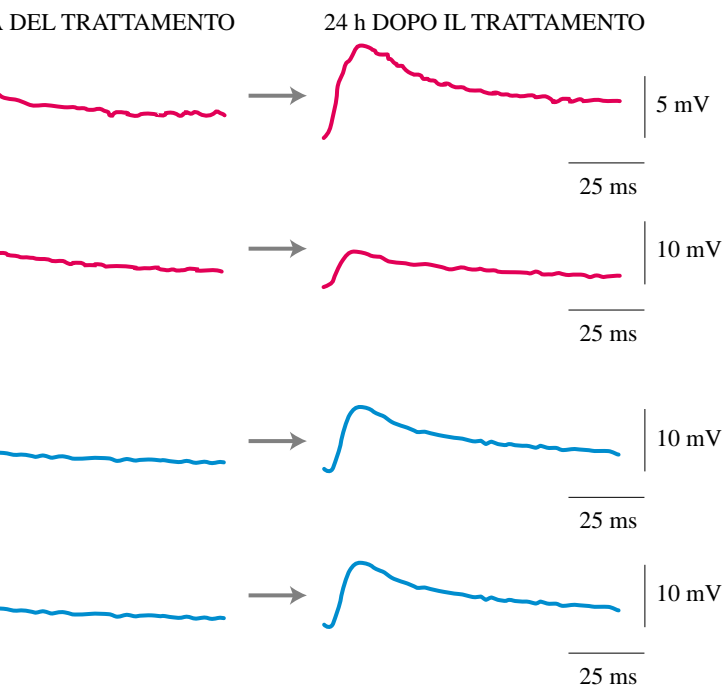
La 5-HT, rilasciata *in vivo* durante la sensibilizzazione o applicata direttamente ai neuroni in coltura, regola il rilascio del neurotrasmettitore. Questa molecola si lega a un recettore presente sulla superficie cellulare dei neuroni sensoriali attivando l'adenilato ciclasi, l'enzima che trasforma

l'ATP nel secondo messaggero diffusibile cAMP il quale, a sua volta, attiva la proteinchinasi A (PKA). La PKA è un tetramero contenente due subunità catalitiche e due subunità regolatrici. Il legame del secondo messaggero cAMP alla subunità regolatrice libera la subunità catalitica attiva della PKA, che può quindi aggiungere gruppi fosfato ai residui di serina e treonina presenti sulle proteine bersaglio, modificando in tal modo l'attività di tali molecole.

La PKA svolge un ruolo centrale sia nella facilitazione a breve termine sia in quella a lungo termine; il cAMP può evocare sia la facilitazione a breve termine sia quella a lungo termine e gli inibitori della PKA bloccano ambedue le forme di facilitazione. Iniettando in cellule sensoriali in coltura subunità di PKA marcate con sostanze fluorescenti, è stato possibile chiarire come la PKA partecipi ai processi a breve e a lungo termine. Applicando questa tecnica per misurare la quantità di subunità catalitica di PKA non legata, B.J. Backsai e collaboratori (1993) hanno scoperto che una singola immissione di 5-HT, che produce una facilitazione a breve termine, provocava un aumento della quantità di subunità catalitica attiva nel terminale presinaptico dei neuroni sensoriali. Nei terminali presinaptici delle cellule sensoriali, la PKA fosforila le proteine bersaglio quali i canali ionici, producendo un aumento transitorio della liberazione di trasmettitore. Per contro, durante la facilitazione a lungo termine indotta da applicazioni ripetute di 5-HT, la subunità catalitica di PKA non legata si trasferisce al corpo cellulare dei neuroni sensoriali ed entra nel nucleo, dove porta all'attivazione di geni specifici.

### Reclutamento dei fattori di trascrizione della famiglia CREB

Nelle cellule dei mammiferi, la PKA attiva l'espressione genica attraverso la fosforilazione dei fattori di trascrizione che si legano a CRE (*cAMP Responsive Element*, elemento di risposta al cAMP). CRE è una sequenza di DNA presente all'interno della regione di controllo del gene. Il legame di differenti fattori di trascrizione a questi elementi di risposta regola l'attività dell'RNA-polimerasi, determinando così il momento e il livello dell'espressione genica. Uno dei principali fattori di trascrizione che riconoscono la sequenza CRE è CREB1 (*CRE-Binding protein 1*, proteina 1 che si lega a CRE), che funziona da attivatore trascrizionale solo dopo essere stata fosforilata dalla PKA. Se CREB1 è essenziale per la facilitazione a lungo termine, bloccando il legame di questa proteina alla sequenza di DNA responsabile della risposta al cAMP si dovrebbe potere eliminare selettivamente



vamente il processo a lungo termine. P.K. Dash e collaboratori (1990) hanno verificato questa ipotesi con microiniezioni di una corta sequenza nucleotidica corrispondente a CRE nei neuroni sensoriali in cocoltura con neuroni motori (fig.3). Questo oligonucleotide inibisce la funzione di CREB1 legandosi alla proteina di questo all'interno della cellula e impedendole così di riconoscere i siti all'interno del genoma e di attivare l'espressione genica. Essi hanno scoperto che un'iniezione di CRE blocca la facilitazione a lungo termine ma non produce alcun effetto sul processo a breve termine.

Per determinare se la facilitazione per mezzo di 5-HT comporta la fosforilazione di CREB1, B.K. Kaang e collaboratori (1993) hanno microiniettato due costrutti nei neuroni sensoriali di *Aplysia*: un *plasmide di espressione*, contenente un fattore transattivatore chimerico ottenuto unendo il dominio di legame al DNA di GAL4 al dominio di attivazione trascrizionale di CREB1 di mammifero, e un *plasmide reporter*, contenente il gene della cloranfenicolacetiltransferasi (CAT) sotto il controllo dei siti di legame di GAL4. Questo fattore chimerico di trascrizione si lega ai siti di GAL4, ma attiva la trascrizione solo quando il dominio di attivazione di CREB1 è fosforilato dall'enzima PKA o, in alcuni casi, da altre chinasi, quali la proteinchinasi II  $Ca^{2+}$ /calmodulina-dipendente. Poiché nel lievito il sito di legame di GAL4 non è riconosciuto dai fattori di trascrizione di *Aplysia*, la trascrizione del gene reporter di CAT viene indotta solo quando il dominio di attivazione della proteina ibrida GAL4-CREB1 viene fosforilato in maniera appropriata. In seguito all'iniezione simultanea di questi due pla-

**fig.3.** Facilitazione a lungo e a breve termine nei neuroni sensoriali rilevata attraverso i potenziali postsinaptici eccitatori, misurati nel motoneurone prima e 24 h dopo il trattamento con serotonina (5-HT). **a.** La facilitazione a lungo termine, prodotta da cinque somministrazioni successive di 5-HT (curve rosse), è bloccata dall'iniezione di oligonucleotidi codificanti CRE (in basso). **b.** Tale trattamento non modifica invece la facilitazione a breve termine (curve blu), rilevata somministrando 5-HT un'unica volta. Ridisegnato da: Dash P.K. *et al.* (1990) *Nature*, 345, 718-721.

smidi nei neuroni sensoriali, l'esposizione alla 5-HT produce una stimolazione dell'espressione di CAT aumentata di dieci volte. Questi dati sono a favore dell'ipotesi che i fattori di trascrizione connessi a CREB1, attivati da fosforilazione PKA-dipendente, sono interessati alla regolazione della nuova espressione genica che accompagna la facilitazione a lungo termine.

### Regolazione coordinata di CREB1 e CREB2

Durante la facilitazione a lungo termine, la PKA sembra attivare l'espressione genica nei neuroni sensoriali di *Aplysia* per mezzo di un omologo di CREB1 presente in questo mollusco. A questo punto occorre chiedersi se CREB1 agisce da solo o con altri fattori di trascrizione. CREB1 appartiene a una famiglia di fattori di trascrizione, caratterizzati dalla presenza di una regione basica contenente uno *zipper* (letteralmente, cerniera) di leucina (bZIP), i quali agiscono come omo- o eterodimeri. Il dominio bZIP è bipartito, mediando sia la dimerizzazione sia il legame al DNA. D. Bartsch e collaboratori (1995) hanno sfruttato la capacità del dominio bZIP di interagire in un sistema di legame ibrido tra proteine espresse in lievito, per identificare nuovi fattori di trascrizione nel bZIP di *Aplysia*: uno di questi, ApCREB2, è stato studiato in dettaglio.

