

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
PADOVA**

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE
INDIRIZZO BIOLOGIA CELLULARE
CICLO XXI

**Meccanismi di regolazione del GMP ciclico
in neuroni sensoriali olfattivi:
uno studio di real time imaging**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore : Dr.ssa Claudia Lodovichi

Dottoranda : Mara Pietrobon

INDICE

Summary	4
Sommario	7
1. Introduzione	10
1.1 Il sistema olfattivo	10
1.1.1 Epitelio olfattivo	10
1.1.2 I recettori olfattivi	11
1.1.3 Il bulbo olfattivo	14
1.1.4 Il meccanismo di trasduzione del segnale olfattivo	17
1.1.5 Organizzazione dell'epitelio e del bulbo olfattivo	19
1.1.6 Axon guidance	25
1.2 Metabolismo ed effettori del secondo messaggero GMP ciclico	27
1.2.1 La sintesi del cGMP	27
1.2.2 La degradazione del cGMP	29
1.2.3 Gli effettori del cGMP	30
1.3 Il cGMP nel sistema olfattivo	33
1.3.1 Il cGMP nei neuroni sensoriali olfattivi	33
1.3.2 I segnali cGMP innescati dallo stimolo olfattivo	34
1.3.3 Interazione cGMP-cAMP	37
1.3.4 cGMP: un regolatore della trascrizione genica	37
1.3.5 cGMP: il suo ruolo nello sviluppo dei neuroni sensoriali olfattivi	37
1.4 Metodi per misurare il cGMP	40
1.4.1 Saggi radioimmunologici	40
1.4.2 Sonde geneticamente codificate per cGMP	40
Scopo della tesi	43
2 Materiali e Metodi	44
2.1 Colture primarie di neuroni sensoriali olfattivi	44

2.2	Trasfezione di neuroni sensoriali olfattivi	44
2.3	Sistema di imaging e analisi dei dati FRET	43
2.4	Immunocitochimica	48
2.5	Terreni e soluzioni utilizzate	48
2.6	Stimoli su neuroni sensoriali olfattivi <i>in vitro</i>	49
3	Risultati	50
3.1	Colture primarie di neuroni sensoriali olfattivi	50
3.2	Trasfezione di neuroni sensoriali olfattivi in coltura con sensori per cGMP	51
3.3	Dinamiche spazio-temporali di cGMP in neuroni sensoriali olfattivi	52
3.3.1	Effetto del Cloro sui fluorofori	52
3.3.2	Dinamiche spazio-temporali di cGMP in NSO trattati con stimoli farmacologici	52
3.3.3	Sintesi costitutiva di cGMP	55
3.3.4	Dinamiche spazio-temporali di cGMP in NSO trattati con stimoli fisiologici (odori)	56
3.3.5	GC solubili e dinamiche spazio-temporali di cGMP	58
3.3.6	Il Ca ²⁺ e le dinamiche spazio-temporali di cGMP	60
3.3.7	cAMP e cGMP: possibili interazioni	61
4	Discussione	65
5	Bibliografia	70

Summary

Cyclic AMP (cAMP) is the primary second messenger mediating odorant signal transduction in mammals. Several studies indicate that cyclic GMP, cGMP, is also involved in a variety of other olfactory signal transduction processes, such as adaptation, neuronal development, long term cellular responses to odor stimulation. The mechanisms that control the production and the degradation of cGMP are complex, involving two different types of guanylyl cyclases: soluble (GCs) and receptor (GCp), differentially regulated, and several phosphodiesterases (PDE). For this reason the regulation of cGMP remains largely unknown as remains obscure the molecular mechanisms underpinning such different roles played by the same molecule, cGMP, in OSN. The few data available have been obtained only by crude chemical measurements.

Under which conditions, and, most important, how and in which cellular compartments changes in cGMP levels take places, remain to be established.

To address these questions, we studied the spatio-temporal dynamics of changes in cGMP concentration in olfactory sensory neurons (OSN) with real time imaging, taking advantage of genetically encoded, FRET-based sensor for cGMP. FRET experiments were performed on OSN in culture challenged with pharmacological and physiological stimuli and the kinetic of the changes in concentration of cGMP analyzed in the different compartments of the OSN (cilia-dendrite, soma and axon termini- growth cone).

We found that upon pharmacological stimulation with atrial natriuretic peptide (ANP), an activator of receptor guanylyl cyclases (GCp), and SNAP, a donors of nitric oxide (NO) and activator of soluble guanylyl cyclases (GCs), a sustained increase in cGMP is observed throughout the OSN, from cilia-dendrite till the axon termini growth cone.

No rise in cGMP could be detected in neurons stimulated exclusively with IBMX, a non selective inhibitor of PDE, or with zaprinast, a selective inhibitor of cGMP-dependent PDE, excluding a constitutive activity of guanylyl cyclases (GC).

Upon physiological stimulation (odorant mixtures) a rise in cGMP is observed in all compartments of olfactory neurons, including the axon termini-growth cone.

The rise in cGMP is due to GCs, since odor stimulation in presence of GCs inhibitor abolished cGMP response.

We found that carbon monoxide (CO) is not involved in the activation of GCs. Indeed OSN treated with odors in presence of CO inhibitor present a rise in cGMP in the entire neurons.

It is well established that upon odor stimulation a significant rise in Ca^{2+} is observed in OSN. We wonder whether Ca^{2+} could be involved in GCs activation. OSN treated with odors while immersed in free Ca^{2+} ringer solution presented a rise in cGMP in the entire neuron with temporal dynamics analogous to the one observed in neurons challenged with odors while immersed in normal ringer solution.

Finally we evaluated the possibility that cAMP could somehow activate GC. OSN trasfected with the sensor for cGMP and treated with forskolin, a generic adenylyl cyclase (AC) activator, presented a rise in cGMP in the entire neurons.

To assess whether cGMP increase is mediated by cAMP rise, OSN were stimulated with odors in presence of AC inhibitor. In this experimental condition no rise in cGMP could be detected in OSN, in none of the compartments analyzed (cilia-dendrite, soma , axon termini growth-cone).

The question then arise on the mechanism used by cAMP to activated cGMP synthesis. The obvious candidate to think of was PKA, the main effector of cAMP. However, odors stimulation in presence of PKA inhibitor, H89, did not affect the rise of cGMP in OSN.

OSN treated with NO donor presented a rise in cGMP in the entire neurons. The increases in cGMP was faster at the axon termini growth cone than at the soma and at the cilia dendrite. These data seemed to suggest a role of NO-cGMP, in particular at the growth cone. The role of NO and cGMP in axon elongation and regeneration has been studied in other system, and it is known that cGMP level along with cAMP and calcium play a crucial role in axon elongation and steering of the growth cone.

In conclusion in this project, studying the spatio-temporal dynamics of cGMP in real time in isolated OSN, we found that pharmacological and physiological stimuli can induce cGMP rise in the entire neuron, from cilia dendrite to axon termini growth cone, suggesting different role of cGMP in different compartment

of OSN. cGMP synthesis, upon odor stimulation, is connected to the production of cAMP. Thus both cyclic nucleotides seem to play a dual role in the OSN being involved in the transduction of chemical signal (although in different aspects of it) as well as in the process of axon elongation.

Sommario

L'AMP ciclico (cAMP) è il principale secondo messaggero che media la trasduzione del segnale olfattivo nei mammiferi. Vari studi indicano che anche il GMP ciclico (cGMP) è coinvolto in vari processi nei neuroni sensoriali olfattivi (NSO), quali l'adattamento allo stimolo odoroso, lo sviluppo neuronale, le risposte cellulari a lungo termine alla stimolazione odorosa. I meccanismi che controllano la produzione e la degradazione del cGMP sono complessi, coinvolgendo due differenti tipi di guanilato ciclasi : la solubile o citoplasmatica (GCs) e la particolata (GCp), regolate in modo diverso, e varie fosfodiesterasi (PDE).

Per questi motivi la regolazione del cGMP rimane ancora oggi poco conosciuta come restano oscuri i meccanismi molecolari che sottendono ai differenti ruoli dello stesso messaggero, cGMP, nei NSO. I pochi dati disponibili sono stati ottenuti tramite crudi saggi biochimici. Rimane da chiarire in quali condizioni e , soprattutto, come ed in quali compartimenti cellulari si verificano cambiamenti nei livelli di cGMP.

Per rispondere a queste domande abbiamo studiato le dinamiche spazio temporali dei cambiamenti di concentrazione di cGMP in neuroni sensoriali olfattivi (NSO) di ratto in coltura, trasfettati con una sonda geneticamente codificata per il cGMP, basata su FRET. Gli esperimenti di FRET sono stati condotti stimolando i NSO con stimoli farmacologici e fisiologici e analizzando le cinetiche dei cambiamenti di concentrazione di cGMP in differenti compartimenti subcellulari delle cellule (cilia-dendrite, soma, assone terminale-cono di crescita).

In seguito al trattamento con lo stimolo farmacologico atrial natriuretic peptide (ANP), un attivatore delle guanilato ciclasi di membrana (GCp), e SNAP, un donatore di ossido nitrico (NO) e attivatore delle guanilato ciclasi solubili (GCs), un sostenuto incremento del cGMP è stato osservato in tutto il NSO, dalle cilia – dendrite sino al terminale assonico.

Nessun incremento della concentrazione di cGMP è stato osservato nei NSO stimolati esclusivamente con IBMX, un inibitore aspecifico delle fosfodiesterasi,

o con zaprinast, un inibitore specifico delle fosfodiesterasi dipendenti da cGMP, indicando che non vi è attività costitutiva delle GC nei NSO.

In seguito a stimolazione fisiologica (mix di odori) un incremento di cGMP è stato osservato in tutti i compartimenti cellulari dei NSO, incluso l'assone terminale-cono di crescita. L'incremento è dovuto all'attivazione delle guanilato ciclasti solubili, dato che la risposta del cGMP alla stimolazione odorosa è abolita in presenza di un inibitore delle GCs.

Il messaggero gassoso monossido di carbonio (CO) non è coinvolto nella attivazione delle GCs. Infatti i NSO stimolati con odori in presenza di un inibitore di CO presentano un incremento dei livelli di cGMP in tutto il neurone, dalle cilia-dendrite all'assone terminale.

Dopo la stimolazione fisiologica con gli odori si verifica un significativo incremento di Ca^{2+} nei NSO. Ci siamo chiesti se il Ca^{2+} potesse essere coinvolto nella attivazione delle GCs. Neuroni sensoriali olfattivi trattati con gli odori in soluzione fisiologica (ringer) priva di Ca^{2+} hanno mostrato un incremento di cGMP in tutti i compartimenti subcellulari (cilia-dendrite, soma, assone terminale-cono di crescita) con dinamiche temporali analoghe a quelle osservate in neuroni stimolati con la mix odorosa in soluzione fisiologica normale.

Abbiamo quindi valutato la possibilità che il cAMP possa in qualche modo portare ad una attivazione delle GC. I NSO, trasfettati con il sensore per cGMP, e stimolati con forskolina, un generico attivatore della adenilato ciclasti (AC), hanno mostrato un incremento del cGMP in tutto il neurone, dalle cilia-dendrite all'assone terminale.

Per valutare se il segnale cGMP è mediato dagli incrementi di cAMP i NSO sono stati stimolati con odori in presenza di un inibitore di AC. In queste condizioni sperimentali non si sono rilevati aumenti di cGMP nelle cellule, in nessuno dei compartimenti analizzati. La questione che sorge di conseguenza è attraverso quale meccanismo il cAMP promuove la sintesi di cGMP. L'ovvio candidato è stata la PKA, che rappresenta il principale effettore del cAMP. La stimolazione fisiologica con gli odori in presenza di un inibitore di PKA tuttavia ha prodotto un incremento di cGMP in tutto il neurone, dalle cilia-dendrite all'assone terminale.

I NSO stimolati con un donatore di NO hanno mostrato un incremento di cGMP in tutto il neurone. L'incremento del cGMP è più rapido all'assone terminale-cono

di crescita rispetto al soma e al cilia-dendrita. Questi dati sembrano suggerire un ruolo di NO-cGMP, in particolare al cono di crescita. Il ruolo di NO e del cGMP nell'allungamento assonale e nella rigenerazione neuronale sono stati studiati in altri sistemi, ed è noto che i livelli di cGMP, come pure quelli di cAMP e del calcio, rivestono un ruolo cruciale nel controllo della crescita direzionata degli assoni.

In conclusione in questo progetto, studiando le dinamiche spazio-temporali del cGMP in real time in NSO isolati, abbiamo osservato che gli stimoli farmacologici e fisiologici possono indurre un incremento di cGMP in tutto il neurone, dalle cilia-dendrite all'assone terminale-cono di crescita, suggerendo ruoli diversi per cGMP nei diversi compartimenti dei NSO.

La sintesi di cGMP, dopo stimolazione con gli odori, è connessa con la produzione di cAMP. Pertanto entrambi i nucleotidi ciclici sembrano avere un duplice ruolo nei NSO, essendo coinvolti nei meccanismi di trasduzione del segnale olfattivo (anche se in differenti aspetti) e nei processi di allungamento assonale.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il sistema olfattivo

Il sistema olfattivo è un sistema estremamente sofisticato che permette agli animali di riconoscere e distinguere migliaia di odori diversi presenti nell'ambiente. L'olfatto svolge un ruolo fondamentale nel guidare i comportamenti sessuali, le cure parentali dei piccoli, la percezione di situazioni di pericolo e nel procacciamento di cibo. In modo più esteso, per la maggior parte dei vertebrati e degli invertebrati, le interazioni con l'ambiente e le interazioni tra conspecifici e non, si basano su stimoli olfattivi. La percezione degli odori ha inizio nei neuroni sensoriali olfattivi (NSO) presenti nell'epitelio olfattivo. Questi neuroni trasmettono poi il segnale al bulbo olfattivo e da qui passa alla corteccia cerebrale.

1.1.1. Epitelio olfattivo

L'epitelio olfattivo è un epitelio colonnare pseudostratificato che riveste strutture cartilaginee convolute dette turbinati, poste nella parte posteriore delle cavità nasali. L'epitelio olfattivo contiene tre tipi cellulari: i neuroni sensoriali olfattivi, le cellule di sostegno e le cellule basali (1,2).

I neuroni sensoriali olfattivi hanno una tipica morfologia bipolare, con un unico dendrita non arborizzato che si porta verso la superficie dell'epitelio, a contatto con le cavità nasali, e l'assone che proietta al bulbo olfattivo nel cervello (**fig.1**). Il dendrita termina all'estremità apicale con un'espansione globosa, definita knob, da cui si dipartono numerose cilia. Queste ultime sono estensioni filiformi che protrudono nella cavità nasale e sulla cui membrana si trovano i recettori olfattivi (RO). Le cilia sono immerse nel muco secreto dalle cellule di sostegno dell'epitelio olfattivo e dalle ghiandole di Bowman. Si ritiene che le specifiche caratteristiche biochimiche del muco siano rivolte a creare l'ambiente ideale per la percezione degli odori. Il muco contiene proteine leganti gli odori che sono secrete dalla ghiandola nasale laterale: hanno la funzione di legare gli odori idrofobici, permettendo il loro passaggio alla soluzione acquosa che costituisce il muco. Un tratto distintivo di questi neuroni, che presentano un'emivita di 60-90

giorni circa nei mammiferi, è quello di rigenerarsi continuamente durante la vita dell'organismo (3).

Le cellule sustentcolari di sostegno sono cellule di supporto. La loro funzione è di isolare elettricamente i neuroni sensoriali olfattivi, secernere componenti del muco e contenere enzimi detossificanti.

Le cellule basali sono i precursori dei neuroni sensoriali olfattivi (1,2).

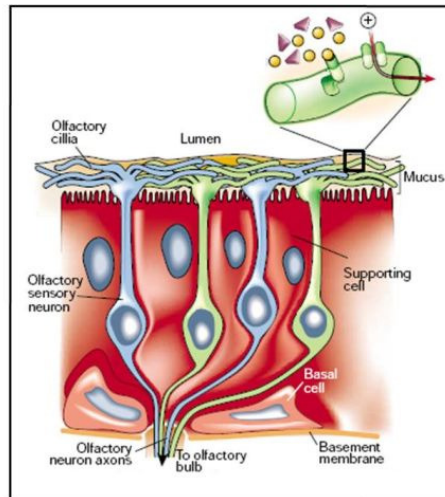


Fig.1 Rappresentazione dell'epitelio olfattivo. Si distinguono i tre tipi cellulari: i neuroni sensoriali olfattivi, le cui cilia sporgono nel lume della cavità nasale, le cellule di supporto sustentcolari e le cellule basali. Sulle cilia dei NSO sono espressi i recettori olfattivi che legano le molecole odorose (3).

1.1.2 I recettori olfattivi

Le molecole odorose vengono riconosciute e legate dai recettori olfattivi (RO) presenti sulle cilia dei NSO. L'esistenza di tali recettori è stata dimostrata nel 1991 da R. Axel e L. Buck, valendo loro il premio Nobel per la Medicina nel 2004 (4). Gli odori sono piccole molecole organiche, che si differenziano tra loro per numerosi parametri tra cui: la lunghezza della catena carboniosa, il tipo ed il numero dei gruppi funzionali e la carica. La percezione di un odore dipende dalla struttura chimica della molecola odorosa ma anche dalla concentrazione della sostanza odorosa, nonché dalla variabilità soggettiva. Per esempio la molecola di indolo viene percepita come un odore putrido ad alte concentrazioni, come un odore floreale a basse concentrazioni. L'androstenedione invece a basse concentrazioni viene percepito come odore di urina da alcuni individui, come

odore mediamente piacevole da altri e non viene percepito per niente da altri ancora.

Le molecole odorose vengono riconosciute e legate dai recettori olfattivi (RO) presenti sulle cilia dei NSO (4). Questi recettori appartengono a una grande famiglia multigenica che nei mammiferi comprende più di 1000 membri, arrivando a occupare fino al 2% del genoma dei roditori (5). I geni codificanti per i RO sono raggruppati in cluster presenti nella maggior parte dei cromosomi. Da un punto di vista evolutivo il numero degli pseudogeni nell'ambito della famiglia dei RO è andato aumentando. Essi sono infatti solo il 20% nei roditori, che contano quindi su un repertorio molto vasto di recettori. Nell'uomo invece circa il 60% dei geni codificanti per i RO sono pseudogeni (6,7,8). L'espressione di questi geni è ristretta ai neuroni sensoriali olfattivi maturi e inizia durante la vita embrionale, prima che l'assone raggiunga il bulbo olfattivo (3). I NSO maturi si distinguono per l'espressione dell'olfactory marker protein (OMP). Questa è una proteina citoplasmatica la cui funzione non è nota ed è espressa tipicamente ed esclusivamente nei neuroni sensoriali olfattivi maturi (9). Essa inizia ad essere espressa nei roditori intorno al giorno embrionale 13-14 (E13-E14) (9).

Ogni neurone olfattivo esprime un solo tipo di RO, così che ciascun neurone sensoriale olfattivo è distinto funzionalmente e identificato molecularmente dal tipo di recettore espresso, dando luogo alla regola: un recettore-un neurone (10). I RO sono espressi in modo monoallelico: in ciascun neurone sensoriale olfattivo l'espressione del recettore olfattivo deriva esclusivamente da un allele. Si ritiene che questo meccanismo assicuri che un solo tipo di recettore sia presente in ogni neurone sensoriale (10). Da un punto di vista strutturale la regione codificante dei RO è lunga circa 1kb e manca di introni. I RO appartengono alla famiglia dei recettori associati a proteine G e ne condividono le caratteristiche salienti, quali la presenza di 7 domini transmembrana legati da loop intracellulari ed extracellulari di varia lunghezza e numerose sequenze brevi altamente conservate. Tuttavia presentano anche tratti peculiari dei recettori olfattivi, quali un secondo loop extracellulare insolitamente lungo con residui di cisteina altamente conservati (3). Presentano inoltre delle regioni ipervariabili, in cui la sequenza è fortemente diversa tra un recettore e l'altro, nella terza, quarta e quinta regione transmembrana. Nei modelli tridimensionali di recettori associati a proteine G,

questi tre tratti formano una tasca che molto probabilmente costituisce il sito di legame per le molecole odorose (**fig.2**) (3,8).

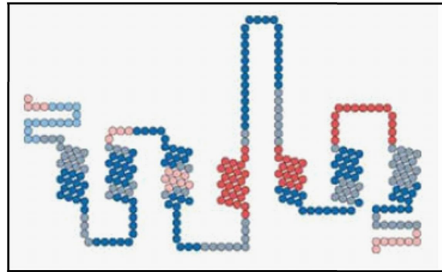


Fig.2 Struttura di un recettore olfattivo. I residui aminoacidici più conservati sono rappresentati nelle tonalità del blu, mentre quelli caratterizzati da una maggiore variabilità sono rappresentati nelle tonalità del rosso (3).

Il codice combinatoriale

Il recettore espresso definisce il “molecular receptive range” del neurone, cioè determina il range di odori che quel singolo NSO è in grado di legare e riconoscere. Ogni recettore olfattivo riconosce una specifica porzione della molecola odorosa (odotopo) (11). Le molecole odorose possono presentare diversi odotopi al loro interno. Ciascun odore viene perciò riconosciuto da diversi recettori olfattivi che riconoscono i diversi odotopi di cui è costituito (11).

Inoltre, ogni singolo RO è in grado di riconoscere molecole odorose diverse che presentano lo stesso odotopo. In questo modo ciascun odore sarà codificato dall’attivazione di una particolare combinazione di recettori olfattivi, ma ogni singolo recettore può essere una delle componenti del codice di diversi odori. Questo viene definito codice combinatoriale e permette al sistema olfattivo di riconoscere un numero enorme di odori (**fig.3**) (11).

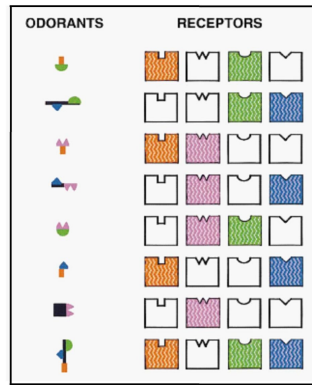


Fig.3 Modello di codice combinatoriale. A sinistra sono rappresentate varie molecole odorose con i vari odotopi rappresentati in colori diversi. A destra sono rappresentati nei corrispondenti colori i RO attivati da tali epitopi. L'identità dei diversi odori è codificata perciò da diverse combinazioni di recettori. Tuttavia ciascun recettore può fungere da componente del codice combinatoriale per odori diversi (11).

1.1.3 Il bulbo olfattivo

Il bulbo olfattivo costituisce la prima stazione di ritrasmissione dell'informazione olfattiva. Come altre aree cerebrali presenta tre tipi di neuroni: i neuroni afferenti, i neuroni efferenti e gli interneuroni (12).

I neuroni sensoriali olfattivi costituiscono le afferenze sensoriali del bulbo olfattivo. L'assone dei neuroni sensoriali olfattivi è un processo sottile (0.2µm di diametro), amielinico, non ramificato, che dopo aver attraversato l'osso cribiforme raggiunge il bulbo olfattivo (**fig.4**).

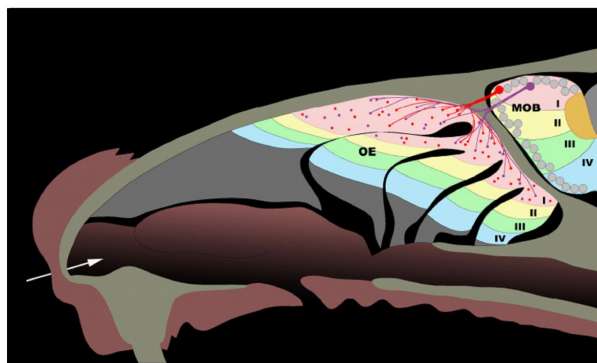


Fig.4 Schema di una sezione sagittale di testa di topo. I turbinati sono delle espansioni cartilaginee che incrementano la superficie dell'epitelio olfattivo che le ricopre. Il neuroepitelio è suddiviso in 4 zone, rappresentate nei diversi colori. Gli assoni dei neuroni sensoriali olfattivi attraversano l'osso cribiforme e proiettano al bulbo olfattivo (MOB, main olfactory bulb) dove formano strutture sferiche di neuropilo chiamate glomeruli (3).

Il bulbo olfattivo fa parte del prosencefalo dei vertebrati ed è costituito da due strutture ovoidali simmetriche che si trovano immediatamente sopra le cavità nasali (12,13). Esso ha un'organizzazione laminare suddivisa, procedendo dallo strato più superficiale a quello più interno, in: strato del nervo olfattivo (ONS), strato glomerulare (GL), strato plessiforme esterno (EPL), strato delle cellule mitrali (MCL), strato plessiforme interno (IPL) e strato dei granuli (GCL) (**fig.5**). Gli assoni dei neuroni sensoriali olfattivi stabiliscono sinapsi eccitatorie, glutamatergiche, con i dendriti delle cellule postsinaptiche del bulbo olfattivo dando luogo ai glomeruli. I glomeruli sono strutture sferiche di neuropilo, di dimensioni variabili, tra gli 80 e 160 μm in raggio e tra 30 e 50 μm in topo, disposte su tutta la superficie esterna dei bulbi. Sono costituiti dalla ramificazione terminale degli assoni dei NSO che contraggono sinapsi con i dendriti delle cellule postsinaptiche del bulbo e con le cellule periglomerulari, poste tutto intorno ai singoli glomeruli. I glomeruli sono inoltre avvolti dalle cellule gliali (12,13).

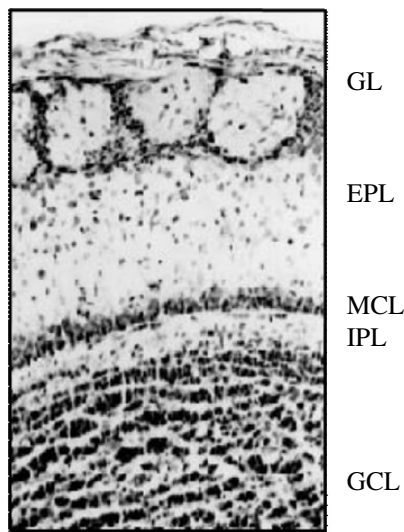


Fig.5 Sezione di bulbo olfattivo dopo colorazione di Nissl. Sono visibili: lo strato dei glomeruli (strutture sferiche di neuropilo) lo strato plessiforme esterno che contiene i corpi cellulari delle cellule tufted, lo strato delle cellule mitrali, lo strato plessiforme interno e quello dei granuli.

I neuroni postsinaptici del bulbo sono rappresentati dalle **cellule mitrali e dalle cellule tufted**. Queste cellule costituiscono la via efferente del bulbo olfattivo. Le cellule mitrali sono neuroni glutamatergici che presentano i corpi cellulari disposti

a formare un unico strato, lo strato delle cellule mitrali. I corpi cellulari delle cellule tufted si trovano invece a diversi livelli nello strato plessiforme esterno ed in base a tale posizione vengono distinte in esterne, medie e interne. Sia le cellule mitrali che le cellule tufted presentano un unico dendrita primario che penetra in un unico glomerulo, nel quale forma un'estesa arborizzazione. Presentano inoltre dendriti secondari che decorrono orizzontalmente nell' EPL e contraggono sinapsi dendro-dendritiche con le cellule dei granuli. Gli assoni delle cellule mitrali e le cellule tufted si portano fuori dal bulbo olfattivo, formando il tratto laterale olfattorio, che trasmette l'informazione olfattiva ad altre stazioni cerebrali.

Gli interneuroni del bulbo olfattivo sono rappresentati **dalle cellule periglomerulari e dalle cellule dei granuli**. Le cellule periglomerulari (PG) includono diversi tipi di cellule quali le cellule ad assone corto, le cellule tufted esterne e le cellule periglomerulari (12,13). Le cellule PG contraggono sinapsi con i dendriti delle cellule mitrali e cellule tufted, oltre che con i terminali assonici dei NSO. Le cellule PG sono una popolazione eterogenea non solo morfologicamente, ma anche biochimicamente. Esse infatti esprimono diversi neurotrasmettitori, quali il GABA, l'ossido nitrico, il NADPH, la dopamina ed il neuropeptide Y. Per tale motivo le sinapsi che formano con le cellule pre- e post- sinaptiche del bulbo non hanno solo funzione inibitoria, ma in senso più ampio modulatoria (13,14).

Le cellule dei granuli sono neuroni gabaergici il cui corpo cellulare si trova nello strato dei granuli e sono prive di assone. Queste cellule formano sinapsi inibitorie dendro-dendritiche con i dendriti secondari delle cellule mitrali e delle cellule tufted.

Le cellule PG e le cellule dei granuli rigenerano costantemente durante tutta la vita dell'individuo. Esse originano dalla zona sub ventricolare (SVZ) intorno ai ventricoli laterali e da qui si portano al bulbo attraverso uno specifico processo di migrazione lungo la rostral migratory stream (RSM). Una volta giunte al bulbo olfattivo si differenziano in interneuroni (12,13,14).

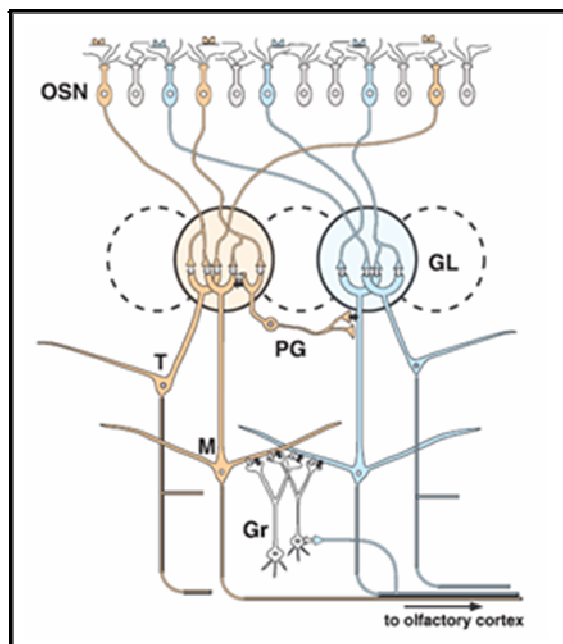


Fig.6: Diagramma dei circuiti base che riassume l'organizzazione sinaptica del bulbo olfattivo. Due moduli (rosa e blu) rappresentano due diversi tipi di RO. Le cellule mitrali (M) e tufted (T) sono i neuroni efferenti del bulbo, le cellule dei granuli (Gr) e le cellule periglomerulari (PG) sono interneuroni locali (14).

1.1.4 Il meccanismo di trasduzione del segnale olfattivo

Le molecole odorose entrano nella cavità nasale, si dissolvono nel muco che ricopre la superficie dell'epitelio olfattivo e si legano ai RO sulle cilia dei neuroni sensoriali olfattivi (15). In seguito a questo legame si ha l'attivazione di una specifica proteina G stimolatoria, Golf, che a sua volta attiva l'adenilato ciclasi di tipo III, con conseguente produzione di adenosina monofosfato ciclico (cAMP) (16). Il cAMP si lega al versante intracellulare di canali cationici definiti canali CNG (cyclic nucleotide gated channel: canali attivati da nucleotidi ciclici) e aprendoli permette l'influsso di ioni Ca^{2+} e Na^+ (17,18). L'aumento della concentrazione di Ca^{2+} nelle cilia in seguito all'apertura dei canali CNG regola sia l'attivazione sia la desensitizzazione dei neuroni sensoriali olfattivi. Infatti l'aumentata concentrazione di Ca^{2+} induce una corrente uscente di Cl^- , quindi un'ulteriore depolarizzazione, che porta all'insorgenza del potenziale d'azione (18). Il Ca^{2+} ha anche un effetto di feedback negativo a vari livelli della catena di trasduzione del segnale. Il Ca^{2+} legando la calmodulina forma un complesso Ca-calmodulina che si lega direttamente ai canali CNG riducendone l'affinità per il

cAMP e quindi la probabilità di apertura dei canali stessi (fig.5). Il Ca^{2+} inoltre ha un'azione inibitoria sull'adenilato ciclasi, bloccando la sintesi di cAMP, e un'azione attivatoria sulle fosfodiesterasi, aumentando la degradazione di cAMP (15,16,17).

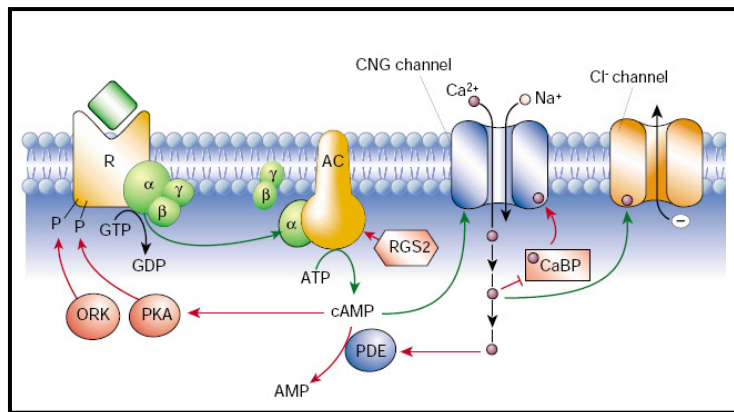


Fig.7 Rappresentazione della via di trasduzione del segnale olfattivo mediata dai RO sulle ciglia dei NSO. In seguito al legame con la molecola odorosa il recettore olfattivo attiva la proteina Golf, che a sua volta attiva l'adenilato ciclasi di tipo III. L'incremento di cAMP che ne segue porta all'apertura dei canali CNG con conseguente ingresso di Ca^{2+} e Na^+ . L'aumento di Ca^{2+} permette l'apertura dei canali per il Cl^- con conseguente efflusso di Cl^- ed ulteriore depolarizzazione del neurone (3).

L'esposizione agli odori porta ad un incremento della concentrazione non solo di cAMP, come descritto sopra, ma anche di un altro nucleotide ciclico: **il guanosin monofosfato ciclico (cGMP)** (19, 20, 21).

La risposta del cGMP a seguito di stimoli odorosi si instaura più lentamente rispetto a quella del cAMP ed è sostenuta nel tempo (19). Questa cinetica ha suggerito che il cGMP non sia coinvolto negli eventi iniziali della trasduzione del segnale nei neuroni sensoriali olfattivi, quanto piuttosto nella modulazione delle risposte adattative e a lungo termine, ad esempio nel controllo della trascrizione genica o nei meccanismi di adattamento (22, 23, 24, 25).

I meccanismi che regolano la sintesi e la degradazione di cGMP nei neuroni sensoriali olfattivi sono ancora poco conosciuti. Introduremo più avanti in questo capitolo i caratteri generali di questo secondo messaggero.

1.1.5 Organizzazione dell'epitelio e del bulbo olfattivo

La specificità delle connessioni tra neuroni è un evento fondamentale per il normale funzionamento del sistema nervoso. Nei sistemi sensoriali i neuroni presenti nelle strutture anatomiche più periferiche sono ordinati in maniera tale che neuroni che decodificano caratteristiche simili dello stimolo sono disposti secondo un preciso ordine spaziale. I neuroni sensoriali a loro volta proiettano a specifici target del sistema nervoso centrale, mantenendo i rapporti spaziali presenti nelle strutture periferiche, dando luogo così alla formazione di mappe topografiche. Le mappe topografiche creano una rappresentazione interna del mondo esterno. Il sistema olfattivo si differenzia per varie ragioni da altri sistemi sensoriali. Nell'epitelio olfattivo i neuroni sensoriali non sono disposti secondo un preciso ordine spaziale, ma sono distribuiti in modo pressochè casuale (26, 27). Analisi della distribuzione spaziale dei neuroni esprimenti recettori olfattivi diversi, tramite ibridazione *in situ*, hanno rivelato che i NSO che esprimono un dato recettore sono ristretti ad una delle quattro zone (in direzione dorso-ventrale,) in cui viene suddiviso l'epitelio olfattivo. Tuttavia, all'interno di ciascuna zona, i neuroni esprimenti recettori diversi sono frammisti fra loro in modo casuale. La situazione è completamente diversa a livello del bulbo olfattivo, dove è presente una mappa topografica ben precisa ed altamente conservata (26, 27). Gli assoni di neuroni esprimenti lo stesso recettore convergono con squisita precisione a formare glomeruli in specifiche posizioni sul lato mediale e sul lato laterale di ciascun bulbo olfattivo. Ressler e coll. (26) e Vassar e coll.(27), tramite metodiche di ibridazione *in situ* su sezioni di bulbo, hanno osservato che assoni di neuroni esprimenti lo stesso recettore olfattivo convergevano su uno o pochi glomeruli disposti sul lato mediale e laterale di ciascun bulbo olfattivo. La posizione dei glomeruli risulta simmetrica nei due bulbi ed è costante in animali diversi della stessa specie, dando luogo ad una vera e propria mappa sensoriale (27).