ApCREB2 è espresso a livello basale (senza esposizione alla 5-HT) nei neuroni sensoriali di *Aplysia* e non è indotto dalla 5-HT. Pur possedendo un dominio bZIP, questo fattore di trascrizione non contiene una sequenza di consenso simile a CREB1 per la fosforilazione da parte di PKA (dominio KID o box P). Nella sua struttura primaria generale, ApCREB2 è omologo tanto a CREB2 umano quanto a ATF4 murino, fattori di trascrizione che fungono da repressori dell'espressione genica mediata da CREB1. In effetti, negli studi di cotrasfezione delle cellule F9, ApCREB2 è un repressore dell'attivazione trascrizionale svolta da CREB1 sia in *Aplysia* sia nei mammiferi. Curiosamente, in determinate circostanze, ApCREB2 può fungere da attivatore trascrizionale PKA-dipendente. Poiché ApCREB2 non contiene alcuna sequenza di consenso di fosforilazione da parte di PKA, questo enzima può regolare l'attività di CREB2 modificando altri fattori di trascrizione del tipo bZIP che interagiscono con CREB2, tra cui CREB1. In questo modo il partner di dimerizzazione di CREB2 (e di CREB1) può essere fondamentale per determinare l'effetto che si produce sulla regolazione trascrizionale.

Per verificare direttamente il ruolo di ApCREB2 nell'apprendimento, Bartsch e collaboratori (1995) hanno sintetizzato anticorpi specifici contro il fattore di trascrizione e li hanno iniettati nel nucleo dei neuroni sensoriali in coculture di neuroni sensoriali e motori. È stato così evidenziato che, iniettando anticorpi di CREB2 nei neuroni sensoriali, è possibile evocare una facilitazione di durata superiore a un giorno con una sola immissione di 5-HT la quale, normalmente, induce solo una facilitazione a breve termine della durata di alcuni minuti (fig.4). Questa facilitazione possiede tutte le proprietà di quella a lungo termine: essa richiede la trascrizione e la traduzione, induce la crescita di nuove

connessioni sinaptiche e per mezzo di cinque immissioni di 5-HT blocca una facilitazione ulteriore. Perciò ApCREB2 è un repressore funzionale della facilitazione a lungo termine e l'attenuazione di questa repressione potenzia il processo di attivazione. Di conseguenza l'espressione genica indotta da cAMP può comportare due stadi collegati: l'attivazione di CREB1 e l'attenuazione della repressione di CREB2. In *Aplysia* i risultati sono di particolare interesse in quanto indicano la possibilità che l'eliminazione della repressione ApCREB2-mediata possa limitare la regolazione dell'aumento a lungo termine della forza sinaptica. Consideriamo come sia possibile attenuare la repressione esercitata da ApCREB2 su ApCREB1. Poiché dopo l'esposizione a 5-HT non si osserva alcuna distruzione della proteina ApCREB2, si deve dedurre che le immissioni ripetute di 5-HT inducano modificazioni covalenti di ApCREB2. In effetti, sono stati osservati dei cambiamenti nello stato di fosforilazione di ApCREB2, in seguito all'esposizione ripetuta a 5-HT. È interessante osservare che ApCREB2 condivide i siti di fosforilazione della proteinchinasi C e della MAP-chinasi con i propri omologhi umani e murini. Inoltre, la MAP-chinasi è attivata dalla 5-HT nei neuroni di *Aplysia* e, come la PKA, con un trattamento prolungato di 5-HT si trasferisce nel nucleo (K. Martin, comunicazione personale). Il trasferimento della PKA e della MAP-chinasi nel nucleo può in parte spiegare le ragioni per le quali la facilitazione a lungo termine richiede ripetute immissioni di 5-HT. È possibile che queste siano necessarie per permettere l'attivazione persistente della PKA e della MAP-chinasi in modo da rendere operanti gli attivatori (CREB1) e attenuare i repressori (CREB2). È inoltre possibile che i percorsi che regolano ognuno di questi processi presentino caratteristiche cinetiche distinte. Tali differenze cinetiche potrebbero definire la finestra temporale ottimale intercorrente tra le prove di addestramento e spiegare la netta differenza riscontrata,

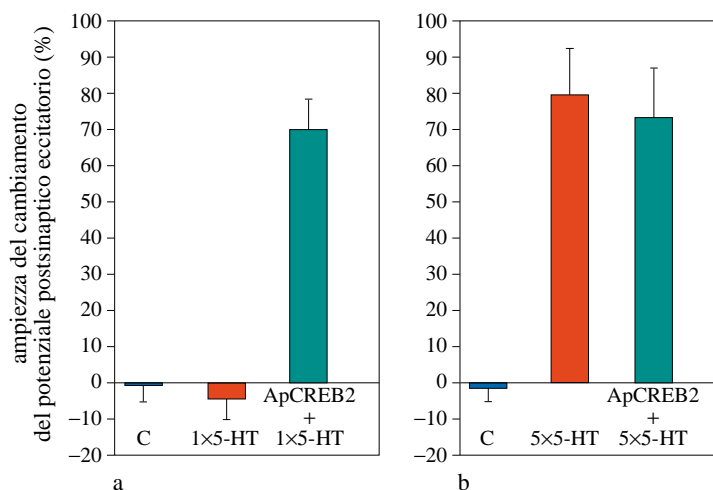
fig.4. L'introduzione di anticorpi di ApCREB2 favorisce il formarsi della facilitazione a lungo termine.

a. Una sola immissione di 5-HT (in rosso) non rivela facilitazione a lungo termine nella misurazione effettuata 24 h dopo il trattamento.

Tuttavia, se effettuata in seguito a iniezione di anticorpi di ApCREB2, l'immissione di 5-HT produce una facilitazione a lungo termine stabile (in verde).

b. L'iniezione di anticorpi di ApCREB2 non modifica invece la facilitazione a lungo termine osservata 24 h dopo aver effettuato cinque immissioni di 5-HT. In blu, sono rappresentati i controlli.

Modificato da: Bartsch D. et al. (1995) *Cell*, 83, 979-992.



sia in *Aplysia* sia in *Drosophila*, tra addestramento concentrato e addestramento intervallato (v. oltre). Forse l'addestramento intervallato risulta più efficace di quello concentrato in quanto soltanto il primo permette l'attivazione coordinata di ApCREB1 e la depressione di ApCREB2. Secondo questa ipotesi, il ruolo fisiologico di ApCREB2 potrebbe essere duplice: in primo luogo potrebbe impedire che il processo a lungo termine si attivi accidentalmente, senza esposizioni ripetute alla 5-HT; secondariamente potrebbe regolare l'ampiezza del cambiamento sinaptico integrando l'attivazione di ApCREB1 per mezzo della PKA con segnali provenienti da ulteriori percorsi del secondo messaggero.