Infatti, in conseguenza di questa organizzazione anatomica, un odore è rappresentato da uno specifico pattern spaziale di glomeruli attivati.

Grazie ad una nuova strategia genetica, messa a punto da Mombaerts e coll. nel 1996 (28), è stato possibile "visualizzare" la mappa sensoriale nel bulbo olfattivo. Questa metodica molecolare prevede la modifica del locus del gene

codificante per i recettori olfattivi in modo tale che il locus codifichi per un RNA messaggero bicistronico per cui il RO è coespresso con uno specifico marker (tau-LacZ) (28). La sostituzione del gene endogeno con il costrutto si ottiene mediante ricombinazione omologa, per cui alla fine si ottengono linee di topi geneticamente modificate, in cui uno specifico recettore è coespresso con il marker. Un esempio è offerto dal recettore P2. Nei topi geneticamente modificati (P2-IRES-tau-LacZ) il recettore P2 è coespresso con tau-LacZ. Pertanto i neuroni esprimenti P2 sono marcati nella loro interezza, dopo colorazione con il substrato X-gal, dalle cilia sino al terminale assonale. In questo modo tali neuroni possono essere facilmente identificati nell'epitelio e nel bulbo (28,29). Questo permette inoltre di seguire il destino di ogni singola fibra esprimente un dato recettore olfattivo, e quindi letteralmente di visualizzare la mappa sensoriale nel bulbo olfattivo (28). È stato osservato che neuroni esprimenti il recettore P2 proiettano a due glomeruli posti uno sul lato mediale ed uno sul lato laterale di ciascun bulbo olfattivo. La posizione dei glomeruli P2 è simmetrica nei due bulbi e conservata in animali della stessa specie. I glomeruli P2 presentano una struttura omogenea, risultano composti da fibre esprimenti solo i recettori P2 (29). In studi successivi il marcatore LacZ è stato sostituito con GFP, che offre il vantaggio di essere immediatamente visualizzabile, anche in animali *in vivo*. Questa nuova tecnica ha permesso di analizzare nel dettaglio la formazione dei glomeruli relativi a NSO che esprimono un dato recettore.

Si possono distinguere due livelli di organizzazione a livello del bulbo: tutti gli assoni di NSO esprimenti lo stesso recettore convergono a formare lo stesso glomerulo e il posizionamento di ogni glomerulo è specifico nel bulbo olfattivo. Le quattro zone in cui è stato suddiviso l'epitelio olfattivo corrispondono grosso modo a quattro zone nel bulbo olfattivo in senso dorso ventrale (**fig7**). Pertanto gli assoni dei neuroni sensoriali localizzati in una data zona dell'epitelio proiettano alla zona corrispondente nel bulbo olfattivo. Nonostante i neuroni sensoriali olfattivi rigenerino continuamente, la specificità della convergenza assonale, quindi la mappa glomerulare (o mappa sensoriale), è perfettamente conservata (28,29).

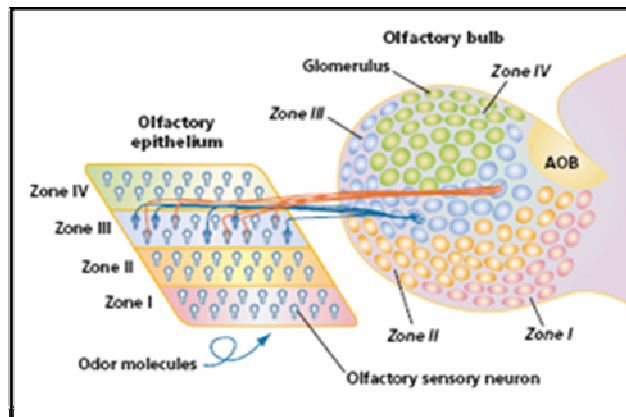


Fig.8 Organizzazione epitelio/bulbo I neuroni sensoriali olfattivi che esprimono lo stesso recettore, qui rappresentati con lo stesso colore, sono frammisti fra loro a livello dell'epitelio, ma i loro assoni convergono con estrema precisione ai glomeruli target nel bulbo. NSO esprimenti lo stesso recettore olfattivo convergono sullo stesso glomerulo (14).

Lo sviluppo dei glomeruli

I glomeruli non rappresentano una popolazione omogenea che si sviluppa in modo sincrono ma si sviluppano secondo una dinamica temporale specifica per ciascuno. La loro formazione risulta inoltre influenzata in modo diverso da molecole specifiche e dall'attività neuronale. In questo scenario eterogeneo è possibile identificare tappe comuni allo sviluppo dei glomeruli. Gli assoni dei NSO, passato l'osso cribiforme, raggiungono il bulbo olfattivo (intorno a E13 nei roditori), e attraversano lo strato del nervo olfattivo per raggiungere lo strato glomerulare (29). In un primo tempo i neuroni che esprimono lo stesso recettore proiettano ad una certa area del bulbo olfattivo. Progressivamente gli assoni si riuniscono in un'area sempre più stretta e definita in modo da formare glomeruli veri e propri (29). Inizialmente per ogni lato, mediale e laterale, di ciascun bulbo olfattivo si formano molteplici glomeruli connessi tra loro da fasci di assoni. Con il procedere dello sviluppo le connessioni tra glomeruli omogenei (formati da fibre esprimenti lo stesso recettore) vengono eliminate, come pure si riduce il numero dei glomeruli soprannumerari, per arrivare al termine dello sviluppo a uno o due glomeruli per ciascun lato di ogni bulbo (29). In una prima fase di sviluppo i glomeruli non sono omogenei, vale a dire innervati da neuroni esprimenti solo lo

stesso tipo di recettore, ma possono presentare innervazione da parte di fibre esprimenti recettori diversi (eterogenei). Questi glomeruli misti scompaiono con il progredire dello sviluppo (29). Riportiamo due esempi relativi allo sviluppo di glomeruli formati da NSO esprimenti recettori diversi. Gli assoni dei neuroni sensoriali esprimenti il recettore P2 proiettano allo strato del nervo olfattivo al giorno embrionale 14.5 (E14.5) e a E15.5 questi assoni terminano nello strato glomerulare presuntivo (30). Nei 5 giorni successivi si organizzano in strutture discrete simili ai glomeruli olfattivi. In molti casi si osservano due glomeruli appaiati collegati inizialmente da fasci di assoni P2. Questa connessione viene persa entro il giorno postnatale (PD) 7.5. Durante il primo periodo postnatale si osservano assoni aberranti di NSO P2 entrare in glomeruli non appropriati o continuare la crescita oltre lo strato glomerulare. Questi neuroni non sono più visibili nell'animale adulto (30).

Gli assoni esprimenti M72 iniziano a formare proto glomeruli in una fase molto più tardiva, nei primi giorni di sviluppo postnatale, PD2-PD3. Fino a PD10 molteplici glomeruli sono presenti su ogni lato di ciascun bulbo. Tra PD10 e PD40 si assiste ad un processo di progressiva eliminazione dei glomeruli sopranumerari (30,31), cosicché nella maggior parte dei casi da PD40 in poi solo singoli glomeruli sono osservabili sul lato mediale e laterale di ciascun bulbo. E' importante osservare che i glomeruli M72 inizialmente possono essere innervati anche da fibre M71, ma con il corso dello sviluppo i glomeruli misti vengono eliminati.

Per valutare l'effetto dell'attività neuronale evocata sulla formazione dei glomeruli, lo sviluppo di glomeruli M71 e M72 è stato osservato in animali in cui è stata attuata occlusione nasale al momento della nascita. In questi animali, a differenza dei controlli, persiste la presenza di glomeruli multipli su ogni lato del bulbo olfattivo. Quindi ciascun bulbo presenta un numero maggiore di glomeruli rispetto ai controlli. Analizzando la struttura dei glomeruli sovranumerari si è visto che questi sono eterogenei. Sembra quindi che l'assenza di attività evocata impedisca il processo di rifinitura delle proiezioni assionali e in particolare l'eliminazione di glomeruli eterogenei. La convergenza assonale non sembra invece significativamente influenzata dall'assenza di attività evocata (31).

Formazione della mappa sensoriale nel sistema olfattivo

Come detto precedentemente, nell'epitelio olfattivo i neuroni sensoriali non sono disposti secondo un preciso ordine spaziale, ma sono distribuiti in modo pressoché casuale. I NSO che esprimono un dato recettore sono ristretti ad una delle quattro zone in cui viene suddiviso, in senso dorso-ventrale, l'epitelio olfattivo. Tuttavia, all'interno di ciascuna zona, neuroni esprimenti recettori diversi sono frammisti fra loro in modo casuale.

La situazione è completamente diversa nel bulbo olfattivo, dove è presente una mappa topografica ben precisa e altamente conservata (27,28). Come è possibile passare da una mancanza di organizzazione spaziale dei diversi neuroni olfattivi a livello dell'epitelio olfattivo ad una mappa topografica estremamente precisa nel bulbo? Non solo gli assoni dei neuroni sensoriali olfattivi che esprimono lo stesso recettore convergono a formare gli stessi glomeruli, ma la localizzazione stessa di questi glomeruli è conservata tra animali diversi appartenenti alla stessa specie (29,30,31).

Una caratteristica distintiva dell'organizzazione topografica del sistema olfattivo è il "doppio ruolo" del recettore olfattivo (32). Esso è infatti coinvolto non solo nella trasduzione del segnale odoroso, ma gioca anche un ruolo istruttivo nella convergenza assonale dei NSO. Questo dato è emerso da una serie di esperimenti genetici che hanno dimostrato come modificazioni della sequenza codificante per i recettori olfattivi portino ad alterazioni della mappa sensoriale.

L'eliminazione (knock down) del gene codificante il recettore olfattivo impedisce la convergenza degli assoni di tali neuroni in specifici glomeruli a livello del bulbo olfattivo. In questa circostanza gli assoni vagano in modo casuale nel bulbo (32). Studi successivi hanno messo in luce che l'eliminazione genetica di un dato recettore olfattivo porta all'espressione di un altro gene codificante per un altro recettore olfattivo (33). Gli assoni di tali neuroni perciò non convergono a formare un unico glomerulo, ma ciascuno di essi converge nel glomerulo target relativo al nuovo recettore espresso. Poiché la scelta del recettore è casuale per ciascun neurone, gli assoni convergono in differenti glomeruli (33).

Se invece il gene codificante per il recettore olfattivo normalmente espresso viene sostituito con la sequenza genica codificante per un diverso RO (swap genico), gli assoni di tali neuroni convergono a formare glomeruli in una posizione diversa

rispetto a quella occupata dai glomeruli target dei neuroni esprimenti il RO sostituito e di quelli esprimenti il RO sostitutivo. La posizione del nuovo glomerulo risulta diversa rispetto alla posizione del glomerulo del recettore sostituito anche nei casi in cui il RO sostitutivo e sostituito presentino un alto grado di omologia o siano espressi nello stesso cluster o nella stessa zona epiteliale, come il caso dello swap P3→P2 (32). In esperimenti di swap genetico tra questi due RO i nuovi glomeruli sono adiacenti ai glomeruli wild type P3 ed anteriori rispetto ai glomeruli wild type P2.

Questi dati dimostrano che il recettore olfattivo gioca un ruolo istruttivo nella convergenza assonale, ma non è l'unico determinante (32). Si è visto infatti che NSO che esprimono recettori diversi esprimono diversi tipi e/o livelli di molecole guida (axon guidance molecules) che partecipano insieme al recettore nella convergenza assonale (34).

Vi sono varie axon guidance molecole coinvolte nella formazione della mappa sensoriale nel bulbo olfattivo, tra cui efrine, semaforine e neuropiline (34,35,36). Queste molecole, come diremo più avanti, forniscono segnali guida agli assoni in corso di sviluppo o rigeneranti, contribuendo alla formazione delle corrette sinapsi. Cutforth e coll. (34) hanno dimostrato come neuroni esprimenti recettori olfattivi diversi esprimono diversi livelli di axon guidance molecole. Alterazioni dei livelli di espressione di queste molecole alterano la mappa glomerulare, in particolare modificano la posizione dei glomeruli in senso antero-posteriore nel bulbo olfattivo. I dati ottenuti sembrano indicare che i neuroni esprimenti recettori diversi coesprimono molecole segnale diverse che cooperano con il recettore nella formazione della mappa glomerulare. Ancora oggi tuttavia rimangono da chiarire i meccanismi molecolari che collegano l'identità di un dato RO con i diversi tipi e o livelli di espressione di molecole guida. A rinforzare il ruolo del RO nel processo di convergenza assonale esperimenti di immunoistochimica condotti da Barnea e coll.(37) e da Strotmann e coll.(38) hanno dimostrato la presenza del RO sulla porzione più distale dell'assone e sul cono di crescita. Il recettore olfattivo risulta quindi espresso sulle cilia e sull'assone terminale-cono di crescita. Tuttavia i meccanismi molecolari che sottendono il ruolo del recettore olfattivo sul cono di crescita rimangono ancora da chiarire.

1.1.6 Axon guidance

Durante lo sviluppo del sistema nervoso gli assoni percorrono distanze, in taluni casi anche considerevoli, per raggiungere il loro target finale. L'axon guidance è l'insieme dei processi tramite i quali l'assone raggiunge il suo preciso bersaglio. Gli assoni che stanno crescendo presentano alla loro estremità distale una struttura specializzata chiamata cono di crescita. Il cono di crescita, rappresentato da un allargamento dell'estremità assonale, è una struttura altamente sensibile e mobile. Esso è infatti capace di percepire molecole segnale presenti nell'ambiente e di rispondere molto rapidamente ai segnali mediati da queste molecole con cambiamenti morfologici e direzionare di conseguenza la crescita assonale (39). Il cono di crescita è composto da filopodi e lamellipodi. I filopodi sono estroflessioni citoplasmatiche contenenti uno scheletro di filamenti di actina, deputati a "saggiare" l'ambiente esterno. I lamellipodi sono porzioni del cono contenenti un denso reticolo di actina. Queste reti periferiche di actina nella porzione prossimale del cono sono associate ai microtubuli presenti nella parte distale dell'assone. Sul cono di crescita sono espressi recettori che riconoscono molecole guida. I segnali, riconosciuti da questi specifici recettori espressi sul cono, attivando una cascata di trasduzione intracellulare causano riarrangiamenti dei filamenti di actina del citoscheletro del cono di crescita, regolando così l'avanzamento o la retrazione dell'assone stesso (39).

I segnali molecolari che il cono di crescita rileva e a cui risponde si dividono in segnali attrattivi e segnali repulsivi. A loro volta questi segnali possono agire a lunga distanza, come nel caso di molecole secrete, o a breve distanza, come nel caso in cui le molecole segnale siano espresse sulla membrana di altre cellule e perciò la mediazione della risposta avviene in seguito al contatto cellula-cellula (39). Le varie molecole segnale coinvolte nell'axon guidance non hanno un ruolo univoco e determinato. Questo significa che molecole appartenenti alla stessa famiglia non hanno esclusivamente un effetto repulsivo o attrattivo, ma la loro azione può variare a seconda del diverso tipo di neuroni su cui vanno ad agire. Inoltre molecole della stessa famiglia possono essere sia secrete che esposte sulla superficie cellulare e perciò possono svolgere un'azione sia a lunga che a breve distanza (39).

Molte sono le famiglie di molecole coinvolte nell'axon guidance: ad esempio netrine, semaforine ed efrine. Le netrine sono molecole secrete e possono avere un'azione sia attrattiva che repulsiva. Sembra che questa differenza sia dovuta al diverso tipo di recettore espresso dai neuroni. Le semaforine sono una classe di molecole con effetto principalmente repulsivo che comprende sia molecole secrete che molecole di membrana. Esistono 8 classi di semaforine ed esse utilizzano diversi tipi di recettori. La maggior parte interagisce con proteine dette plexine; la classe 3 in particolare necessita, oltre alle plexine, di proteine co-recettrici chiamate neuropiline (39). Le efrine sono una grossa famiglia di molecole legate alla membrana e perciò l'interazione con i recettori richiede un contatto cellula-cellula.

Come fanno queste molecole guida a portare ad una modificazione del citoscheletro? I meccanismi non sono ancora completamente chiari, tuttavia ci sono ampie evidenze che le molecole segnale nell'axon guidance attivino vie di trasduzione in cui sono coinvolte proteine appartenenti alla famiglia delle Rho GTPasi. Questa famiglia di proteine controlla la polimerizzazione, la depolimerizzazione e la ramificazione dei filamenti di actina (39). Anche i nucleotidi ciclici cGMP, cAMP ed il calcio sono importanti nella regolazione della crescita assonale. I livelli intracellulari di cAMP e di cGMP, e quindi la relativa attività delle rispettive vie di segnalazione, regolano i livelli citosolici del Ca^{2+} . I segnali calcio a loro volta regolano l'attività di altre proteine, coinvolte nell'organizzazione del citoscheletro e nei movimenti dei filamenti di actina. Vedremo in seguito il ruolo di questi messaggeri nell'axon guidance.

1.2. Metabolismo ed effettori del secondo messaggero GMP ciclico

1.2.1 La sintesi del cGMP

La ricerca sui nucleotidi ciclici ebbe origine negli anni 60, quando l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) ed il guanosin monofosfato ciclico (cGMP) vennero per la prima volta identificati come prodotti biologici. La scoperta del cAMP portò alla formulazione del concetto di secondo messaggero nella segnalazione ormonale da parte di E.W. Sutherland, l'importanza della quale venne poi ampiamente riconosciuta con l'attribuzione del premio Nobel nel 1971. La ricerca riguardo ai meccanismi d'azione del cAMP si sviluppò subito, mentre quella riguardante il cGMP attrasse meno attenzione. Per tale motivo i meccanismi di produzione del cGMP ed il suo ruolo rimasero sconosciuti sino agli anni 80. La scoperta chiave che il cGMP e un'altra molecola, il monossido di azoto (NO), erano in grado di esercitare un'azione rilassante nella muscolatura liscia dei vasi sanguigni (40,41,42,43) riportò l'attenzione su questo secondo messaggero ancora poco studiato.

Il cGMP viene prodotto a partire da GTP attraverso l'attività degli enzimi guanilato ciclasi di cui esistono due sottofamiglie: le guanilato ciclasi solubili (GCs), che si trovano nel citoplasma delle cellule, e le guanilato ciclasi particolate (o di membrana) (44,45). **Le guanilato ciclasi solubili** dei mammiferi sono emoproteine eterodimeriche, consistono di due subunità (α e β), ciascuna delle quali può essere suddivisa in tre domini funzionali: il dominio regolatorio N-terminale, il dominio di dimerizzazione ed il dominio catalitico C-terminale (**Fig9**). Le guanilato ciclasi solubili esistono in due isoforme $\beta_1\alpha_1$ e $\beta_1\alpha_2$, che possiedono simili proprietà enzimatiche ma differiscono per la loro localizzazione tissutale: l'isoforma $\beta_1\alpha_1$ è predominante in molti tessuti, eccetto il cervello in cui è espressa ad alti livelli l'isoforma $\beta_1\alpha_2$ (44).

Il gruppo prostetico eme è legato alla subunità β attraverso l'istidina in posizione 105 che è coinvolta nell'attivazione indotta dal monossido di azoto (NO) di questo enzima. Le GCs infatti sono attivate da messaggeri gassosi quali il NO ed il monossido di carbonio (CO). Le GCs appartengono ad una famiglia di proteine

definita H-NOX (haem nitric oxide/oxygen-binding proteins). Diversamente da altre emoproteine che sono in grado di legare anche l'O₂ il dominio H-NOX delle GCs è selettivo per il legame ad NO e CO (44). Attraverso la produzione del secondo messaggero cGMP vengono regolati molti processi biologici, quali il tono e la motilità della muscolatura liscia e la fototrasduzione. Per ciò che concerne il sistema olfattivo non è ancora chiaro il ruolo di questo secondo messaggero.

Le guanilato ciclasi di membrana o particolate (GCp) costituiscono una famiglia di sette recettori associati alla membrana plasmatica (indicate con lettere dell'alfabeto: GC-A a GC-G). Sono caratterizzati da un dominio extracellulare di legame per i ligandi, una singola regione transmembrana, un dominio regolatorio ed un dominio intracellulare dotato di attività ciclasica (**Fig. 9**) (45). La presenza di un dominio extracellulare suggerisce che tutti questi enzimi fungano da recettori, tuttavia solo per tre famiglie di GCp sono stati identificati i ligandi specifici (45,46). La GC-A lega sia il peptide natriuretico atriale (ANP) che il peptide natriuretico cerebrale (BNP) e media le loro azioni di cardioprotezione e di riduzione della pressione. La GC-B è attivata dal peptide natriuretico di tipo C (CNP) e regola la rigenerazione dei vasi sanguigni e la crescita delle ossa. La GC-C media gli effetti degli ormoni proteici guanilina e uroguanilina nella regolazione del trasporto intestinale di acqua ed elettroliti e nella crescita e differenziazione delle cellule epiteliali (45,46). Le GC-E e la GC-F sono espresse nelle cellule della retina e svolgono un ruolo importante nel processo della fototrasduzione. La funzione della GC-G è ancora sconosciuta mentre la GC-D è espressa in un sottogruppo di neuroni sensoriali olfattivi a livello delle ciglia (46,47). Quest'ultima è in grado di legare i peptidi guanilina e uroguanilina, il che ha suggerito la possibilità che i neuroni che la esprimono intervengano nel controllo dell'omeostasi salina e acquosa e che siano coinvolti nella percezione della sensazione di fame, sazietà e sete (47,48). Altri ligandi non sono ancora noti, ma si esclude la possibilità che la GC-D leghi gli odori (47,48).

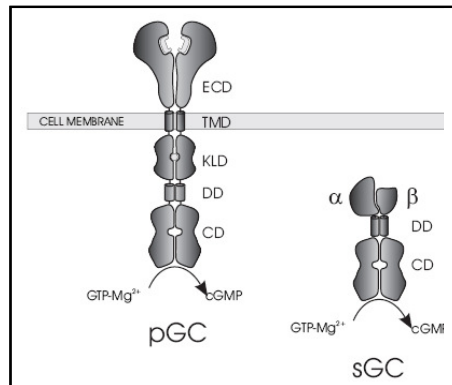


Fig. 9 Rappresentazione della struttura delle GC: le GCp sono costituite da una singola catena polipeptidica inserita nella membrana plasmatica; le GCs sono proteine citoplasmatiche eterodimeriche costituite dalle subunità α e β (46).

1.2.2 La degradazione del cGMP

Le fosfodiesterasi (PDEs, phosphodiesterases) sono gli enzimi deputati alla degradazione e all'inattivazione dei nucleotidi ciclici cAMP e cGMP. Costituiscono dei componenti chiave delle vie di signalling cAMP/protein chinasi A e cGMP/protein chinasi G, dal momento che regolano le concentrazioni intracellulari, la durata e l'entità delle risposte biologiche di questi secondi messaggeri (49,50). Sono state identificate 11 famiglie di PDE in base alla loro sequenza aminoacidica, specificità di substrato, regolatori endogeni ed esogeni e proprietà farmacologiche. Ciascuna famiglia comprende da uno a quattro geni distinti per un totale di 20-25 geni che codificano per più di cinquanta PDE, alcune generate tramite splicing alternativo, altre tramite l'uso di diversi promotori (49,50).

Le PDE sembrano esistere come dimeri di due subunità catalitiche, presentano una comune organizzazione strutturale il cui centro funzionale corrisponde al dominio catalitico posto vicino all'estremità carbossilica; la parte C-terminale a valle sembra deputata alla dimerizzazione e contiene siti di fosforilazione, mentre la porzione N-terminale è caratterizzata da sequenze conservate in ciascuna famiglia, coinvolte nel controllo dell'attività catalitica e nella localizzazione subcellulare.

Nei tessuti olfattivi sono espresse le PDE 1, 2, 4 (21). La PDE1 è una fosfodiesterasi dipendente da Ca²⁺/calmodulina ed è altamente espressa a livello

delle cilia dei NSO e presenta un'alta affinità di legame ($k_{1/2} = 1,4 \mu\text{M}$) per il cAMP (51). Questa PDE quindi è regolata dalle fluttuazioni intracellulari di Ca^{2+} che si innescano dopo stimolazione odorosa dei recettori olfattivi. Il meccanismo di attivazione consiste nel rimuovere il dominio inibitorio.

La PDE2 è espressa a livello delle cilia, del corpo cellulare e nell'assone degli OSN, essa inoltre colocalizza con la GC-D (48). La PDE2 contiene un dominio regolatorio definito GAF, che presenta un'elevata omologia di sequenza con altri motivi presenti in numerosi gruppi di proteine. Il cGMP è al momento l'unico ligando conosciuto in grado di legare questo dominio. Quando esso si associa alla PDE2 ne aumenta di sei volte l'attività idrolitica. PDE 1 e 2 sono in grado di degradare sia cAMP che cGMP (21).

Infine la PDE4 viene espressa nel knob del dendrita, nel corpo cellulare e nell'assone e la sua attivazione è dipendente dal cAMP. Essa è assente a livello delle cilia ed è in grado di degradare esclusivamente il cAMP (21), e questo la pone quindi come parte di un meccanismo a feed-back negativo in grado di attenuare l'intensità del segnale cAMP all'interno della cellula.

1.2.3 Gli effettori del cGMP

Il cGMP ha almeno tre bersagli proteici che andranno poi a modulare varie funzioni cellulari. Questi tre target sono le protein chinasi cGMP dipendenti, i canali CNG e le fosfodiesterasi (50).

Le protein chinasi cGMP-dipendenti

Le proteine chinasi cGMP dipendenti (PKG) sono specifiche serina/treonina protein chinasi che fosforilano le proteine bersaglio. Queste proteine sono degli omodimeri e condividono alcune caratteristiche strutturali quali:

- i) un dominio N-terminale contenente una sequenza di sette aminoacidi ripetuta otto volte, necessario per l'omodimerizzazione e per la localizzazione intracellulare;
- ii) un dominio di autoinibizione;
- iii) un dominio regolatorio che contiene due siti di legame allosterici per il cGMP;
- iv) un sito di legame per l'ATP;

v) un dominio catalitico.

I mammiferi possiedono tre protein chinasi cGMP-dipendenti: una di tipo II ancorata alla membrana e una di tipo I citosolica in due possibili isoforme che differiscono per i primi 100 aminoacidi del dominio N-terminale. Nei NSO è espressa la protein chinasi di tipo I (50).

CNG channels: canali ionici modulati da nucleotidi ciclici

Nel sistema olfattivo sono espressi dei canali ionici non selettivi la cui apertura viene modulata dalle concentrazioni intracellulari di cGMP e cAMP (52,53). Nei mammiferi una famiglia di sette geni codifica per quattro subunità A (CNGA1-A4) e tre subunità B (CNGB1-B3) che possono dare origine a canali omomerici o eterotetramerici. Nel sistema olfattivo i canali CNG sono costituiti da tre diverse subunità: 2 A2, 1 A4 e 1 B1b (54). Le ultime due subunità sono modulatorie: aumentano la sensibilità al cAMP e permettono la regolazione via Ca^{2+} -calmodulina (**fig.10**). Le proprietà principali di questi canali quali la probabilità di apertura, la sensibilità ai ligandi e la permeabilità al calcio, variano a seconda delle subunità espresse e della loro stechiometria. Nonostante queste differenze tutti i canali presentano delle caratteristiche comuni: sono canali cationici non selettivi che presentano una sostanziale permeabilità al calcio al sodio e sono soggetti ad una regolazione a feed-back mediata dal Ca^{2+} (52). Ad esempio nei NSO lo stimolo olfattivo causa l'apertura dei canali e l'influsso di Ca^{2+} dentro la cellula, il Ca^{2+} a sua volta si lega e attiva la calmodulina che, associandosi ai canali CNG, ne diminuisce la probabilità di apertura (52).

Nei NSO i canali CNG sono alla base del processo di trasduzione del segnale olfattivo. Sono in grado di legare entrambi i nucleotidi ciclici, ma presentano una più elevata affinità per il cGMP rispetto al cAMP (55). Nel sistema olfattivo quindi questi canali non sono selettivi per un nucleotide ciclico rispetto all'altro ma legano entrambi, tuttavia la $k_{1/2}$ ha un valore di 1,6 μM per il cGMP e di 3 μM per il cAMP (55).

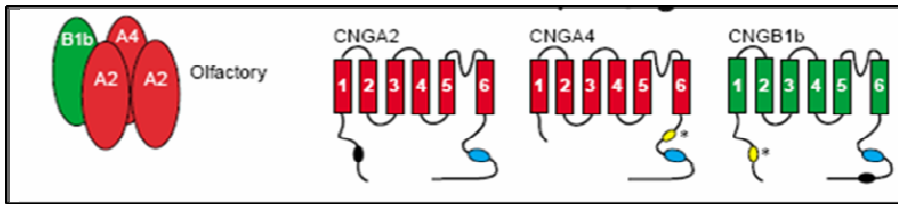


Fig 10: Rappresentazione dei canali CNG olfattivi e delle tre subunità che li formano. In blu sono indicati i siti di legame per il cAMP, mentre in giallo ed in nero i siti di legame per la calmodulina (52).

Le fosfodiesterasi

Come visto nei precedenti paragrafi, le fosfodiesterasi sono gli unici enzimi in grado di degradare i nucleotidi ciclici e quindi sono importanti modulatori delle dinamiche spazio-temporali di cAMP e cGMP (21, 50). Questi enzimi sono però anche effettori dell'azione di questi secondi messaggeri. In particolare la scoperta dei GAF domain ha conferito alle PDE un ruolo chiave come effettori del cGMP.

Nel sistema olfattivo la PDE2 viene allostericamente attivata dal cGMP (48): il suo legame al sito regolatorio dell' enzima ne aumenta di ben sei volte l'attività di idrolisi del cAMP.

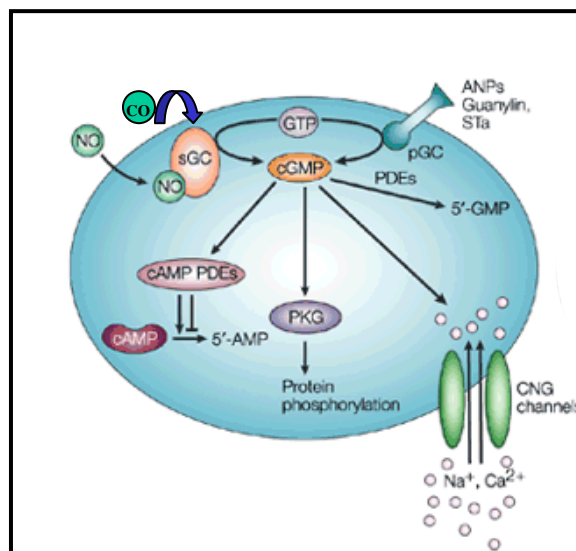


Fig 11 Sintesi ed effettori del cGMP. Sono rappresentate le GCs attivate dai messaggeri gassosi NO e CO, la GCp attivata da ligandi extracellulari; gli effettori PKG, PDE e canali CNG (50).

1.3 Il cGMP nel sistema olfattivo

1.3.1 Il cGMP nei neuroni sensoriali olfattivi

Come esposto in precedenza è noto che i livelli di cGMP nelle cellule sono in generale regolati da due classi distinte di guanilato ciclastasi: le solubili e le particolate. Le GCs sono attivate da messaggeri gassosi quali il NO e il CO, mentre le GCp sono attivate da ligandi extracellulari o, sul loro versante intracellulare, dal calcio o proteine leganti il calcio. Entrambe le classi di GC sono espresse nei NSO e questo implica una complessa regolazione dei livelli di questo secondo messaggero nei neuroni sensoriali olfattivi (19, 56).

NO e CO sono prodotti rispettivamente dall'enzima NO sintasi ed eme ossigenasi (HO). Nei NSO l'**NO sintasi** è espressa durante tutto lo sviluppo embrionale e nelle prime due settimane postnatali (nei roditori) per poi scomparire in animali adulti (20,57,58). Questo suggerisce che il NO potrebbe essere coinvolto nei processi di sviluppo e rigenerazione del neuroepitelio.

L'HO è invece espressa ad alti livelli dopo la nascita e quindi potrebbe essere implicata nella stimolazione delle GCs in NSO maturi (58,59)

Sono state identificate due isoforme di HO: HO-1 e HO-2. HO-1 è una heat-shock protein espressa nella milza e nel fegato (60,61) mentre HO-2 è espressa nel cervello, specialmente nei NSO e nello strato delle cellule dei granuli del bulbo olfattivo. Analisi di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che le GCs e HO-2 sono coespresse nei NSO (19,20).

Attraverso saggi biochimici si è visto che nei NSO l'inibizione dell'enzima eme ossigenasi abbassa i livelli basali di cGMP, mentre nessun effetto è dato dall'inibizione della NO sintasi (20,21). Questo ha portato ad ipotizzare che il messaggero gassoso CO sia un regolatore endogeno dell'attività costitutiva delle GCs. L'inibizione dell'enzima HO-2 nei NSO non blocca però totalmente la sintesi di cGMP (20), suggerendo che anche la guanilato ciclastasi particolata sia coinvolta nella produzione basale di questo secondo messaggero. Non si conoscono però i meccanismi che regolerebbero la produzione basale di cGMP da parte delle GCp. Come esposto in precedenza un piccolo gruppo di NSO esprime sulla membrana delle ciglia la GC-D in grado di legare gli ormoni proteici guanilina e uroguanilina (47,), ma

altri ligandi di questa classe di enzimi di membrana non sono noti e tantomeno il suo contributo alla generazione dei livelli intracellulari di cGMP. Questa piccola popolazione di NSO esprime l'enzima GC-D a livello delle ciglia è unica in quanto non presenta alcuni dei componenti chiave della cascata di trasduzione del segnale olfattivo che è stata descritta nel precedente capitolo. Mancano infatti della proteina Golf e dell'adenilato ciclasi di tipo III. Esprimono inoltre una fosfodiesterasi (enzima preposto alla degradazione dei nucleotidi ciclici) e canali CNG selettivamente attivati dal cGMP (47,48). Infine, tra le caratteristiche che distinguono questi NSO da tutti gli altri c'è da aggiungere il dato che essi proiettano i loro assoni ad un gruppo distinto di glomeruli denominati "necklace glomeruli". Sembra quindi ipotizzabile, sulla base di queste osservazioni sperimentali, che tali neuroni utilizzino una via di segnalazione distinta da quella "canonica" Golf → adenilato ciclasi → cAMP, e che siano coinvolti nella trasduzione di segnali ambientali diversi rispetto a quelli che vanno ad attivare la maggior parte degli altri NSO (47,48).

Un'altra GCp è stata identificata, ma essa è responsiva agli odori e non se ne conosce il ruolo nella produzione basale del secondo messaggero (56).

Un incremento di cGMP nei NSO si rileva anche a seguito di stimolazione odorosa (19, 20, 21,56,62).