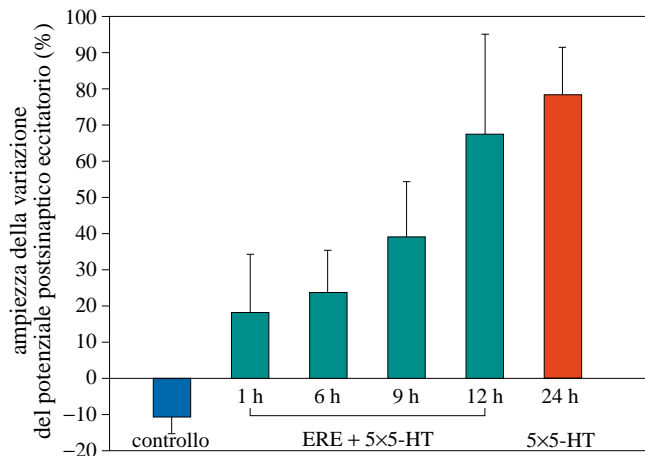
### Induzione del gene precoce ApC/EBP

Gli inibitori della sintesi dell'RNA o delle proteine non producono alcun effetto sull'attivazione dell'adenilatociclastasi da parte della 5-HT, sulla generazione del cAMP, sull'attivazione della PKA, sul trasferimento della subunità catalitica della PKA al nucleo e sulla fosforilazione di CREB1. È chiaro che, per quanto riguarda il punto in cui si manifesta la sintesi dell'RNA e delle proteine che caratterizza la fase di consolidamento, è necessaria una fase ulteriore, cioè la sintesi delle proteine codificate dai geni la cui espressione è indotta da CREB1 e repressa da CREB2.

Per esaminare i geni che si trovano a valle di CREB1, C. Alberini e collaboratori (1994) hanno analizzato i fattori di trascrizione regolati da cAMP, in modo da identificare i geni espressi durante il consolidamento della facilitazione a lungo termine. Alcuni fattori di trascrizione, noti per essere attivati da cAMP, appartengono alla famiglia di proteine che si legano alla sequenza *enhancer* CCAAT

**fig.5.** Per stabilire una facilitazione a lungo termine è necessario che ApC/EBP sia attivo per 12 h dopo il trattamento con 5-HT. La sequenza oligonucleotidica ERE, che lega il fattore di trascrizione ApC/EBP precoce di *Aplysia*, è stata iniettata

nei neuroni sensoriali, in tempi diversi (1, 6, 9, 12 h, in verde), dopo trattamento standard con serotonina (5-HT). La facilitazione a lungo termine è stata quindi misurata 24 h dopo il trattamento con la sola serotonina (in rosso). Modificato da: Alberini C. *et al.* (1994) *Cell*, 76, 1099-1114.



(C/EBPs, *C/Enhancer Binding Proteins*). Un membro di questa famiglia, C/EBP, è espresso nella linea cellulare PC12 del feocromocitoma di ratto dove, come è stato dimostrato, viene attivato da cAMP e regola l'espressione del gene *c-fos* legandosi a ERE (*Enhancer Response Element*, elemento intensificatore della risposta) nel promotore *c-fos*. Poiché i neuroni di *Aplysia* sono caratterizzati da un'attività specifica di legame con ERE, Alberini e collaboratori (1994) hanno usato la sequenza di legame di ERE per isolare un clone che codifica una proteina la quale interagisce in modo specifico con i siti di legame al DNA di C/EBP. In *Aplysia*, l'mRNA di C/EBP è espresso a bassi livelli allo stato basale, ma viene indotto rapidamente e in modo transitorio dalla 5-HT e dal cAMP. Questa regolazione dell'espressione ApC/EBP, cAMP-dipendente, può essere mediata direttamente da CREB1 poiché, a monte del gene *ApC/EBP*, si trova un sito CRE.

I fattori di trascrizione vengono comunemente denominati *costitutivi* quando sono sempre presenti e *inducibili* qualora la loro induzione richieda l'attivazione dei rispettivi geni. I fattori di trascrizione inducibili si dividono ulteriormente in *precoci* e *tardivi*, a seconda della rapidità di attivazione in risposta a un dato stimolo; CREB1 è un fattore di trascrizione espresso in termini costitutivi. I cosiddetti *geni precoci*, descritti originariamente negli studi sulla regolazione virale, sono attivati dalla fosforilazione dei fattori di trascrizione costitutivi; ne risulta che essi vengono indotti rapidamente e transitoriamente da meccanismi che non dipendono dalla sintesi proteica. *ApC/EBP* è indotto come gene precoce: dopo 15 min è individuabile l'mRNA di *ApC/EBP*, che raggiunge il livello massimo dopo 2 h e quindi decresce; inoltre viene indotto in presenza di inibitori della sintesi proteica.

Occorre domandarsi, a questo punto, se l'attivazione di *ApC/EBP* sia fondamentale per la trasformazione della facilitazione a breve termine in facilitazione a lungo termine. Per rispondere a questa domanda Alberini e collaboratori (1994) hanno iniettato oligonucleotidi ERE nei neuroni sensoriali in coculture di neuroni sensoriali e motori. È stato così possibile bloccare selettivamente la facilitazione a lungo termine indotta da 5-HT, senza intervenire sulla facilitazione a breve termine. Risultati analoghi sono stati ottenuti mediante microiniezioni sia di RNA antisenso *ApC/EBP* sia di un anticorpo diretto contro *ApC/EBP*. Questi risultati suggeriscono che *C/EBP* di *Aplysia*, un gene precoce attivato durante la fase di consolidamento della facilitazione a lungo termine, svolge la funzione di interruttore molecolare per il passaggio della memoria a breve termine nella memoria a lungo termine.

Per quanto riguarda la durata dell'attivazione di questo fattore di trascrizione dobbiamo stabilire se il legame di ApC/EBP con le proprie sequenze bersaglio è necessario durante l'intero periodo di mantenimento, oppure se la facilitazione si autopropaga come risultato della successiva espressione dei geni effettori. Iniettando oligonucleotidi ERE in cellule sensoriali in tempi diversi dopo trattamento con 5-HT, Alberini e collaboratori (1994) hanno dimostrato che l'attività di ApC/EBP era necessaria solo durante le prime 12 h successive all'addestramento (fig.5). Quindi, l'induzione di ApC/EBP, durante il trattamento con 5-HT,

produce l'attivazione di una cascata di eventi autopertuanti, essenziali per la fase tardiva della facilitazione a lungo termine.

### Stabilizzazione della facilitazione a lungo termine e crescita di nuove connessioni sinaptiche

I prodotti della rete di geni, solo in parte identificati, conducono alla crescita di ulteriori sinapsi tra i neuroni sensoriali e i neuroni motori che caratterizzano la fase tardiva dell'immagazzinamento mnemonico (Bailey e Chen, 1983, 1988; Glanzman *et al.*, 1990). In effetti la stabilità della facilitazione a lungo termine sembra essere il risultato della persistenza di questi cambiamenti strutturali, il cui decadimento corre parallelamente a quello della memoria comportamentale.

Consideriamo come si formano le nuove connessioni sinaptiche. In coculture di neuroni sensoriali e motori, la formazione di nuove sinapsi, indotta da 5-HT, è associata all'abbassamento della concentrazione (*down-regulation*) delle molecole di adesione neuronale apCAM, strutturalmente simili a NCAM (*Neuronal Cell Adhesion Molecule*, molecola di adesione della cellula neuronale), sulla superficie della membrana dei neuroni sensoriali (Mayford *et al.*, 1992). Il fenomeno della diminuzione di concentrazione (fig.6) è particolarmente cospicuo nei siti presso i quali i processi dei neuroni sensoriali vengono a contatto l'uno con l'altro e si realizza grazie all'attivazione, dipendente dalla sintesi proteica, di un programma coordinato di endocitosi mediata dalla clatrina, che conduce all'internalizzazione e all'apparente degradazione di apCAM (Bailey *et al.*, 1992). I neuroni di *Aplysia* esprimono due isoforme di apCAM, una transmembrana e una legata al fosfoinositolo. Solo l'isoforma transmembrana viene internalizzata in seguito a esposizione a 5-HT (C.H. Bailey, B.K. Kaang, M. Chen, E.R. Kandel, dati non pubblicati). L'internalizzazione selettiva della forma transmembrana mette in evidenza la potenziale importanza di regolazione del suo dominio intracellulare in cui è presente una sequenza ricca in prolina, acido glutammico, serina e treonina (sequenza PEST), che sembra mediare la degradazione proteica e che possiede due sequenze di consenso per la fosforilazione della MAP-chinasi. Mediante la sovraespressione in neuroni sensoriali di costrutti chelati o mutanti a livello transmembrana, è stato dimostrato che la 5-HT induce un abbassamento di concentrazione a livello della membrana citoplasmatica ed è stato possibile bloccare la concomitante internalizzazione eliminando l'intera coda citoplasmatica della proteina, oppure unicamente la regione intermedia contenente la sequenza PEST, o ancora sostituendo semplicemente la treonina con l'alanina nelle sequenze di consenso della MAP-chinasi. Questi risultati suggeriscono un possibile ruolo della MAP-chinasi nella modulazione di apCAM.