1.3.2 I segnali cGMP innescati dallo stimolo olfattivo

Breer e coll. nel 1992 (62) dimostrarono, tramite saggi biochimici, che il cAMP non è il solo secondo messaggero prodotto nelle ciglia di ratto dopo stimolazione con gli odori ma che anche il cGMP aumenta la sua concentrazione. Le proprietà del segnale cGMP differiscono per vari aspetti dal segnale cAMP:

- 1) esso dipende dall'intensità dello stimolo e si innesca soltanto con stimoli forti, come se vi fosse una soglia da superare prima di innescare la sua formazione;
- 2) l'aumento nella sua concentrazione è lento e sostenuto (62).

A causa del ritardo con cui si innesca la risposta cGMP evocata dagli odori, è stato suggerito che questo secondo messaggero non sia coinvolto negli eventi iniziali di trasduzione dello stimolo quanto piuttosto in fenomeni di adattamento, che si osservano generalmente dopo intense e ripetute stimolazioni (62,63), o nell'attivazione attività-dipendente della trascrizione (25).

I meccanismi che regolano la sintesi e la degradazione di cGMP in seguito alla stimolazione olfattiva sono ancora oggi in gran parte poco conosciuti. Ancora non è chiaro neppure quale GC, solubile o di membrana, sia responsabile della sua sintesi.

Le guanilato ciclasi solubili e i segnali cGMP

Studi effettuati con saggi biochimici sembrano indicare che l'inibizione delle GCs porti ad una mancata risposta di cGMP dopo stimolazione con odori in neuroni sensoriali olfattivi in coltura (21). Questa classe di enzimi potrebbe quindi avere un ruolo importante nella trasduzione del segnale olfattivo. Quale meccanismo porta all'attivazione delle GCs in seguito alla stimolazione olfattiva?

La risposta del cGMP agli odori è abolita in presenza di un selettivo inibitore dell'enzima NOS (63). Il meccanismo proposto prevede che in seguito allo stimolo odoroso si abbia un'attivazione dell'enzima NOS mediata dal calcio e che la conseguente sintesi di NO porti all'attivazione delle GCs. L'obiezione che si è fatta a questo meccanismo di produzione del segnale cGMP è che l'enzima NOS è espresso in neuroni in corso di sviluppo o rigeneranti e non in quelli maturi. Appare chiaro quindi che l'NO non può avere un ruolo nella trasduzione del segnale olfattivo.

Altri ricercatori hanno postulato che l'altro gas diffusibile, il CO, possa mediare la sintesi odore-evocata di cGMP (21,64). Esistono dati sul ruolo di CO come modulatore dell'attività costitutiva delle GCs ma mancano studi che chiariscano come la stimolazione fisiologica con gli odori si correli con un'attivazione della sintesi endogena di CO da parte dell'eme ossigenasi.

Le guanilato ciclasi particolate e i segnali cGMP

Cilia isolate di NSO di ratto sono responsive agli odori ed esprimono alti livelli di GCp (56). Questa GCp responsiva agli odori, di cui sono presenti due isoforme cineticamente distinte, viene regolata sul versante citoplasmatico dal calcio o da proteine leganti il calcio. E' noto che lo stimolo olfattivo porta all'apertura dei canali CNG e all'influsso di calcio. Il calcio a sua volta potrebbe, direttamente o attraverso proteine che lo legano, attivare la guanilato ciclasi di membrana e la sintesi di cGMP. Quali siano i ligandi extracellulari, se ve ne sono, non è noto.

I dati finora disponibili non sono in grado di chiarire il meccanismo con il quale viene prodotto il cGMP.

La cinetica che caratterizza la risposta cGMP innescata dagli odori ha subito fatto pensare ad un suo coinvolgimento nei processi di adattamento (20,21). L'adattamento agli odori si riferisce all'abilità del sistema olfattivo di regolare la sua sensibilità a seconda delle intensità dello stimolo, un'operazione che è fondamentale per prevenire la saturazione dei componenti della via di trasduzione del segnale e per permettere il mantenimento di un'elevata sensibilità, anche durante continue e ripetute stimolazioni. Nei NSO l'adattamento dipende da segnali a feed-back che vanno a modulare i vari componenti molecolari del sistema di trasduzione del segnale (64,65). Si è osservato che l'incremento di Ca^{2+} nei NSO media sia la trasmissione del segnale che l'adattamento. Infatti il principale meccanismo di adattamento è la desensitizzazione Ca^{2+} -dipendente dei canali CNG (65): il legame della Ca^{2+} /calmodulina ai canali CNG ne riduce la sensibilità per il cAMP di circa venti volte (66). Questa forma di adattamento è quella definita a breve termine. Anche il cGMP è in grado di modulare l'attivazione dei canali CNG legandosi ad essi. Questo è stato dimostrato tramite l'applicazione di un analogo del cGMP (8-Bromo-cGMP), permeabile alla membrana e non idrolizzabile dai NSO. Questo composto causa un sostenuto aumento dei livelli di calcio citosolico in seguito all'apertura dei canali CNG (24). Il meccanismo proposto per l'adattamento definito tardivo prevede che il cGMP, derivante dall'attivazione delle GCs da parte di CO endogeno, porti ad una tonica attivazione dei canali CNG e quindi ad una perdurante corrente di Ca^{2+} in entrata nelle cilia (64). Il calcio a sua volta va a modulare la cascata di segnalazione dipendente da cAMP, causando l'effetto netto di diminuire la responsività agli odori (23,24). Inibendo l'enzima che sintetizza il CO si ha l'abolizione del fenomeno dell'adattamento (64). Ancora una volta però non è noto il meccanismo che legherebbe la stimolazione fisiologica con odori ad un'attivazione della sintesi endogena di CO e come un messaggero gassoso riesca a modulare l'adattamento nella stessa cellula in cui è prodotto.

1.3.3 Interazione cGMP-cAMP

Trattando i NSO con sostanze che variano i livelli di cGMP si è notata una corrispondente variazione nella concentrazione di cAMP: ad esempio se si bloccano le GC solubili diminuisce il cAMP, viceversa se si stimola la sua sintesi aumenta anche la concentrazione di cAMP (21). Si è notato anche l'opposto, ossia che la stimolazione con un attivatore dell'attività dell'adenilato ciclasi (forskolina) o con un analogo del cAMP producono un incremento, via PKA, della concentrazione di cGMP.(21). Vi sono quindi molteplici meccanismi che regolano i livelli di cGMP e cAMP nei neuroni sensoriali olfattivi ed esiste un' interazione tra le cascate di segnalazione intracellulari associate ai due nucleotidi ciclici. La fine regolazione dei livelli di cGMP e cAMP è alla base, come vedremo di seguito, delle risposte cellulari a lungo termine dei NSO ,che comprendono tra le altre il controllo della trascrizione genica e dei meccanismi di sviluppo neuronale.

1.3.4 cGMP: un regolatore della trascrizione genica

Il cGMP, prodotto in seguito alla stimolazione olfattiva attraverso il suo effettore protein chinasi G, va ad amplificare spazialmente e temporalmente il segnale cAMP inizialmente innescato (56). Questa risposta ritardata di cAMP è mediata da cGMP via PKG rientra in un meccanismo di regolazione delle risposte cellulari a lungo termine. Tra queste risposte vi è anche la regolazione della trascrizione genica. La stimolazione olfattiva infatti tra i suoi effetti ha anche quello di promuovere cambiamenti nell'espressione genica, andando ad attivare il fattore di trascrizione CREB (cAMP responsive binding protein) (25,56).

1.3.5 cGMP : il suo ruolo nello sviluppo dei neuroni sensoriali olfattivi

Abbiamo detto in precedenza che durante lo sviluppo del sistema nervoso gli assoni percorrono distanze, in taluni casi anche considerevoli, per raggiungere il loro target finale. L'axon guidance è l'insieme dei processi tramite i quali l'assone raggiunge il suo preciso bersaglio. Abbiamo visto che vi sono diverse classi di molecole guida tra cui efrine, semaforine e netrine.

L'NO, che rappresenta il più potente attivatore delle GCs, è coinvolto in vari processi durante lo sviluppo neuronale sia nei vertebrati che negli invertebrati (67,68). Data la sua natura gassosa può essere considerato un fattore autocrino o paracrino, come alcuni dei segnali guida. L'enzima che lo produce è espresso nei NSO durante l'embriogenesi mentre la sua espressione va progressivamente riducendosi nelle prime settimane postnatali.(57,58). Si è quindi da subito ipotizzato che l'NO avesse un ruolo nel corso dello sviluppo del sistema olfattivo. Vi sono evidenze sperimentali che l'NO, oltre a promuoverne la proliferazione, sia coinvolto nella formazione delle connessioni sinaptiche dei neuroni sensoriali olfattivi di ratto sia durante lo sviluppo embrionale che durante la continua neurogenesi che caratterizza questo tipo di neuroni (57,58). In topi knock out per l'espressione dell'enzima NOS si osserva infatti un'alterazione nel tasso di proliferazione dei precursori dei NSO ed anche una compromissione dello sviluppo dei glomeruli (67).

Si sono quindi valutati gli effetti di NO a livello di axon guidance, vale a dire sull'insieme dei processi tramite i quali gli assoni raggiungono i loro precisi bersagli con cui contrarre sinapsi. Su neuroni di *Helisoma Trivolvis* sostanze donatrici di NO causano un rapido e transiente allungamento dei filopodi, così come la riduzione del numero degli stessi (68). Per dissezionare la via di signalling tramite la quale l'NO produce questi effetti sul cono di crescita, si sono inibite le guanilato ciclasti solubili, trovando che in questo modo gli effetti di NO sono aboliti. Inoltre l'iniezione di cGMP direttamente nei neuroni mima gli effetti dei donatori di NO sui filopodi dei coni di crescita. Tali iniezioni di secondo messaggero hanno l'effetto di promuovere un rapido e transiente aumento di Ca^{2+} nei coni di crescita, indicando che l'azione del messaggero gassoso NO è mediata dal cGMP e che quest'ultimo, modulando i canali CNG, regola i livelli di calcio intracellulare (68). Questo meccanismo è stato ulteriormente validato da studi in cui l'applicazione di un analogo di cGMP causa un incremento dei livelli di calcio nel terminale assonico di NSO, fornendo la prova che il cGMP è in grado di aprire i canali CNG (69,70).

Si è inoltre osservato che i livelli di cGMP nel cono di crescita influenzano la risposta del cono ad alcune molecole segnale. E' stato dimostrato che nei neuroni spinali di *Xenopus* un gradiente di semaforina III normalmente esplica un effetto

repulsivo su tali assoni. Tuttavia lo stesso gradiente di semaforina III applicato sugli stessi assoni, ma in presenza di un agonista di cGMP (8-Bromo- cGMP), o di attivatori delle guanilato ciclastasi, produce un effetto attrattivo (71). Questo dato sperimentale suggerisce che cGMP svolga un ruolo nel controllo della direzionalità della crescita del cono.

Le netrine sono molecole secrete e possono avere un'azione sia attrattiva che repulsiva. Sembra che questa differenza sia dovuta al diverso tipo di recettore espresso dai neuroni con cui interagiscono. L'attrazione è mediata dal recettore DCC, nei nematodi l'omologo è UNC40, mentre la repulsione è mediata nei nematodi da UNC5. Queste due vie di segnalazione sembrano però essere collegate in quanto, sempre nei nematodi, l'effetto repulsivo mediato da UNC5 dipende dalla funzionalità di UNC40 (39). Un lavoro recente (72) ha analizzato la risposta di neuroni spinali di *Xenopus* in coltura alla molecola guida netrin1. Da questo lavoro emerge che il rapporto tra la concentrazione di cAMP e di cGMP determina il tipo di risposta a netrin1 in questi neuroni (72). La risposta è di tipo attrattivo quando il rapporto è alto e quindi c'è più cAMP che non cGMP all'interno della cellula. Quando però il rapporto si abbassa, ad esempio favorendo l'aumento dei livelli di cGMP, attivandone la sintesi o fornendo un antagonista di cAMP, la risposta diventa repulsiva. I livelli intracellulari di cAMP e di cGMP, e quindi la relativa attività delle rispettive vie di segnalazione, regolano i livelli citosolici del Ca^{2+} (72). Anche il calcio è una molecola importante nell'axon guidance (73). L'allungamento del neurite è infatti associato ad un incremento del calcio diffuso nel cono di crescita, mentre incrementi focali di Ca^{2+} modulano i cambiamenti di direzione del cono. Inoltre i livelli di Ca^{2+} influenzano le risposte del cono di crescita a molecole segnale esterne. Per esempio in *Xenopus leavis* bassi livelli di calcio aboliscono la risposta a netrin1 (74). Si ritiene che il Ca^{2+} possa esplicare la sua azione sia attraverso meccanismi locali a livello del cono, sia a livello nucleare regolando l'espressione genica.

I livelli di questi messaggeri possono essere modulati da neuromodulatori, neurotrasmettitori, nonché dall'attività neuronale spontanea e/o evocata. Esiste quindi una rete complessa di modulazioni su questi secondi messaggeri, che a loro volta esplicano la loro azione su molteplici target.

Il GMP ciclico è quindi una molecola importante nello sviluppo dei circuiti neuronali nel sistema olfattivo. I dati presenti in letteratura lasciano aperte molte domande sulla regolazione di cGMP nei NSO. Inoltre è da rilevare che tutti i dati disponibili finora su cGMP sono stati ottenuti attraverso crudi saggi biochimici, che impediscono di studiare le dinamiche spazio-temporali delle variazioni di cGMP in una data cellula. E' nozione ben consolidata nel campo del signalling intracellulare che la chiave della specificità delle risposte cellulari è dovuta alle specifiche cinetiche spaziali e temporali dei secondi messaggeri..

1.4. Metodi per misurare il cGMP

1.4.1 Saggi radioimmunologici

Fino ad oggi le variazioni di cGMP rilevate in cilia isolate o in NSO posti in coltura sono state misurate con saggi radioimmunologici. Il saggio radioimmunologico è stato introdotto nei primi anni '70 (75) e si basa sul principio che cambiamenti del livello intracellulare di secondo messaggero sono rilevati dalla competizione che avviene tra il cGMP del campione e una quantità nota della stessa molecola per il legame con un anticorpo anti-cGMP. Anche se ha permesso di definire importanti aspetti della regolazione del segnale del cGMP, tale tecnica ha degli evidenti limiti: la misurazione di variazioni di concentrazione di cGMP può essere eseguita solo su estratti di cGMP da colture cellulari fissate e lisate, con conseguente perdita di qualsiasi informazione sul tipo cellulare in cui queste variazioni si verificano ed in particolare sulle dinamiche spazio-temporali delle variazioni di concentrazione dei secondi messaggeri all'interno di ciascuna cellula.

1.4.2. Sonde geneticamente codificate per il cGMP

FRET

La misurazione dei nucleotidi ciclici in cellule vive con alta risoluzione temporale e spaziale è stata resa possibile grazie alla creazione di sonde geneticamente codificate basate su FRET. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) è un evento quantico-meccanico che si manifesta quando due fluorofori sono posti

in stretta prossimità (<100Å) e quando lo spettro di emissione del fluoroforo che agisce come “donatore” si sovrappone allo spettro di eccitazione del fluoroforo “accettore”. In queste condizioni il trasferimento di energia avviene per risonanza, senza emissione di fotoni e senza che accettore e donatore entrino in collisione cinetica. L'efficienza di questo processo (E) dipende dall'inverso della sesta potenza della distanza tra i due fluorofori, come descritto dall'equazione di Förster :

$$E = 1/[1 + (R/R_0)^6]$$

dove R_0 è la distanza a cui metà dell'energia è trasferita. In base all'equazione di Förster, una distanza doppia tra accettore e donatore, per esempio da R_0 a $2R_0$, comporta una diminuzione dell'efficienza del trasferimento di energia da $E = 50\%$ a $E = 1,5\%$. Un particolare impulso a questa tecnica è stata data dal clonaggio della green fluorescent protein (GFP) della medusa fluorescente *Aequorea victoria* e dalle sue successive modifiche, che hanno permesso di ottenere fluorofori con vari spettri di assorbimento ed emissione (76). L'uso di queste varianti di GFP e la possibilità di generare chimere che vengono espresse nelle cellule hanno aperto nuovi campi di studio: dallo studio di interazioni proteiche **al monitoraggio delle variazioni delle concentrazioni intracellulari dei secondi messaggeri** (77).

Sonde per lo studio del cGMP

Per lo studio delle dinamiche spazio-temporali del secondo messaggero cGMP sono state generate sonde geneticamente codificate in grado di monitorare le variazioni di cGMP in tempo reale. Oggi esistono molteplici sonde per cGMP. Le prime sonde generate si basano sul sito di legame per il cGMP della protein chinasi G: CGY, Cygnet-1, Cygnet-2 e varianti (78,79). Più tardi sono stati sviluppati dei sensori che si basano sul dominio regolatorio GAF di alcune fosfodiesterasi (cGES-DE2 e cGES-DE5: cGMP energy transfer sensor derived from PDE2A and PDE5A) (78).

Cygnet 2.1 e cGES-DE5 possiedono una selettività molto elevata per cGMP. Tra le due sonde Cygnet 2.1 e cGES-DE5, quest'ultima risponde più rapidamente, ossia

è in grado di rilevare gli incrementi di cGMP più velocemente di Cygnet 2.1. (78). Tuttavia Cygnet 2.1 risulta essere molto selettiva per il cGMP.

La sonda Cygnet 2.1 è costituita da PKG deleva dei residui 1-77 e fusa tra i fluorofori CFP e YFP. Questo sensore presenta una localizzazione citosolica ed è cataliticamente inattivo grazie ad una mutazione Thr⁵¹⁶-Ala nel sito catalitico. Il sensore, unimolecolare, è tra i più sensibili nel rilevare gli aumenti dei livelli di cGMP ($k_{1/2}$ 1,7 μ M) ed altamente selettivo (selettività cGMP/cAMP >600) (78).

In condizioni di bassa concentrazione di cGMP la sonda è in una conformazione che porta i due fluorofori CFP e YFP a trovarsi molto ravvicinati tra loro. Infatti eccitando il fluoroforo donatore CFP alla corretta lunghezza d'onda (430 nm) parte dell'energia del suo stato eccitato è trasferita al fluoroforo accettore YFP, che poi emette alla sua lunghezza d'onda (545 nm). In questa condizione FRET è massimale. Quando la concentrazione intracellulare di cGMP aumenta esso si lega al sito regolatorio del sensore, inducendone un cambiamento conformazionale: CFP e YFP si allontanano e la FRET è abolita. FRET viene convenzionalmente misurata come il rapporto dell'intensità di emissione del donatore (480 nm) sull'accettore (545 nm) quando le cellule vengono eccitate alla lunghezza d'onda del donatore (430 nm). Cambiamenti del rapporto di fluorescenza (480nm/545nm) sono quindi correlati ai livelli di cGMP intracellulari.

La sonda cGES-DE5 è stata costruita fondendo il dominio regolatorio GAF della fosfodiesterasi PDE5 a CFP e a YFP. Presenta una localizzazione citosolica ed è cataliticamente inattiva. Questa sonda risulta essere più sensibile di Cygnet 2.1 nel rilevare gli aumenti di cGMP ($k_{1/2}$ 1,5 μ M) ma meno selettiva nel discriminare fra cGMP e cAMP (selettività cGMP/cAMP =420) (78,79). Il suo funzionamento è l'inverso di quello di Cygnet 2.1. In condizioni basali, a basso cGMP, cGES-DE5 è in una conformazione tale per cui i fluorofori sono lontani e non c'è FRET. Quando la concentrazione di cGMP aumenta il legame del nucleotide ciclico al dominio GAF induce una variazione conformazionale della sonda che avvicina i due fluorofori, provocando un aumento di FRET. La sonda è unimolecolare.

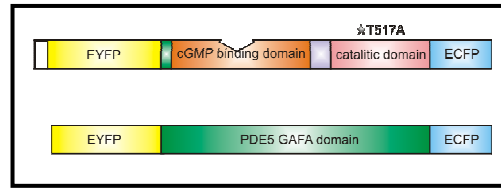


Fig.12 Schema della struttura delle due sonde utilizzate: in alto Cygnet 2.1; in basso cGES-DE5. Le due sonde legano entrambe cGMP .

Scopo della tesi

Il cAMP gioca un ruolo fondamentale e duplice nei NSO: esso infatti è coinvolto nel processo di trasduzione del segnale odoroso, ma è anche coinvolto nel processo di convergenza assonale nei NSO.

Il cGMP rappresenta l'altro nucleotide ciclico prodotto a seguito di stimolazione odorosa. Nei NSO esso risulta essere coinvolto in molteplici funzioni, quali l'adattamento alle risposte odorose, lo sviluppo e allungamento assonale, la modulazione della trascrizione genica. Il complesso metabolismo di cGMP, prodotto da due classi di guanilato ciclasti, solubili e di membrana, diversamente regolate, e degradato da varie fosfodiesterasi, hanno ostacolato la comprensione della regolazione di questo nucleotide, che infatti a tutt'oggi rimane in gran parte sconosciuta.

Inoltre i dati sinora disponibili sui meccanismi di sintesi e degradazione di questo secondo messaggero sono stati ottenuti solo attraverso crude misurazioni biochimiche, che impediscono di stabilire in quali compartimenti cellulari e con quali dinamiche temporali si instauri il segnale cGMP.

Rispondere a queste domande risulta essere fondamentale per la comprensione del ruolo di cGMP in NSO. A tale proposito abbiamo studiato le dinamiche spazio temporali di cGMP in neuroni sensoriali olfattivi trasfettati con sonde geneticamente codificate per cGMP. Questa metodica consente di dissezionare con alta risoluzione spaziale e temporale la regolazione di cGMP nei NSO e conseguentemente capire i meccanismi molecolari sottesi ai molteplici ruoli svolti da questo secondo messaggero nei NSO.

2. Materiali e metodi

2.1 Colture primarie di neuroni sensoriali olfattivi

Colture primarie di neuroni sono state ottenute da turbinati di feti di ratti Sprague Dawley di 18-20 giorni, come descritto da Ronnett et al. (80) La ratta viene uccisa con eccesso di CO₂ e successiva dislocazione cervicale: vengono prelevati i feti ed in seguito decapitati. Il cranio è inciso sagittalmente dalla regione occipitale verso quella frontale, ottenendo due emistese. Da queste si isolano i turbinati, utilizzando uno stereomicroscopio (Leica MZ 16 F).

Tutte queste fasi di dissezione sono eseguite in HBSS (Invitrogen) freddo. I turbinati vengono digeriti con tripsina 2,5% a 37°C per 15 minuti. La reazione è successivamente bloccata per aggiunta di FBS. Di seguito, si eseguono tre lavaggi con HBSS, per rimuovere l'enzima. I turbinati sono centrifugati due volte a 4000 rpm per 5 min. Infine i tessuti sono dissociati meccanicamente con una pipetta pasteur con diametro ridotto. Le cellule sono poi piastrate a densità variabile tra 300.000 e 600.000 cellule/vetrino su vetrini copri-oggetto da 24 mm (VWR) trattati precedentemente con Poli-L-lisina (10µg/ml) (Sigma). I neuroni vengono mantenuti in terreno di coltura come descritto in Ronnett et al. (80).

Tutte le cellule utilizzate in questo studio sono chiaramente identificabili come neuroni sensoriali olfattivi in base alla loro caratteristica morfologia bipolare, dal momento che presentano un singolo dendrite più spesso, terminante con un'espansione (knob), da cui protrudono le cilia, ed un assone molto lungo e sottile. I NSO in coltura esprimono il marker specifico Olfactory Marker Protein (OMP).

2.2 Trasfezione di neuroni sensoriali olfattivi

Il sensore per il cGMP è codificato geneticamente, perciò la sua espressione nel modello da studiare si ottiene tramite trasfezione del DNA codificante la chimera. Dopo 24h nel terreno di coltura le cellule possono essere trasfettate. Viene utilizzato il reagente lipidico Trasfettina (BioRad) seguendo il protocollo della ditta stessa. Per ciascun vetrino vengono utilizzati 7 µg di DNA e 6 µl di trasfettina: l'incubazione dura un'ora a 37°C e a 5% di CO₂. In seguito i vetrini

vengono lavati con DMEM privo di rosso fenolo (Invitrogen), riscaldato a 37°C, e posti nuovamente nel terreno di coltura fresco. Le sonde per cGMP trasfettate sono Cygnet 2.1 e cGES-DE5 (vedi capitolo 1) Il giorno successivo alla trasfezione le cellule vengono utilizzate per gli esperimenti di real time imaging.

2.3 Sistema di imaging e analisi dei dati di FRET

Microscopio: Olympus axiovert IX series.

Monocromatore: Polychrome IV (Till Photonics GmbH, Germany)

Obiettivo: Olympus 60x PlanApo, 1,4 Apertura Numerica, obiettivo ad immersione ad olio

Specchio diecrico: 445DCLP

Filtro di emissione per CFP: 480/30

Filtro di emissione per YFP: 535/30

Dispositivo di beam splitter: Microimager, Optical Insight, USA.

Telecamera digitale: Till Imago (Till Photonics, GmbH)

Computer: processore PC Pentium 4, 800MHz. 512 Mb SDRAM, 40 Gb Hard disk.

Software per l'acquisizione delle immagini: Till VisiON (Till Photonics GmbH, Germany).

Software per l'analisi delle immagini : programma sviluppato in Matlab 7.3

Prima di iniziare un esperimento di imaging FRET il vetrino viene montato in una cameretta apposita ed ermeticamente chiusa. La cameretta è poi riempita con soluzione Ringer. La soluzione salina contiene HEPES, per mantenere costante il pH ed è usata a temperatura ambiente (20-25°C). Gli stimoli sono stati aggiunti direttamente nella soluzione salina.

Gli esperimenti sono condotti su un microscopio invertito, che è generalmente più flessibile, in quanto sia l'aggiunta di componenti che l'accesso al campione sono più semplici. È stato utilizzato un obiettivo di alta qualità e con un'alta apertura numerica, per acquisire efficientemente la luce di emissione con un'alta risoluzione. Per l'acquisizione di immagini è stata usata una telecamera CCD (cooled charge-coupled device) ad alta sensibilità.

Tutti i dispositivi del sistema di imaging, cioè lo shutter sul raggio di eccitazione e la telecamera digitale, sono controllati attraverso un software (Till VisiON, Till Photonics GmbH, Germany).

Elaborazione ed analisi delle immagini

L'analisi è realizzata con un programma sviluppato sulla base di MATLAB 7.3 , che permette di dividere le immagini raccolte in due serie separate (fig.13A), ciascuna corrispondente ad uno solo dei fluorofori, sovrapporle ed allinearle pixel per pixel, per evitare artefatti nelle successive operazioni di calcolo. Per ogni immagine delle due serie viene determinato il background (fig.13B), ossia il valore medio di fluorescenza misurabile in un'area all'esterno delle cellule e dovuto alle caratteristiche intrinseche della fotocamera e all'autofluorescenza delle cellule non trasfettate e del mezzo in cui sono immerse. Tale valore viene sottratto al valore di ogni pixel dell'immagine per ridurre ancora gli artefatti ad amplificare il segnale (fig.13C). Dopo la sottrazione del valore di background, viene calcolata una terza serie di immagini in cui, pixel per pixel, viene calcolato il valore del rapporto tra l'intensità di emissione di CFP e l'intensità di emissione di YFP. Nelle immagini ottenute da questo calcolo il valore di ciascun pixel corrisponde al rapporto tra l'intensità di emissione di CFP e l'intensità di emissione di YFP, ottenute eccitando a 430nm, e correla con la distanza tra i due fluorofori e quindi con la quantità di cGMP presente nell'area cellulare corrispondente a quel pixel (fig.13D). Il programma permette di tracciare delle regioni di interesse in corrispondenza di aree specifiche, e quindi possono essere stimate e risolte nello spazio le cinetiche dei cambiamenti di cGMP nei diversi compartimenti cellulari. Nel nostro caso possono essere stimate le cinetiche delle variazioni di cGMP nei diversi compartimenti subcellulari: cilia-dendrite, soma, assone terminale-cono di crescita. Viene costruito un grafico in cui si visualizza il valore medio di intensità dei pixel compresi nella regione di interesse in funzione del tempo: in questo modo è possibile visualizzare sia le variazioni del rapporto di intensità di emissione CFP/YFP (fig.13E), sia quelle delle due singole emissioni (fig.13F). Il controllo di queste ultime è un aspetto fondamentale dell'analisi in quanto solo variazioni simmetriche nell'intensità di emissione dei due fluorofori corrispondono ad una reale variazione dei livelli di cGMP.

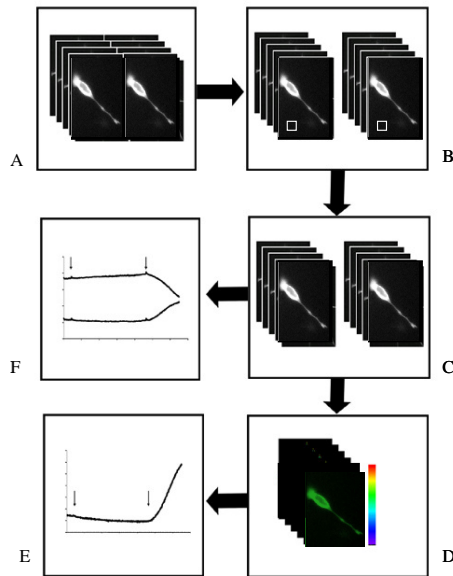


Figura 13 Analisi delle immagini

In A sono riportate le immagini non analizzate (raw data) di una cellula trasfettata. Le immagini di emissione di CFP e YFP sono registrate sulle due metà di ciascun fotogramma. In B, le immagini di CFP e di YFP sono separate in due differenti serie. Il rumore di fondo è valutato dall'intensità media dentro un'area disegnata fuori dalla cellula (rettangolo bianco) e poi sottratta ad ogni fotogramma, formando delle nuove immagini (C). Viene formata un'immagine del rapporto tra CFP e YFP (D) In E è riportato il grafico corrispondente alle variazioni, nel tempo e nell'area selezionata, dei cambiamenti del rapporto tra le intensità di emissione di CFP e YFP nella stessa area di interesse, in F le variazioni delle due singole emissioni di fluorescenza.

Le variazioni dei livelli di cGMP sono espresse come $\Delta R/R_0\%$, dove $\Delta R = R - R_0$, con R che rappresenta il rapporto tra le emissioni di CFP/YFP al tempo t e R_0 rappresenta il rapporto delle emissioni CFP/YFP al tempo $t_0=0$. Queste misure, essendo i risultati del rapporto di due intensità, sono numeri puri. Tali valori verranno presentati con l'errore standard calcolato in base alla formula σ^2/\sqrt{n} , dove σ^2 corrisponde alla deviazione standard ($\sqrt{[\sum(x-x_m)^2/(n-1)]}$), in cui x_m è il valore della media campione e n è la dimensione del campione.

Il tempo per il raggiungimento di metà della risposta massimale ($t_{1/2}$) è valutato come il tempo, dopo l'applicazione dello stimolo, necessario perché si raggiunga metà della risposta massimale, considerando metà della risposta massimale $=(R/R_0)/2 + R_0$, e $t=t-t_0$, dove t_0 è il tempo in cui viene applicato lo stimolo.

Per calcolare la significatività statistica dei dati si è effettuato un test di Student (t-test) di tipo accoppiato a due code. I valori di significatività sono denotati come segue: * $0.01 < p \leq 0.05$; ** $0.001 < p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. Il numero di cellule è indicato con “n”.

2.4 Immunocitochimica

OMP: dopo 48 ore in coltura le cellule sono fissate in metanolo 100% freddo per 20 min a -20°C . Le cellule vengono poi fatte reagire con un anticorpo policlonale specifico per OMP (goat, anti-OMP, Wako Chemicals, USA) ad una diluizione 1:1000. Il legame dell'anticorpo primario è visualizzato utilizzando un anticorpo secondario anti goat IgG coniugato con Cy3 (Jackson Laboratories). Le immagini sono acquisite al microscopio Olympus BX60.

2.5 Terreni e soluzioni utilizzate

I tessuti, durante la preparazione delle colture cellulari sono mantenuti in HBSS (HBSS, HEPES 0,3M, Pen-Strep 100U/ml).

Le cellule sono mantenute in terreno di coltura descritto da Ronnett et al. (80) (MEM-D-valina; 10% FBS; 5% NU Serum; PenStrep L-glutamine, 100U/ml; Ara C 10 μM ; NGF 25 ng/ml) a 37°C a 5% di CO_2 .

Gli esperimenti di imaging sono stati condotti incubando le cellule in soluzione Ringer (NaCl 140mM, KCl 5mM, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1mM, MgCl_2 1mM, glucosio 10mM, sodio piruvato 1mM, HEPES 10 mM; pH 7.2). Per gli esperimenti condotti in assenza di calcio esterno, si è utilizzata una soluzione Ringer senza calcio (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 1mM, glucosio 10mM, sodio piruvato 1mM, HEPES 10mM) e con EGTA 1mM.

Il MEM, il DMEM senza Rosso Fenolo, il FBS provengono dall'Invitrogen Corporation (Paisley, UK). Il NGF e il NU Serum sono acquistati dalla BD Bioscience. L'AraC proviene dalla Sigma-Aldrich.

Il PBS utilizzato per i lavaggi durante il protocollo di immunocitochimica è stato preparato in concentrazione 10X (NaCl 1,37M, KCl 27mM, Na_2HPO_4 101,4mM, KH_2PO_4 17,6mM, pH 7,4) e filtrato. Tutti i componenti sono Sigma.

2.6 Stimoli su neuroni sensoriali olfattivi in vitro

Gli stimoli farmacologici: ANP(1 μ M), SNAP(10 μ M), SNP (10 μ M), forskolina (25 μ M), sono forniti da *Sigma Aldrich*, preparati in stock e diluiti alla concentrazione finale nel bagnetto .Gli inibitori: IBMX (100 μ M), fornito da *Sigma*; Zaprinast (10 μ M) fornito da *Alexis*; LY83583 (10 μ M), e ZnPP9 (10 μ M) da *Calbiochem*; H89(10 μ M) e SQ22536 (30 μ M) da *Biomol.Internat*.

Lo stimolo odoroso e` rappresentato dalla miscela di diverse sostanze: acetofenone, citralva, S- e R-carvone, citronella, geraniolo, eugenolo, mentone, isobutylmethoxypyrazine (IBMP) (tutti *Sigma-Aldrich*). La mix odorosa e` preparata ad una concentrazione 1 mM in Ringer e diluita poi alla concentrazione finale di 200 μ M nel bagnetto. Tale concentrazione e` la piu` bassa a cui si riescono ad ottenere cambiamenti di FRET riproducibili. Prima dell'utilizzo la soluzione viene vortexata e sonicata 40 minuti ad una temperatura di 26°C.

3. RISULTATI

La regolazione del segnale cGMP in neuroni sensoriali olfattivi

Il lavoro oggetto di questa tesi è volto a determinare le dinamiche spazio temporali del cGMP nei NSO. Lo studio è stato condotto in vitro su colture primarie di neuroni sensoriali olfattivi isolati.

3.1 Colture primarie di neuroni sensoriali olfattivi

Colture primarie di neuroni sensoriali olfattivi sono state ottenute da turbinati di feti di ratto Sprague Dawely di 18-20 giorni. Per ottenere delle colture ottimali per numero e morfologia cellulare i turbinati devono provenire da embrioni di età non inferiore ai 18 giorni, per evitare una forte contaminazione da altri tipi cellulari, e non superiore ai 20 giorni, per avere una buona efficienza di trasfezione. Abbiamo osservato che risulta difficile trasfettare neuroni di età superiore. I neuroni sensoriali in coltura sono facilmente identificabili in base alla loro tipica morfologia bipolare e risultano positivi per il marker OMP (**fig.14**) .