Si ritiene che la diminuzione di apCAM indotta da 5-HT comporti almeno due conseguenze principali: la defascicolazione, cioè la disarticolazione dei fascicoli associati in maniera omofila dei neuroni sensoriali, un processo che può destabilizzare i contatti adesivi e inibire, di norma, la

crescita; l'attivazione endocitotica, che può condurre a una redistribuzione dei componenti di membrana nei siti di formazione delle nuove sinapsi. Di conseguenza, gli aspetti delle fasi iniziali della crescita delle connessioni sinaptiche associate all'apprendimento, che costituiscono una caratteristica del processo a lungo termine, potranno essere compresi in futuro nel contesto di una forma nuova e mirata di endocitosi mediata da recettori.

### cAMP e memoria a lungo termine in *Drosophila*

Consideriamo in che misura la cascata di attivazione genica stimolata da cAMP e mediata da CREB1 costituisca una generalizzazione del processo di consolidamento.

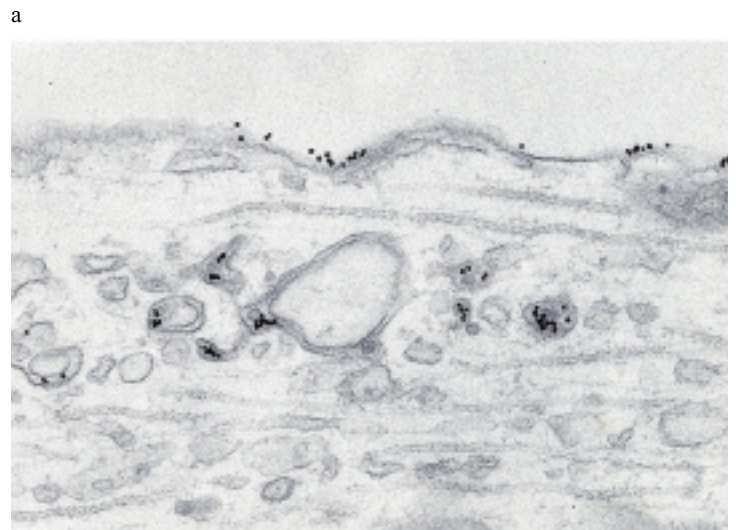
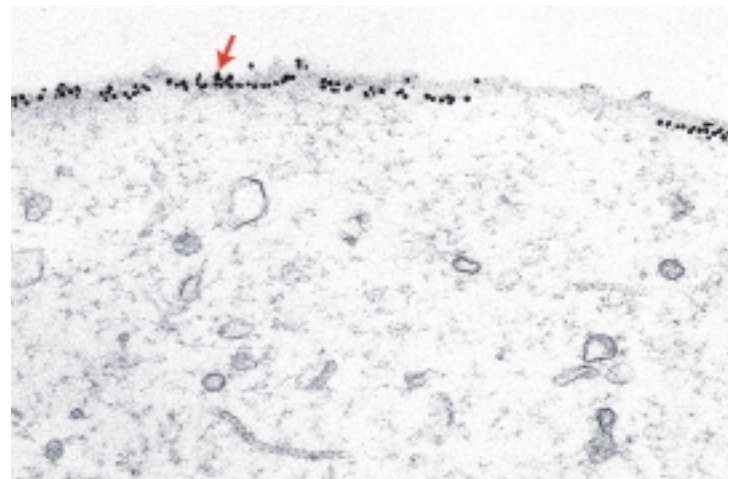
**fig.6.** Analisi al microscopio elettronico dell'espressione di apCAM (punti neri) in neuroni sensoriali di *Aplysia*, mediante anticorpi monoclonali oro-coniugati specifici.

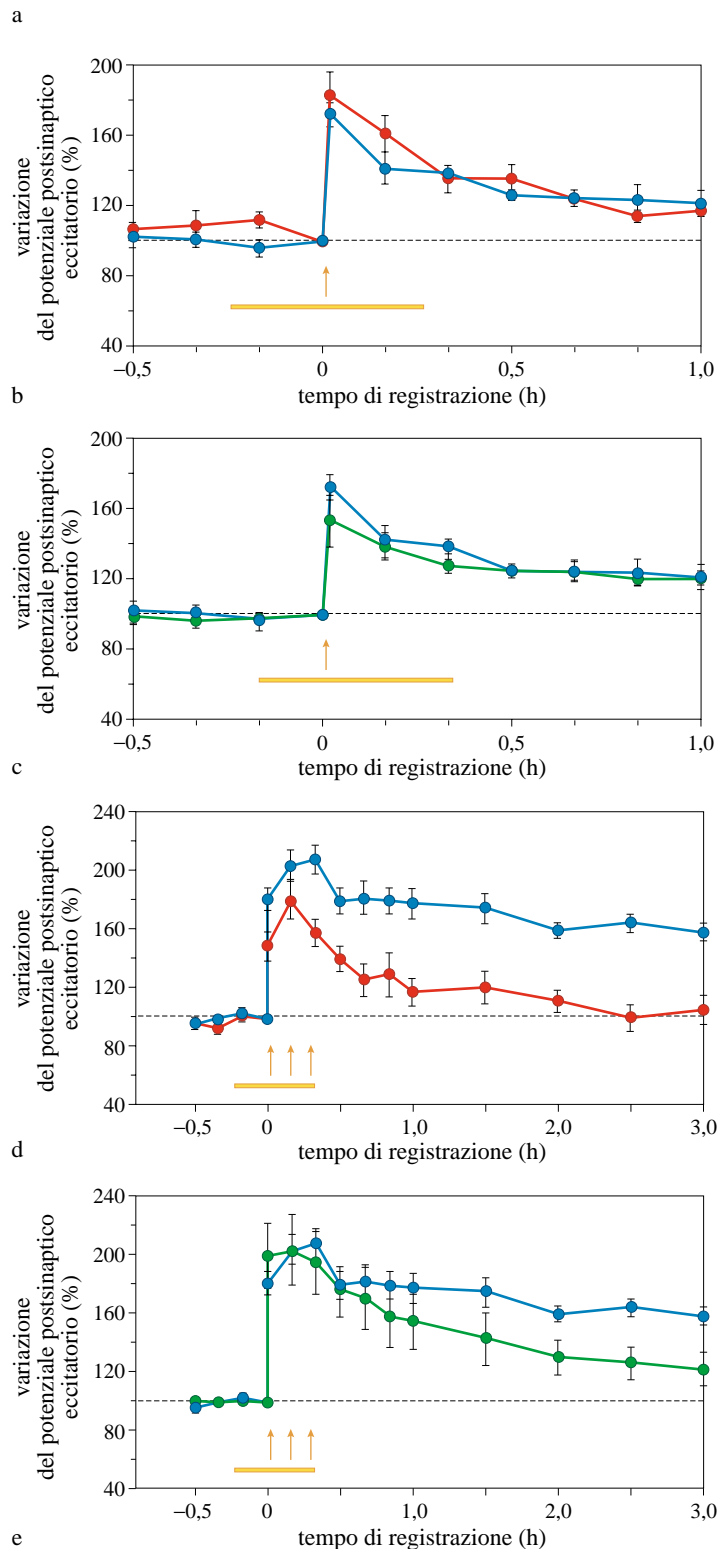
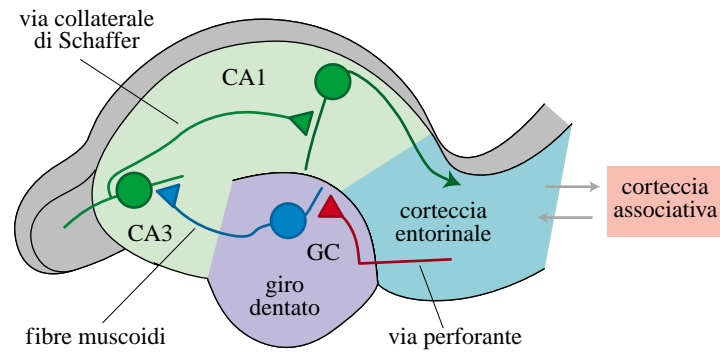
**a.** Prima del trattamento con 5-HT, le molecole di apCAM (freccia rossa) sono adese alla superficie esterna della membrana

cellulare del neurone.