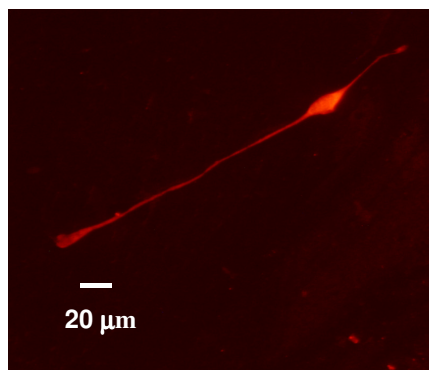


Fig. 14. Immagine di un neurone sensoriale olfattivo in coltura marcato per OMP. Si può osservare la tipica morfologia bipolare. Dendrite, in alto a destra; assone, in basso a sinistra.

3.2 Trasfezione di neuroni sensoriali olfattivi in coltura con sensori per cGMP

Per valutare le dinamiche spazio-temporali di cGMP nei neuroni sensoriali olfattivi questi sono stati trasfettati con le sonde per cGMP.

Inizialmente abbiamo testato due sensori, una sonda basata su PKG (Cygnet 2.1) ed una basata sul GAF domain della PDE5 (cGES-DE5) in quanto sensori diversi presentano diversa efficienza di trasfezione e diversa sensibilità a seconda dei tipi cellulari. Il sensore Cygnet 2.1 presenta una maggiore selettività per cGMP rispetto a cGES-DE5 ed una maggiore efficienza di trasfezione dei NSO. Non avendo rilevato altre differenze sostanziali tra le due sonde abbiamo deciso di condurre tutti gli esperimenti con il sensore Cygnet 2.1. Le cellule trasfettate mantengono la tipica morfologia bipolare dei neuroni sensoriali olfattivi, con fluorescenza omogeneamente distribuita nel citoplasma con esclusione del nucleo (**fig. 15**).



Fig. 15 Neurone sensoriale olfattivo in coltura trasfettato con la sonda Cygnet 2.1. La fluorescenza è uniformemente presente in tutto il citoplasma mentre è assente nel nucleo.

Una volta trasfettate le cellule sono mantenute in condizioni standard di coltura per 24 ore ed in seguito utilizzate per gli esperimenti di imaging del cGMP.

3.3 Dinamiche spazio-temporali di cGMP in neuroni sensoriali olfattivi

3.3.1 Effetto del cloro sui fluorofori

In laboratorio erano già stati testati due tipi diversi di soluzioni saline extracellulari, Ringer e HBSS-gluconato, in cui tenere le cellule trasfettate per esperimenti di real time FRET imaging. Le due soluzioni si differenziano rispettivamente per la presenza o l'assenza di Cl⁻. E' noto infatti che tale anione può provocare un quenching del fluoroforo YFP in alcuni tipi cellulari (81). Sono stati quindi effettuati dei controlli preliminari per verificare che la presenza di tale ione nella soluzione ringer non interferisse con l'emissione di YFP. I dati ottenuti da esperimenti condotti su cellule trasfettate con DNA plasmidico codificante esclusivamente i fluorofori YFP e CFP, non coniugato a sonde, hanno dimostrato che la fluorescenza dei fluorofori, e quindi il rapporto delle loro intensità di emissione, si mantiene stabile per tutta la durata degli esperimenti (10 -15 minuti). Questi dati indicano che non si verificano fenomeni di quenching dei fluorofori esaminati in nessuna delle soluzioni testate. Per tali ragioni tutti i nostri esperimenti sono stati condotti utilizzando la soluzione ringer che, rispetto alla soluzione HBSS-gluconato priva di Cl⁻, presenta maggiori caratteristiche fisiologiche per i NSO.

Questi controlli sono stati fondamentali per escludere che nei successivi esperimenti di FRET imaging variazioni del rapporto delle intensità di emissione delle fluorescenze (480nm/545nm) fossero ascrivibili ad alterazione dei fluorofori indipendenti da oggettive variazioni di concentrazione dei nucleotidi ciclici.

3.3.2 Dinamiche spazio-temporali di cGMP in NSO trattati con stimoli farmacologici

Per studiare le dinamiche spazio-temporali di cGMP in NSO abbiamo utilizzato stimoli farmacologici in grado di aumentare la concentrazione di cGMP quali gli attivatori delle guanilato ciclasi. Per valutare l'attività delle GC di membrana abbiamo utilizzato l'atrial natriureic peptide (ANP), un peptide in grado di attivare alcune delle GCp. Questo stimolo, come tutti quelli usati di seguito, e' stato aggiunto direttamente al bagnetto sperimentale. L'incremento della

concentrazione intracellulare di cGMP in seguito a stimolazione è valutato come aumento del rapporto tra l'intensità delle emissioni del canale CFP e del canale YFP (480 nm/545 nm, vedi cap 2). Tali variazioni sono state esaminate a livello di: cilia-dendrite, soma, assone terminale-cono di crescita.

In NSO trattati con ANP (attivatore delle GCp, 1µM) abbiamo rilevato un incremento di cGMP in tutto il neurone sensoriale olfattivo, compreso l'assone terminale-cono di crescita (**fig.16**). Abbiamo analizzato le dinamiche temporali delle variazioni di concentrazione di cGMP valutando il $t_{1/2}$, vale a dire il tempo richiesto per raggiungere metà della risposta massimale. I dati ottenuti indicano che l'incremento di cGMP avviene in tempi comparabili a livello di cilia-dendrite, soma e assone terminale-cono di crescita (n=5, $t_{1/2}$ in minuti: cilia-dendrita $5,9 \pm 2,6$; soma $6,7 \pm 2,6$; assone terminale-cono di crescita $4,5 \pm 2$) (**fig.17**). L'incremento di cGMP inizia subito dopo l'aggiunta dello stimolo e si mantiene sostenuto per l'intera durata dell'esperimento (almeno 8 minuti).

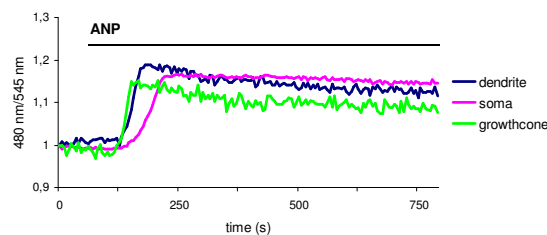


Fig. 16 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545 nm) in cilia-dendrite, soma e assone terminale -cono di crescita di un NSO trasfettato con il sensore per cGMP e stimolato con ANP (1 µM).

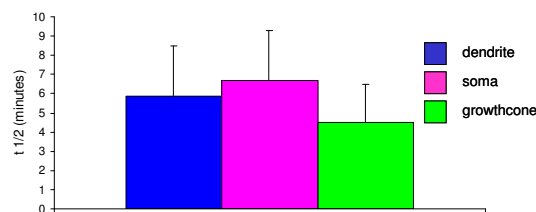


Fig. 17 Media dei $t_{1/2}$ in NSO trattati con ANP. Cilia- dendrite (blu), soma (rosa), e assone terminale-cono di crescita (verde). Barre= s.e.m., n=5.

Per studiare l'attività delle GC solubili abbiamo utilizzato delle sostanze donatrici di NO: sodionitroprusside (SNP) e S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP).

SNP si è rivelato essere uno stimolo difficile da somministrare nelle nostre condizioni sperimentali perché presenta una emivita estremamente breve per cui si inattivava in tempi troppo rapidi; per tale motivo abbiamo preferito usare l'altro donatore, SNAP, che risulta essere più stabile nel tempo. In seguito all'aggiunta di SNAP (10 μ M) è stato osservato un aumento di cGMP in tutto il neurone, compreso l'assone terminale-cono di crescita (**fig.18**). L'analisi delle dinamiche temporali ha rilevato che l'incremento di cGMP si manifesta più rapidamente all'assone terminale rispetto al soma e al cilia-dendrita (n=9, $t_{1/2}$ in minuti: cilia-dendrita $13,4 \pm 2,1$; soma $14,7 \pm 1,9$; assone terminale-cono di crescita $6,9 \pm 1,5$; **t-test**: cilia-dendrita-soma $p=0,13$; cilia-dendrita-cono di crescita $p=0.02^*$; cono di crescita-soma $p=0,005^{**}$) (**fig.19**) Inoltre l'incremento di cGMP si instaura senza apprezzabile fase di latenza all'assone terminale- cono di crescita, mentre nel soma e nelle cilia-dendrite l'incremento di cGMP è sempre preceduto da una fase di latenza (latenza in minuti: soma $10 \pm 1,3$, cilia-dendrita $8,8 \pm 1,8$). Il segnale rimane sostenuto in tutti i compartimenti analizzati per l'intera durata dell'esperimento (min=15 circa).

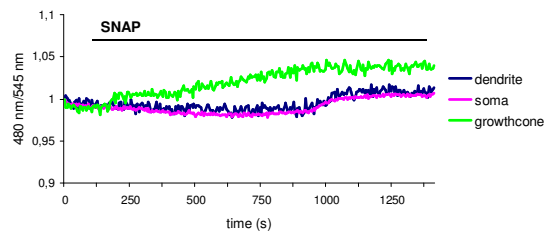


Fig. 18 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità delle emissioni di fluorescenza (480nm/545 nm) in cilia-dendrite , soma e assone terminale- cono di crescita di un NSO trasfettato con il sensore per cGMP e stimolato con SNAP (10 μ M).

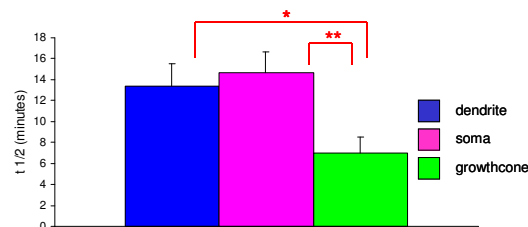


Fig. 19 Media dei $t_{1/2}$ nei NSO trattati con SNAP (n=9 t-test: cilia-dendrita-soma $p=0,13$; cilia-dendrita-cono di crescita $p=0.02^*$; cono di crescita-soma $p=0,005^{**}$) Barre =s.e.m.

3.3.3 Sintesi costitutiva di cGMP

Per valutare la presenza di una possibile attività costitutiva delle GC abbiamo trattato i NSO con inibitori delle PDE. In una prima serie di esperimenti abbiamo inibito l'attività delle PDE dipendenti da cGMP utilizzando zaprinast, inibitore specifico di cGMP-PDE (1,4 dihydro-5-(2-propoxyphenyl)-7H-1,2,3 triazolo(4,5-d) pyrimidine-7-one). Quando i NSO sono stati stimolati con zaprinast (10 μ M) non si è rilevato un aumento nei livelli intracellulari di cGMP (n=5) in nessuno dei compartimenti analizzati, cilia-dendrite, soma e assone terminale-cono di crescita (**fig.20**). Dopo 8-9 minuti dall'aggiunta di zaprinast gli stessi NSO sono stati trattati con ANP come controllo della responsività delle cellule, in modo da escludere che la mancanza di risposta al trattamento con zaprinast potesse essere imputabile ad uno stato fisiologico non ottimale della cellula testata. ANP è stato scelto come controllo in quanto produce delle risposte in tempi più brevi rispetto alle sostanze donatrici di NO. Come mostrato in **fig.20** La somministrazione di ANP ha prodotto un rapido incremento di cGMP in tutti i neuroni sensoriali che si erano rilevati non responsivi a zaprinast.

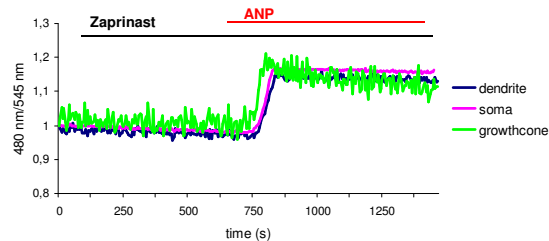


Fig. 20 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545 nm) in cilia-dendrite , soma e assone terminale -cono di crescita di un NSO trasfettato con il sensore per cGMP e stimolato con zaprinast (10 μ M) e successivamente con ANP (1 μ M).

Per testare il ruolo di tutte le PDE i neuroni sensoriali olfattivi sono stati trattati con IBMX (isobutil-mentil-xantine), un inibitore aspecifico delle fosfodiesterasi. Anche la stimolazione con IBMX (100 μ M) non ha prodotto un aumento nei livelli intracellulari di cGMP in nessuna delle cellule testate (n=8). Gli stessi neuroni non responsivi alla stimolazione con IBMX sono stati trattati successivamente con ANP, a seguito del quale un incremento di cGMP è stato rilevato in tutto il NSO dalle cilia-dendrite all'assone terminale (**fig.21**).

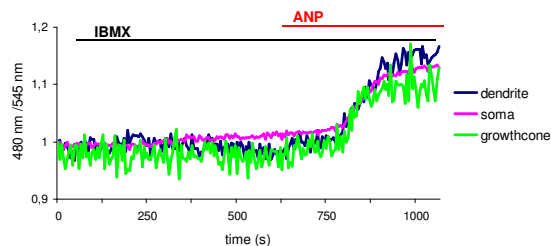


Fig. 21 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545 nm) in cilia-dendrite , soma e assone terminale- cono di crescita di un NSO trasfettato con il sensore per cGMP e stimolato con IBMX (100 μ M) e successivamente con ANP (1 μ M).

I dati ottenuti a seguito di stimolazione farmacologica dei NSO indicano che :

- 1) le attività delle GC, sia particolata sia solubile, producono un aumento di cGMP in tutto il NSO dalle cilia-dendrite all'assone terminale-cono di crescita.
- 2) non è presente attività costitutiva delle guanilato ciclasi, dato che l'inibizione delle PDE non provoca incremento del segnale cGMP.

3.3.4 Dinamiche spazio-temporali di cGMP in NSO trattati con stimoli fisiologici (odori)

Per valutare le dinamiche spazio-temporali di cGMP nei NSO a seguito di stimoli fisiologici, gli odori, i NSO sono stati trattati con una soluzione contenente molecole odorose diverse per gruppo funzionale (mix odorosa). La mix è stata composta in modo da poter massimizzare le nostre possibilità di evocare risposte nei neuroni sensoriali testati, data la specificità molecolare di ogni recettore.

In esperimenti preliminari abbiamo valutato la concentrazione ottimale di tale mix. Abbiamo testato un ampio range di concentrazioni (1mM-10 μ M). La concentrazione di 200 μ M è risultata essere la più bassa a cui ottenevamo risposte riproducibili.

In seguito all'applicazione della mix odorosa direttamente al bagnetto sperimentale si osserva un aumento consistente della concentrazione di cGMP. Tale incremento viene registrato in tutto il neurone, dalle cilia-dendrite all'assone

terminale-cono di crescita (**fig.22**). Analizzando le dinamiche temporali dei NSO responsivi agli odori abbiamo osservato significative differenze nei tempi di risposta tra neuroni diversi. Abbiamo pertanto suddiviso i NSO in due gruppi: NSO lenti e NSO veloci.

Abbiamo classificato come lenti i neuroni in cui gli incrementi di cGMP si realizzano con tempi ($t_{1/2}$) superiori a 3,5 minuti in tutti i compartimenti cellulari analizzati (n=5, **t 1/2 in minuti**: cilia-dendrita $8,2 \pm 1,5$; soma $8,1 \pm 1,2$; assone terminale-cono di crescita $6,9 \pm 0,7$).

Abbiamo definito veloci i NSO che presentavano un incremento di cGMP in tempi ($t_{1/2}$) inferiori a 3,5 minuti in tutti i compartimenti analizzati (n=7, **t 1/2 in minuti**: cilia-dendrite $2,6 \pm 0,6$; soma $3,3 \pm 0,5$; assone-terminale-cono di crescita $2,3 \pm 0,2$) (**fig.22**).

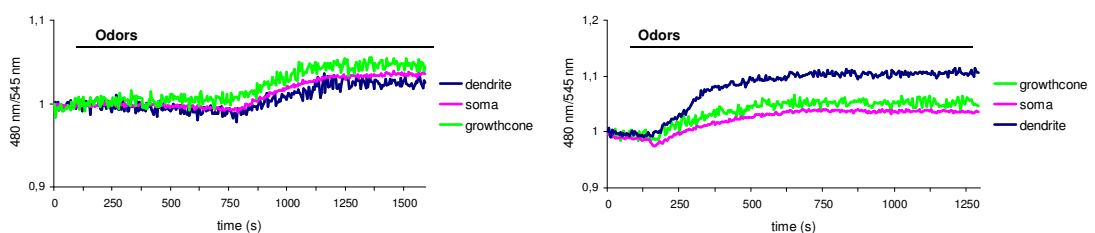


Fig. 22 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545 nm) in cilia-dendrite , soma e assone terminale- cono di crescita di NSO trasfettati con il sensore per cGMP e stimolati con la mix odorosa 200 μ M. Esempio di un neurone con cinetica lenta (a sinistra), e di un neurone a cinetica veloce (a destra).

In ciascun NSO analizzato, sia lento che veloce, l'incremento di cGMP si verificava in tempi analoghi nei diversi compartimenti cellulari dello stesso neurone. Confrontando le dinamiche temporali tra le cellule veloci e le cellule lente abbiamo riscontrato significative differenze nei $t_{1/2}$ in tutti i compartimenti analizzati (**t-test**: cilia-dendrite veloce-cilia-dendrite lento $p=0.009^*$; soma veloce-soma lento $p=0.02^*$; assone terminale veloce-assone terminale lento $p=0.006^*$) (**fig.23**).

I due gruppi si differenziavano anche per la modalità di insorgenza del segnale cGMP. Infatti nei neuroni veloci l'incremento di cGMP è rapido, senza un'apprezzabile fase di latenza tra l'aggiunta della mix odorosa e l'inizio del segnale cGMP in tutti i compartimenti analizzati .

Nelle cellule lente invece l'aumento di cGMP è lento, presentando una fase di latenza (latenza media in minuti: cilia-dendrita $3,6 \pm 1,9$; soma $3,6 \pm 1,6$; cono di crescita $3,4 \pm 1,5$).