**b.** Dopo il trattamento con 5-HT, la concentrazione superficiale della molecola diminuisce e viene attivata la via endosomiale che conduce all'internalizzazione e all'apparente degradazione di apCAM.

Tratto da: Bailey C.H. *et al.* (1992) *Science*, 256, 645-649.





**fig.7.** Potenziamento a lungo termine nell'ippocampo di ratto.  
**a.** Il circuito neurale dell'ippocampo è formato da tre elementi principali. I neuroni della corteccia entorinale formano connessioni sinaptiche eccitatorie sulle cellule granulari del giro dentato, attraverso la via perforante. Le fibre muscoidi connettono le cellule granulari del giro dentato alle cellule piramidali della regione CA3. Queste ultime si proiettano alle cellule piramidali della regione CA1 attraverso la via collaterale di Schaffer.  
**b., c.** L'LPT indotto nella via collaterale di Schaffer da un treno di stimoli (100 Hz/s, in giallo) è transitorio e non viene influenzato dall'inibitore della PKA, il KT5720 (b, in rosso), o della sintesi proteica, l'anisomicina (c, in verde).  
**d., e.** L'LPT indotto nella via collaterale di Schaffer da tre sequenze di stimoli (100 Hz/s, a una distanza di 5 min l'uno dall'altro) si protrae per più di 3 h ed è invece influenzato dal KT5720 (d, in rosso) e dall'anisomicina (e, in verde). In blu sono rappresentati i controlli. La linea tratteggiata corrisponde al potenziale di membrana a riposo.  
 Ridisegnato da: Huang Y.Y., Kandel E.R. (1994) *Learning & Memory*, 1, 74-82.

Finora è stata presa in considerazione solo una forma semplice di apprendimento implicito in *Aplysia*; esistono, tuttavia, numerose ragioni per ritenere che anche in *Drosophila* sia operativo un meccanismo analogo di consolidamento della memoria nelle forme di apprendimento implicito (Kandel e Abel, 1995). È possibile, mediante metodi classici, condizionare *Drosophila* al riconoscimento di alcuni odori abbinando le indicazioni olfattive alla scossa elettrica. Sono stati isolati numerosi singoli mutanti genici che non sono in grado di apprendere questo tipo di compito e tre di queste mutazioni analizzate in dettaglio sono connesse a una fase della cascata di reazioni mediate da cAMP. Il mutante *dunce* codifica una cAMP-fosfodiesterasi, il *rutagaba* un'adenilato-ciclastasi  $Ca^{2+}$ /calmodulina-dipendente e quello denominato *amnesiac* un neuropeptide PACAP-simile, il cui recettore stimola l'adenilato-ciclastasi. Dall'osservazione che l'espressione inducibile di un inibitore della PKA negli adulti blocca l'apprendimento, è stato dimostrato un ruolo critico della PKA in questa forma di condizionamento classico.

T. Tully e collaboratori (Yin *et al.*, 1994) hanno dimostrato che un addestramento intervallato dà luogo a una memoria a lungo termine che permane per almeno sette giorni e viene bloccata da inibitori della sintesi proteica; per contro, un addestramento concentrato produce soltanto una memoria a breve termine. La memoria a lungo termine viene bloccata in maniera selettiva dall'espressione inducibile di una forma inibitoria di un omologo di CREB di *Drosophila*, dCREB2b. Inoltre, è stato dimostrato (Yin *et al.*, 1995) che la sovraespressione di una forma attivante dell'omologo di CREB1 di *Drosophila*, dCREB2a, riduce notevolmente il numero degli esercizi di addestramento necessari a stabilire la memoria a lungo termine. Questo arricchimento funzionale, grazie al quale un unico esercizio di addestramento concentrato è sufficiente a produrre una memoria a lungo termine, osservabile generalmente solo dopo prove di addestramento intervallate, conferma le evidenze sperimentali già ottenute con *Aplysia*, ovvero che CREB1 e CREB2 rivestono un'importanza fondamentale nell'avviare il processo a lungo termine. Inoltre, il lavoro condotto su *Aplysia* e su *Drosophila* sottolinea l'importanza degli attivatori e dei repressori trascrizionali nella formazione della

memoria a lungo termine e suggerisce che l'equilibrio tra attivatori e repressori è un elemento fondamentale per attivare il consolidamento della memoria.

### Conservazione dei meccanismi molecolari della memoria a lungo termine nell'apprendimento implicito ed esplicito

Gli studi condotti su *Aplysia* e su *Drosophila* indicano che parte dell'interruttore molecolare necessario per la fase di consolidamento della memoria a lungo termine, durante le forme implicite ed elementari di apprendimento, comporta l'induzione mediata da cAMP dei geni precoci. La domanda da porsi è se nel cervello esista, allo stesso modo, un insieme di eventi molecolari capace di contribuire alla formazione di un magazzino mnemonico a lungo termine, per forme più complesse di apprendimento esplicito.

L'immagazzinamento mnemonico per le forme esplicite di apprendimento, tanto negli esseri umani quanto negli animali da esperimento, dipende in larga misura dalle strutture esistenti all'interno del lobo temporale, compreso l'ippocampo. Il problema di quali siano i meccanismi cellulari che vengono utilizzati all'interno dell'ippocampo per l'immagazzinamento della memoria esplicita è stato posto per la prima volta quando T. Bliss e T. Lomo (1973) dimostrarono che i neuroni dell'ippocampo possiedono le caratteristiche di plasticità e durata necessarie per l'immagazzinamento della memoria a lungo termine. Una breve stimolazione ad alta frequenza in una delle tre vie neurali meglio caratterizzate all'interno dell'ippocampo produce un aumento dell'efficienza sinaptica che può permanere per ore o giorni (fig.7). Questo rafforzamento viene definito potenziamento a lungo termine o LTP (*Long Term Potentiation*).

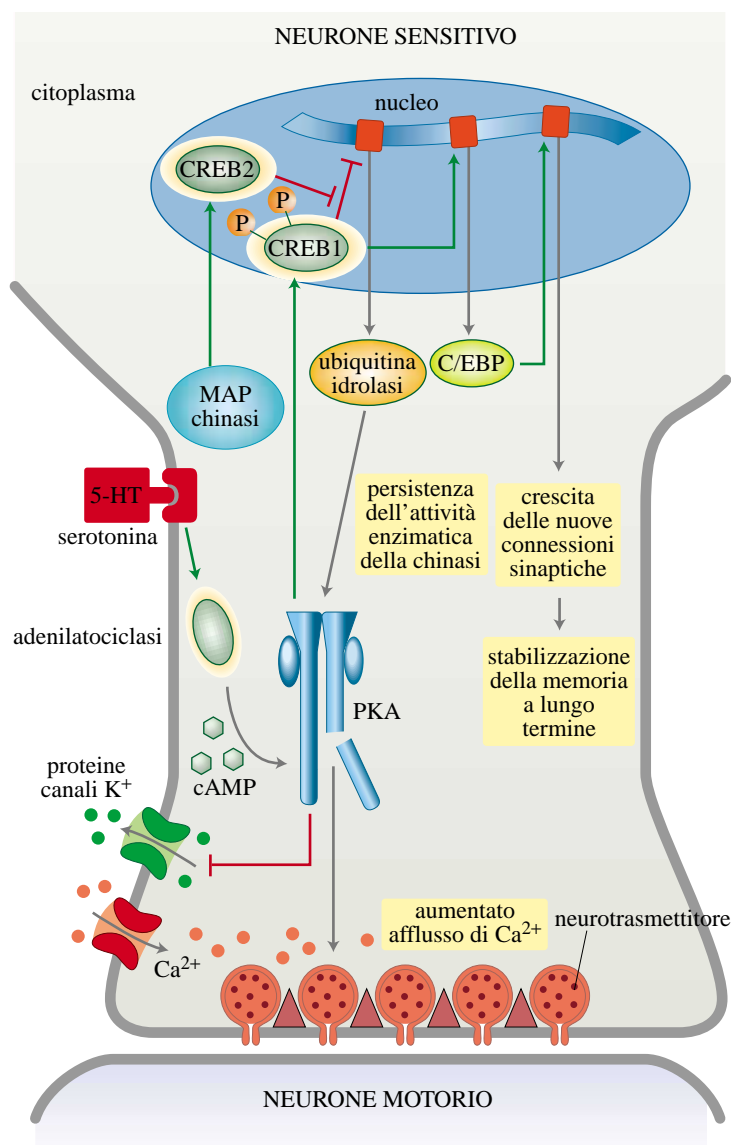
Nell'ippocampo dei mammiferi, l'LTP possiede alcuni dei meccanismi propri della facilitazione sinaptica di *Aplysia*. Per esempio (v. figura 7a), l'LTP delle fibre muscoidi, che si manifesta a livello delle sinapsi tra le cellule granulari della regione dentata e le cellule piramidali della regione CA3, comporta un rafforzamento, dipendente da cAMP, del rilascio del trasmettitore dai terminali presinaptici. Per contro, l'LTP della via collaterale di Schaffer nella regione CA1 è molto più complesso; in questo caso l'induzione è un evento postsinaptico che comporta l'ingresso del calcio attraverso il canale del recettore NMDA (N-metil-D-aspartato) e l'utilizzazione di numerose vie modulate da secondi messaggeri che coinvolgono la tirosinchinasi, la proteinchinasi C e la chinasi II Ca<sup>2+</sup>/calmodulina-dipendente. In aggiunta a queste prime fasi che si verificano nella cellula postsinaptica, l'LTP della via collaterale di Schaffer comporta un rafforzamento del rilascio del trasmettitore dal neurone presinaptico che può essere mediato da messaggeri retrogradi, forse monossido di azoto o monossido di carbonio, i quali si diffondono dalla cellula postsinaptica (Hawkins *et al.*, 1993).

Nei roditori l'ippocampo riveste un ruolo fondamentale per la memoria spaziale, come è stato verificato per mezzo di numerosi modelli. L'uso di tecniche di ingegneria genetica per ottenere topi *knock out*, nei quali è stato soppresso un

gene specifico, o transgenici nei quali si è introdotto un gene nuovo, ha permesso ai ricercatori di esplorare, dal punto di vista genetico, il ruolo di diverse vie metaboliche di trasduzione del segnale nell'LTP e nella memoria comportamentale (Mayford *et al.*, 1995). Anche le conclusioni raggiunte con studi farmacologici precedenti, che hanno suggerito l'importanza della proteinchinasi C, della chinasi II Ca<sup>2+</sup>/calmodulina-dipendente e della tirosinchinasi per l'induzione dell'LTP, sono state convalidate ampiamente da questi studi genetici. Tali ricerche hanno sottolineato l'importanza dell'LTP nella via collaterale di Schaffer per l'apprendimento spaziale. Infatti, nei topi mutanti con gravi menomazioni all'LTP, della via collaterale di Schaffer si ha un apprendimento spaziale ridotto. Per contro, nei topi mutanti con una menomazione selettiva alla via delle fibre muscoidi si ha un apprendimento normale (Huang *et al.*, 1995).

Analogamente alla facilitazione a lungo termine di *Aplysia*, l'LTP che coinvolge la via collaterale di Schaffer è caratterizzato da fasi temporali distinte. La fase precoce è prodotta da una stimolazione tetanica singola, ha una durata di 1 ÷ 3 h e richiede solo la modificazione covalente delle proteine preesistenti. Per contro, la fase tardiva (v. figura 7) è indotta da una stimolazione tetanica ripetuta, persiste per varie ore ed è dipendente da una nuova sintesi proteica e di RNA (Frey *et al.*, 1993; Huang e Kandel, 1994; Nguyen *et al.*, 1994). Come per la memoria a lungo termine di *Aplysia*, anche nell'LTP la trascrizione richiede una finestra temporale critica (Nguyen *et al.*, 1994). Inoltre, la fase tardiva, dipendente dalla trascrizione (v. figure 7d e 7e), dell'LTP nella via collaterale di Schaffer è bloccata dagli inibitori della PKA (Nguyen *et al.*, 1994). Studi recenti condotti da P.V. Nguyen e E.R. Kandel (1996) indicano che questi aspetti dell'LTP sono individuabili anche in una terza via ippocampale principale, la via perforante mediale che origina nella corteccia entorinale e termina nelle cellule granulari della regione dentata. In questa via l'LTP presenta sia una fase precoce, transitoria, che non necessita di sintesi di proteine o di RNA ed è indipendente dall'attivazione della PKA, e una fase tardiva, nella quale è necessaria la sintesi di proteine e di RNA e che può essere bloccata selettivamente dagli inibitori della PKA (v. figure 7b e 7c). Quindi, così come nella facilitazione presinaptica di *Aplysia*, la trascrizione mediata da cAMP sembra essere un meccanismo comune nella forma tardiva di LTP in tutte e tre le vie all'interno dell'ippocampo. Concordano con queste osservazioni i risultati ottenuti da R. Bourtchouladze e collaboratori (1994) su topi privi delle isoforme  $\alpha$  e  $\delta$  di CREB. Questi animali, pur possedendo normali capacità di acquisizione e di ritenzione a breve termine (30 min) per l'apprendimento contestuale, presentano delle deficienze nella memoria a lungo termine, esaminata dopo 1 o 24 h.

Mentre si sta chiarendo il ruolo fondamentale svolto dalla PKA nella fase tardiva mediata trascrizionalmente del PLT, si conosce poco circa l'identità dei geni indotti durante questo processo. L'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA, *tissue-Plasminogen Activator*), una serinaproteasi extracellulare, è indotto dall'attività neurale e la sua espressione è correlata alla differenziazione morfologica dei neuroni (Qian *et al.*, 1993). Studi preliminari hanno dimostrato che una breve applicazione di tPA a fette dell'ippocampo induce



**fig.8.** Modello schematico delle basi molecolari della facilitazione a breve e a lungo termine in *Aplysia*. Nella facilitazione a breve termine gioca un ruolo primario la PKA, attivata dal legame con cAMP, sia provocando una riduzione della corrente in uscita del  $K^+$  e, di conseguenza, un aumento dell'afflusso di  $Ca^{2+}$ , sia agendo direttamente sul sistema molecolare coinvolto nell'esocitosi del trasmettitore. La facilitazione a lungo termine, invece, viene avviata dall'applicazione ripetuta, o prolungata, di serotonina (5-HT). Questa si lega ai suoi recettori di membrana e attiva l'adenilato ciclasi e la sintesi di cAMP, che si lega a PKA, determinando il trasferimento della sua subunità catalitica nel nucleo. Qui la subunità agisce su fattori di trascrizione della famiglia CREB,

attivando CREB1, mentre altre chinasi, quali MAP-chinasi, possono agire come derepressori attraverso CREB2. La regolazione coordinata di CREB1 e CREB2 determina l'induzione di una rete di geni precoci (quadrati rossi), alcuni dei quali codificano proteine regolatrici trascrizionali (C/EBP) che, a loro volta, inducono l'espressione di geni tardivi responsabili del periodo di stabilizzazione. Durante la fase di consolidamento vengono inoltre sintetizzati effettori precoci, tra cui l'ubiquitinidrolasi carbossiterminale, che mantiene l'attività enzimatica della subunità catalitica di PKA, e le catene leggere di clatrina (non mostrate), che contribuiscono agli stadi iniziali della crescita sinaptica. Modificato da: Alberini C. *et al.* (1994) *Cell*, 76, 1099-1114.

un potenziamento a sviluppo lento e a lunga durata ( $> 5$  h) nella via collaterale di Schaffer-CA1 (Y.Y. Huang, T. Abel e E.R. Kandel, osservazioni non pubblicate). Tale potenziamento indotto da tPA viene bloccato da quello indotto da un analogo del cAMP. Inoltre, un inibitore del tPA blocca in maniera selettiva la fase tardiva dell'LTP indotta da treni multipli di stimoli, ma non l'LTP indotta da un solo treno di stimoli. La fase tardiva dell'LTP nella via collaterale di Schaffer è difettosa anche nei topi deficitari di tPA (Y.Y. Huang e E.R. Kandel, osservazioni non pubblicate; Frey *et al.*, 1996). Questi risultati indicano che il tPA può svolgere un ruolo fondamentale nella fase tardiva dell'LTP, mediata da cAMP e da PKA. Se l'azione del tPA nel cervello rimane ancora parzialmente oscura, il suo rapporto con i processi di crescita e di differenziazione nel sistema nervoso in via di sviluppo ne suggerisce la potenziale importanza anche per i cambiamenti strutturali che presiedono alla plasticità a lungo termine delle connessioni sinaptiche nell'adulto.

### Stadi molecolari di immagazzinamento della memoria a lungo termine

I dati provenienti da *Aplysia*, da *Drosophila* e dai roditori indicano che l'immagazzinamento della memoria a lungo termine possiede una rappresentazione cellulare che, attualmente, si può iniziare a definire in termini molecolari. La figura (fig.8) illustra in maniera schematica i tre stadi molecolari, che abbiamo delineato nella conversione della facilitazione presinaptica da breve a lungo termine, in *Aplysia*. In questo modello la 5-HT, un trasmettitore modulatorio rilasciato dagli interneuroni facilitanti che estendono sinapsi sui neuroni sensoriali, agisce in modo da avviare processi mnemonici separati con durata differente. La facilitazione a breve termine, che ha una durata dell'ordine di minuti, inizia con il legame della 5-HT ai suoi recettori di membrana. Ciò attiva l'adenilato ciclasi che catalizza la sintesi di cAMP; questo si lega alla subunità regolatrice della PKA conducendo, come già detto, alla liberazione e all'attivazione della sua subunità catalitica. La PKA agisce su almeno due classi di substrati per aumentare il rilascio del trasmettitore; in primo luogo procede alla fosforilazione dei canali per  $K^+$  o di proteine legate a essi, provocando una riduzione della corrente di uscita di  $K^+$  e producendo un allungamento nel tempo del potenziale di azione e un aumentato ingresso di  $Ca^{2+}$  nel neurone presinaptico. Inoltre, la PKA sembra agire direttamente sul sistema molecolare coinvolto nel meccanismo di esocitosi del trasmettitore. Queste modificazioni si verificano nei terminali presinaptici, sono indipendenti dalla nuova sintesi macromolecolare e la loro durata determina la persistenza della facilitazione a breve termine.

Contrariamente a quanto si verifica per gli effetti a breve termine, l'attivazione ripetuta di interneuroni serotoninergici avvia una facilitazione a lungo termine di durata superiore a un giorno, per la quale è necessaria la sintesi di nuove proteine. Con l'applicazione ripetuta o prolungata di 5-HT, la subunità catalitica della PKA si trasferisce nel nucleo, dove agisce su substrati nucleari che includono fattori di trascrizione della famiglia CREB. La facilitazione a lungo

termine si attiva grazie alla regolazione coordinata di almeno due fattori di trascrizione espressi costitutivamente: la PKA conduce all'attivazione di CREB1; altri sistemi di chinasi, quali la MAP-chinasi, possono esercitare un'azione di derepressione per mezzo di CREB2. Il coordinamento di attivazione e derepressione produce la rapida induzione di una rete di geni precoci durante il periodo di consolidamento della facilitazione a lungo termine. Alcuni di questi geni precoci codificano proteine regolatrici trascrizionali che, a loro volta, sembrano essere indotte a esprimere geni tardivi responsabili del periodo di stabilizzazione. La commutazione di un meccanismo di autosostentamento, per mezzo di geni precoci, spiega le ragioni della brevità della fase dipendente dalla sintesi proteica: l'induzione dei fattori di regolazione è il momento limitante che permette l'espressione degli eventi della fase tardiva. Oltre ai fattori di regolazione, anche gli effettori precoci vengono sintetizzati durante la fase di consolidamento. Tra questi effettori si trovano l'ubiquitinidrolasi carbossiterminale, che sembra partecipare alla divisione proteolitica della subunità regolatrice della PKA – in quanto mantiene l'attività enzimatica della subunità catalitica in assenza di aumento del cAMP – e le catene leggere di clatrina che possono partecipare alla rimozione della apCAM dalla superficie cellulare per mezzo dell'attivazione del percorso endocitotico, contribuendo così agli stadi iniziali della crescita sinaptica.

Pur essendo necessaria per le prime dieci ore successive all'applicazione ripetuta di 5-HT, l'attività enzimatica della PKA non viene conservata. Al contrario, la fase tardiva è caratterizzata da cambi strutturali che si manifestano nel giro di 1 h dopo il trattamento con 5-HT o dopo l'addestramento per mezzo di scossa alla coda e persistono per giorni o settimane. Infatti i geni regolatori indotti possono, a loro volta, avviare ulteriori cicli di attivazione trascrizionale generando una cascata di espressione genica sequenziale che interessa le proteine di codificazione genica, quali la BiP (*Binding Protein*, proteina legante) e la calreticulina, che possono riflettere una risposta generale destinata ad andare incontro alle richieste postraduzionali di un aumento della sintesi proteica, nonché di proteine strutturali necessarie alla costruzione di nuove ramificazioni sinaptiche. La memoria che permane per ore è conservata per mezzo di proteine effettrici o di loro modificazioni funzionali, per esempio quando vengono fosforilate. Alcune proteine effettrici precoci possono anche servire a rinforzare e a conservare la risposta iniziale, per esempio per mezzo dell'attivazione proteolitica di una proteinchinasi. La memoria che permane per giorni, settimane o mesi (più a lungo di metà della vita delle proteine effettrici) viene attivata da geni regolatori precoci i cui prodotti proteici attivano l'espressione conservata dei geni effettori tardivi necessari alla crescita delle nuove connessioni sinaptiche che stabilizzano le fasi finali della memoria a lungo termine.

### Una visione di insieme

La genetica molecolare ha svolto un'intensa opera di unificazione all'interno delle scienze biologiche. I progressi

raggiunti nella comprensione dei geni, della loro espressione e della struttura delle proteine che essi codificano hanno permesso di conoscere con elevata precisione i processi di conservazione della funzione cellulare a livello molecolare che, attualmente, costituiscono il riferimento concettuale comune di numerose discipline inizialmente non collegate tra loro, tra le quali, per esempio, la biologia cellulare, la biochimica, la biologia dello sviluppo, l'immunologia e la neurobiologia. In maniera analoga, si sta procedendo a un'unificazione, potenzialmente più importante, tra la psicologia cognitiva e le neuroscienze, cioè tra la scienza della mente e la scienza del cervello. La possibilità di studiare le basi biologiche delle funzioni mentali sta permettendo di formulare un nuovo modello di analisi dei processi cognitivi, quali la percezione, il linguaggio, l'apprendimento e la memoria. Come indicato nel presente saggio, la chiave che unifica i risultati degli studi molecolari dei processi espliciti e impliciti è stata la scoperta che forme distinte di memoria possiedono un insieme comune di meccanismi genetici per l'immagazzinamento a lungo termine.

In *Aplysia*, questi meccanismi sono costituiti da una sequenza di tre eventi: il primo, di avviamento, comporta l'attivazione di CREB1 mediata da PKA e la derepressione di CREB2; il secondo, di consolidamento, comporta l'induzione, per mezzo di CREB1, di un insieme di geni precoci quali quelli che codificano l'ubiquitinidrolasi carbossiterminale e il fattore di trascrizione ApC/EBP; il terzo, di stabilizzazione, comporta l'abbassamento di concentrazione di apCAM e la formazione di nuovi collegamenti sinaptici. Poiché numerosi studi condotti sul cervello dei vertebrati hanno dimostrato che i geni precoci sono indotti nell'ippocampo e in alcune regioni della neocorteccia per mezzo di trattamenti che producono LTP, sarà particolarmente interessante verificare se i geni indotti da CREB, probabilmente appartenenti alla famiglia C/EBP, sono necessari anche per le modificazioni sinaptiche a lungo termine nei mammiferi.

L'apparente somiglianza di alcuni eventi molecolari presenti in forme durevoli di plasticità sinaptica connessa con l'apprendimento può riflettere il fatto che la memoria a lungo termine, destinata a registrazione implicita ed esplicita, è associata a cambiamenti strutturali (Bailey e Kandel, 1993). Di conseguenza, pur essendo capaci di un'ampia gamma di processi d'apprendimento che utilizzano varie cascate differenti di secondi messaggeri, animali ed esseri umani possono avvalersi di un insieme molto più limitato di meccanismi molecolari per la registrazione mnemonica a lungo termine.

Questo processo a lungo termine, stabile, di autosostentamento è attivato dall'induzione, mediata da cAMP, di una cascata di geni precoci. Il fatto che la fase tardiva dell'LTP, che coinvolge le fibre muscolari, la via collaterale di Schaffer e la via perforante, interessi anche il cAMP permette di ipotizzare che il cAMP e la PKA siano utilizzati anche nell'ippocampo, in quanto in grado di accedere alla macchina molecolare per cambiamenti strutturali a lungo termine. Delineando i geni e le proteine utilizzati dalle forme di LTP, dipendenti e indipendenti da NMDA, è possibile attualmente verificare tale possibilità.

## Ringraziamenti

Il lavoro citato nel presente saggio è stato, in parte, finanziato da un contributo a E.R. Kandel da parte del Howard Hughes Medical Institute e da finanziamenti NIH concessi a C.H. Bailey. T. Abel è Fellow del Damon Runyon-Walter Winchell Cancer Research Fund. Desideriamo ringraziare Harriet Ayers e Irma Trumpet per la stesura del manoscritto e Chuck Lam per la preparazione degli originali delle figure.

## Bibliografia citata

- ALBERINI, C., GHIRARDI, M., METZ, R., KANDEL, E.R. (1994) C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell*, 76, 1099-1114.
- BACSKAI, B.J., HOCHNER, B., MAHAUT-SMITH, M., ADAMS, S.R., KAANG, B.K., KANDEL, E.R., TSIEN, R.Y. (1993) Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science*, 260, 222-226.
- BAILEY, C.H., CHEN, M. (1983) Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science*, 220, 91-93.
- BAILEY, C.H., CHEN, M. (1988) Long-term memory in *Aplysia* modulates the total number of varicosities of single identified sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2373-2377.
- BAILEY, C.H., CHEN, M., KELLER, F., KANDEL, E.R. (1992) Serotonin-mediated endocytosis of apCAM: an early step of learning-related synaptic growth in *Aplysia*. *Science*, 256, 645-649.
- BAILEY, C.H., KANDEL, E.R. (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Annu. Rev. Physiol.*, 55, 397-426.
- BARTSCH, D., GHIRARDI, M., SKEHEL, P.A., KARL, K.A., HERDER, S.P., CHEN, M., BAILEY, C.H., KANDEL, E.R. (1995) *Aplysia* CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell*, 83, 979-992.
- BLISS, T.V.P., LOMO, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, 232, 331-356.
- BOURTOULADZE, R., FRENGUELLI, B., BLENDY, J., CIOFFI, D., SCHUTZ, G., SILVA, A.J. (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79, 59-68.
- BYRNE, J.H., KANDEL, E.R. (1996) Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J. Neurosci.*, 16, 425-435.
- DASH, P.K., HOCHNER, B., KANDEL, E.R. (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*, 345, 718-721.
- FREY, U., HUANG, Y.Y., KANDEL, E.R. (1993) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science*, 260, 1661-1664.
- FREY, U., MÜLLER, M., KUHL, D. (1996) A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J. Neurosci.*, 16, 2057-2063.
- GLANZMAN, D.L., KANDEL, E.R., SCHACHER, S. (1990) Target-dependent structural changes accompanying long-term synaptic facilitation in *Aplysia* neurons. *Science*, 249, 799-802.
- HAWKINS, R.D., KANDEL, E.R., SIEGELBAUM, S.A. (1993) Learning to modulate transmitter release: themes and variations in synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, 16, 625-665.
- HUANG, Y.Y., KANDEL, E.R. (1994) Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the

CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learning & Memory*, 1, 74-82.

- HUANG, Y.Y., KANDEL, E.R., VARSHAVSKY, L., BRANDON, E.P., QI, M., IDZERDA, R.L., MCKNIGHT, G.S., BOURTOULADZE, R. (1995) A genetic test of the effects of mutations in PKA on mossy fiber LTP and its relation to spatial and contextual learning. *Cell*, 83, 1211-1222.
- KAANG, B.K., KANDEL, E.R., GRANT, S.G. (1993) Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*, 10, 427-435.
- KANDEL, E.R., ABEL, T. (1995) Neuropeptides, adenylyl cyclase and memory storage. *Science*, 268, 825-826.
- MAYFORD, M., ABEL, T., KANDEL, E.R. (1995) Transgenic approaches to cognition. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5, 141-148.
- MAYFORD, M., BARZILAI, A., KELLER, F., SCHACHER, S., KANDEL, E.R. (1992) Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in *Aplysia*. *Science*, 256, 638-644.
- MONTAROLO, P.G., GOELET, P., CASTELLUCCI, V.F., MORGAN, J., KANDEL, E.R., SCHACHER, S. (1986) A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science*, 234, 1249-1254.
- NGUYEN, P.V., ABEL, T., KANDEL, E.R. (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science*, 265, 1104-1107.
- NGUYEN, P.V., KANDEL, E.R. (1996) A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J. Neurosci.*, 16, 3189-3198.
- QIAN, Z., GILBERT, M.E., COLICOS, M.A., KANDEL, E.R., KUHL, D. (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature*, 361, 453-457.
- SQUIRE, L.R., ZOLA-MORGAN, S. (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253, 1380-1386.
- YIN, J.C., DEL VECCHIO, M., ZHOU, H., TULLY, T. (1995) CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell*, 81, 107-115.
- YIN, J.C., WALLACH, J.S., DEL VECCHIO, M., WILDER, E.L., ZHOU, H., QUINN, W.G., TULLY, T. (1994) Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*, 79, 49-58.

## Bibliografia generale

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D., a c. di, *Molecular biology of the cell*, 3<sup>a</sup> ed., New York, Garland Publishers, 1994.
- BAUDRY, M., THOMPSON, R.F., DAVIS, J.L., a c. di, *Synaptic plasticity: molecular, cellular and functional aspects*. Cambridge, Mass., MIT Press, 1993.
- KANDEL, E.R., *The behavioral biology of Aplysia: a contribution to the comparative study of opisthobranch molluscs*. San Francisco, W.H. Freeman & Company, 1979.
- KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSELL, T.M., a c. di, *Principles of neural science*, 3<sup>a</sup> ed., New York, Elsevier e North-Holland, 1991.
- SQUIRE, L.R., *Memory and brain*. New York, Oxford University Press, 1987.