In entrambi i tipi di neuroni, sia veloci sia lenti, il segnale cGMP si mantiene sostenuto per tutta la durata dell'esperimento (minuti= 18-20).

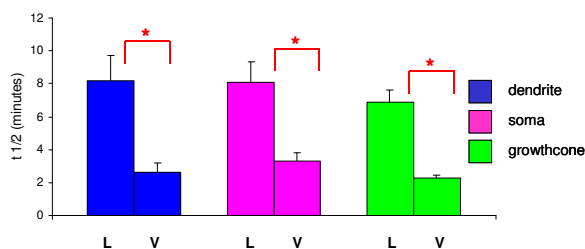


Fig. 23 t_{1/2} dei neuroni veloci (V) e dei neuroni lenti (L) trattati con odori, (**t-test**: cilia-dendrita veloce-cilia-dendrita lento p=0.009*; soma veloce-soma lento p=0.02*; assone terminale veloce-assone terminale lento p=0.006*). Barre=s.e.m.

3.3.5 GC solubili e dinamiche spazio-temporali di cGMP

Per valutare il ruolo delle GCs nell'insorgenza del segnale cGMP dopo stimolazione con gli odori abbiamo effettuato una serie di esperimenti in cui la mix odorosa è stata aggiunta al bagnetto in presenza di LY83583 (6-anilino-5,8 quinolinequinone), un inibitore dell'attività delle guanilato ciclasti solubili. L'inibitore (10µM) veniva aggiunto al bagnetto 15 minuti prima dell'inizio della stimolazione odorosa. Come si può vedere in **fig.24** a seguito di stimolazione odorosa in presenza dell'inibitore delle GCs non si rilevano aumenti nei livelli di cGMP in tutto il neurone olfattivo, dalle cilia-dendrite all'assone terminale (n=9). I NSO stimolati con odori in presenza di LY83583 sono stati stimolati successivamente con ANP, applicato al bagnetto 9-10 minuti dopo l'applicazione dello stimolo odoroso. In tutti i casi i neuroni non responsivi agli odori (in presenza di LY83583) si sono mostrati responsivi ad ANP presentando un pronto incremento di cGMP in tutto il neurone, dalle cilia-dendrite sino all'assone terminale-cono di crescita.

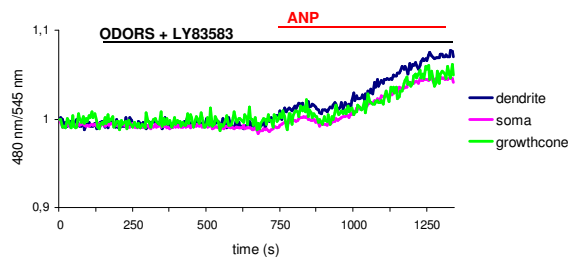


Fig. 24 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545 nm) in cilia-dendrite , soma e assone terminale -cono di crescita di un NSO trasfettato con il sensore per cGMP e stimolato con la mix odorosa (200 μ M) e LY83583 (10 μ M) e successivamente con ANP (1 μ M).

Le GC solubili possono essere attivate da messaggeri gassosi. Per valutare un potenziale ruolo di CO nell'attivazione di GCs dopo stimolo odoroso abbiamo trattato i neuroni con odori in presenza di un inibitore dell'enzima eme ossigenasi (zinco protoporfirina IX). Dati in letteratura riportavano un coinvolgimento di CO nella risposta agli odori, sebbene i meccanismi rimanessero oscuri (21,64). Abbiamo quindi stimolato i neuroni sensoriali olfattivi col la mix odorosa in presenza zinco protoporfirina IX (ZnPP9 10 μ M), aggiunto al bagnetto almeno 15 minuti prima dell'aggiunta della mix odorosa. Come si vede in **fig 25** in presenza di inibitore di HO si registra un incremento di cGMP in risposta allo stimolo odoroso in tutto il neurone sensoriale olfattivo (n=4) senza differenze nei tempi di insorgenza del segnale nei vari compartimenti analizzati.

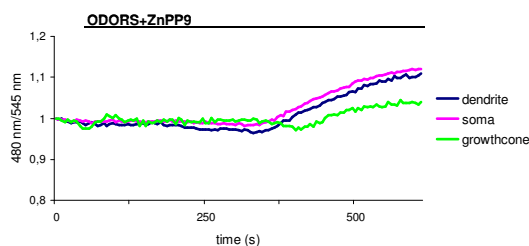


Fig.25 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545 nm) in cilia-dendrite , soma e assone terminale -cono di crescita di un NSO trasfettato con il sensore per cGMP e stimolato con la mix odorosa (200 μ M) e ZnPP9 (10 μ M).

3.3.6 Il Ca^{2+} e le dinamiche spazio-temporali di cGMP

E' ben noto che l'esposizione agli odori provoca un incremento di cAMP e calcio nei neuroni sensoriali olfattivi. Per valutare il ruolo del calcio nella attivazione di GCs a seguito di stimolazione con odori abbiamo stimolato i neuroni sensoriali olfattivi con la mix odorosa, mentre erano immersi in soluzione ringer priva di Ca^{2+} . La **fig. 26** mostra una tipica cinetica di cGMP dopo stimolazione con odori in assenza di Ca^{2+} . Come si puo' osservare dai grafici l'applicazione della mix odorosa e' seguita da un incremento di cGMP in tutto il neurone dalle cilia-dendrite sino all'assone terminale-cono di crescita. L'incremento di cGMP si verifica con dinamiche temporali analoghe nei diversi compartimenti cellulari dello stesso neurone.

Anche in questo caso, in base alle dinamiche temporali, è possibile distinguere neuroni veloci (n=4 **t 1/2 in minuti**: cilia-dendrita $1,8 \pm 0,6$; soma $2,6 \pm 1,1$; assone terminale-cono di crescita $1,5 \pm 0,5$) e NSO lenti (n=3 **t 1/2 in minuti**: cilia-dendrita $8,2 \pm 1,4$; ; soma $9,2 \pm 0,7$; assone terminale-cono di crescita $7,7 \pm 0,9$).

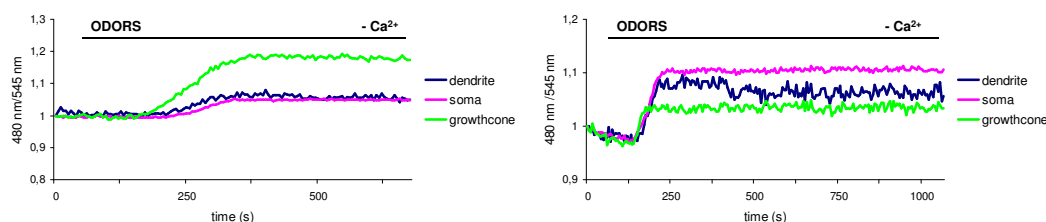


Fig.26 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545 nm) in cilia-dendrite, soma e assone terminale cono di crescita di NSO trasfettati con il sensore per cGMP e stimolati con mix odorosa (200 μ M) in soluzione Ringer priva di Ca^{2+} . NSO lento (a sinistra); NSO veloce (destra).

Confrontando le dinamiche temporali tra le cellule veloci e le cellule lente abbiamo riscontrato significative differenze nei t 1/2 in tutti i compartimenti analizzati (t test cilia-dendrita veloce-cilia-dendrita lento $p=0.05^*$; soma veloce-soma lento $p=0.02^*$; assone terminale veloce-assone terminale lento $p=0.02^*$). (**fig 27**)

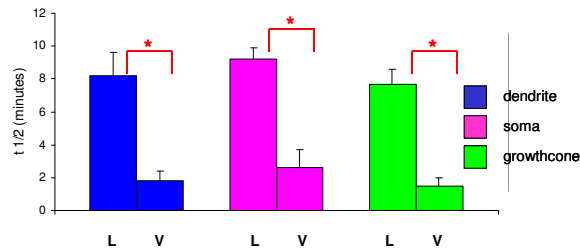


Fig. 27 $t_{1/2}$ dei neuroni veloci (V) e dei neuroni lenti (L) trattati con odori in assenza di calcio (t test cilia-dendrita veloce-cilia-dendrita lento $p=0.05^*$; soma veloce-soma lento $p=0.02^*$; assone terminale veloce-assone terminale lento $p=0.02^*$). Barre=s.e.m.

I NSO veloci si differenziano dai NSO lenti anche per la modalità di insorgenza del segnale cGMP. Nei neuroni veloci si ha un rapido incremento di cGMP senza apprezzabile fase di latenza. Nei neuroni lenti il segnale cGMP è lento e presenta una fase di latenza media (in minuti) di: cilia-dendrita $2,3 \pm 1,4$; soma $3 \pm 1,8$; assone terminale-cono di crescita $3,5 \pm 2,1$.

In entrambi i gruppi di neuroni il segnale di cGMP si mantiene sostenuto per tutta la durata dell'esperimento (almeno 8 minuti).

I dati ottenuti indicano che l'incremento di cGMP a seguito di stimolazione odorosa è mediato da GCs sebbene non siano ancora chiari i meccanismi molecolari che portano all'attivazione di GCs. Al momento possiamo solo escludere un ruolo in tal senso del calcio e di CO.

3.3.7 cAMP e cGMP: possibili interazioni

E' ben noto che l'esposizione agli odori provoca un aumento di cAMP, oltre al piu' lento e sostenuto incremento del segnale cGMP. Ci siamo chiesti se i due nucleotidi ciclici fossero in qualche modo interconnessi, in particolare abbiamo indagato se cAMP abbia un ruolo nel promuovere la sintesi del cGMP in seguito allo stimolo odoroso. Per testare questa ipotesi abbiamo stimolato i neuroni sensoriali olfattivi con forskolina, un attivatore generico di adenilato ciclasi. I neuroni sensoriali olfattivi trasfetti con Cygnet 2.1 e trattati con forskolina

(25 μ M) presentavano un incremento della concentrazione di cGMP (**fig. 28**). Questo aumento è stato osservato in tutto il NSO: cilia- dendrita, soma, assone terminale-cono di crescita. Come si può osservare dal grafico riportato in **fig. 29** l'aumento avviene senza differenze significative nei tempi di risposta nei tre compartimenti (n=4, **t 1/2 in minuti**: cilia-dendrita 6,5 \pm 3,1; soma 6,5 \pm 2,8; assone terminale-cono di crescita 6,7 \pm 2,5). L'instaurarsi del segnale cGMP è lento, presentando una fase di latenza in tutti i neuroni testati (latenza media in minuti: cilia-dendrita 3,9 \pm 2,9; soma 3,6 \pm 1,9; cono di crescita 4,2 \pm 1,7).

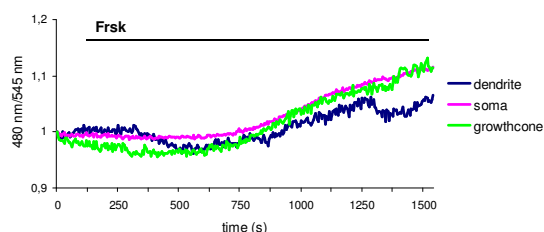


Fig.28 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545nm) in cilia-dendrite , soma e assone terminale- cono di crescita di NSO trasfettato con il sensore per cGMP e stimolato con forskolina (25 μ M) .

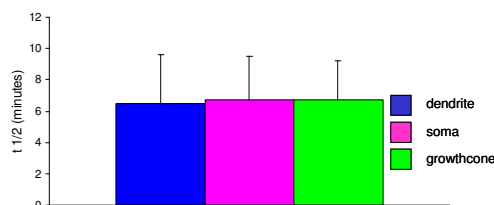


Fig.29 Media dei t $\frac{1}{2}$ in NSO trattati con forskolina.n=4. Barre= s.e.m.

I dati ottenuti indicano una correlazione tra l'attivazione della adenilato ciclasi, produzione di cAMP e la successiva sintesi di cGMP. Per valutare l'interazione tra i due nucleotidi ciclici in condizioni più fisiologiche, abbiamo stimolato i NSO con la mix odorosa in presenza di un inibitore della adenilato ciclasi, SQ22536 (9-(tetrahydro-2-furyl) adenine), aggiunto al bagnetto 15 minuti prima della stimolazione odorosa. In presenza dell' inibitore di AC (30 μ M) la stimolazione odorosa non produceva incremento del segnale cGMP in nessuno dei neuroni testati (6 su 6 neuroni testati,**fig.30A**). Tutti i neuroni stimolati con odori in presenza di inibitore di AC sono stati successivamente stimolati con ANP,

aggiunto dopo almeno 10 minuti dalla somministrazione dello stimolo odoroso. A seguito della somministrazione di ANP in tutti i neuroni testati è stato possibile rilevare un rapido incremento di cGMP a livello di cilia-dendrite, soma, assone terminale-cono di crescita. In un piccolo gruppo di cellule siamo riusciti a stimolare nuovamente lo stesso neurone, non responsivo a odori in presenza di SQ22536, con la mix odorosa. In breve il neurone non responsivo veniva sciacquato abbondantemente con soluzione fisiologica e dopo un'attesa di 15 minuti ri-stimolato esclusivamente con la mix odorosa. Il secondo stimolo odoroso provocava un incremento di cGMP in tutto il neurone, dalle cilia-dendrite all'assone terminale (**fig.30B**), senza differenze nei tempi di insorgenza del segnale cGMP tra i tre compartimenti cellulari considerati.

Le lente dinamiche temporali del segnale di cGMP hanno reso possibile l'attuazione di questo protocollo solo in pochissime cellule.

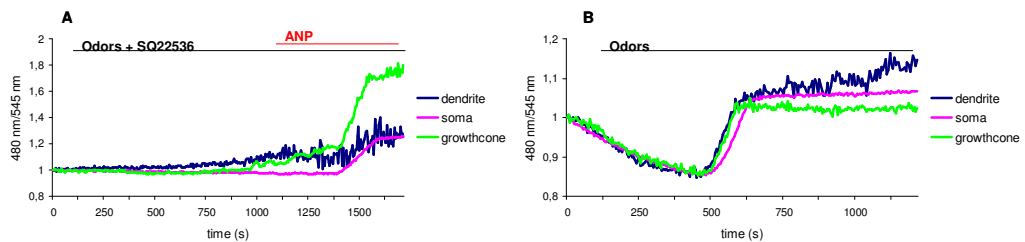


Fig. 30 : Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545 nm) in cilia-dendrite , soma e assone terminale- cono di crescita di un NSO trasfettato con il sensore per cGMP e stimolato **A)** con SQ22536 (30 μ M) e odori (200 μ M) e successivamente con ANP (1 μ M). **B)** stesso neurone di A) sciacquato e stimolato nuovamente solo con odori (200 μ M).

Ci siamo quindi chiesti attraverso quali meccanismi il cAMP vada a stimolare la sintesi di cGMP. Uno dei principali target di cAMP è la protein chinasi attivata da cAMP (PKA). Per verificare se cAMP agisca via PKA per portare ad una attivazione della sintesi di cGMP abbiamo stimolato i neuroni sensoriali olfattivi con la mix di odori in presenza di un inibitore di PKA: H89 (N-(2-(p-bromocinnamylamino)ethyl)-5-isoquinolinesulfonamide), che veniva aggiunto al bagnetto almeno 15 minuti prima di somministrare gli odori. Abbiamo osservato che il trattamento con odori in presenza di H89 (10 μ M) produce un incremento

nella concentrazione di cGMP in tutto il NSO con dinamiche temporali analoghe a quelle osservate in seguito a stimolazione odorosa in assenza di inibitore.

(n=6, **t 1/2 in minuti**: cilia-dendrita $3,6 \pm 0,5$; soma $4,31 \pm 0,4$; assone terminale-cono di crescita $3,7 \pm 1,3$). Il segnale di cGMP si mantiene sostenuto per l'intera durata dell'esperimento (almeno 8-10 minuti), analogamente a quanto osservato precedentemente in diverse condizioni sperimentali.

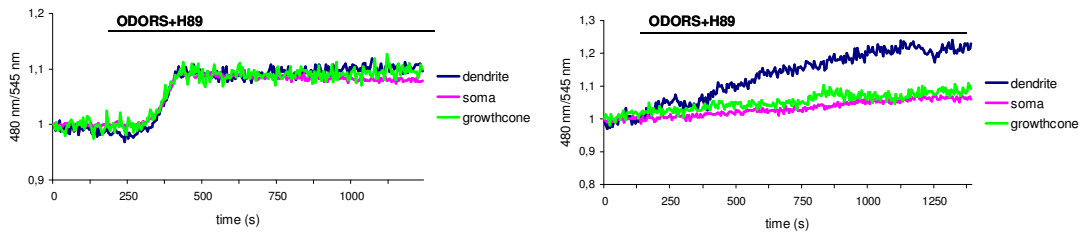


Fig. 31 Cinetica dei cambiamenti del rapporto di intensità di emissione di fluorescenza (480nm/545nm) in cilia-dendrite , soma e assone terminale -cono di crescita di NSO trasfettati con il sensore per cGMP e stimolati con H89 (30 μ M) e odori (200 μ M).

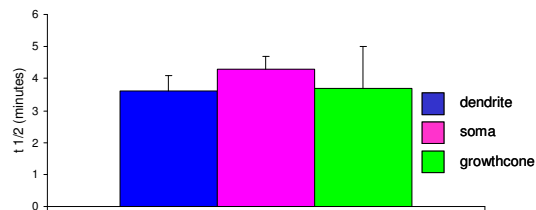


Fig. 32 Media dei t_{1/2} in NSO olfattivi trattati con H89 e odori, n=6. Barre=s.e.m.

In base ai dati ottenuti in questi esperimenti escludiamo quindi che PKA medi l'insorgenza del segnale cGMP dopo stimolo odoroso.

4. Discussione

Nei neuroni sensoriali olfattivi (NSO) il cGMP gioca un ruolo importante in molteplici processi, dall'adattamento della risposta agli odori allo sviluppo neuronale.

Il complesso metabolismo di questo secondo messaggero, sintetizzato da due diversi tipi di guanilato ciclasi (GC), solubili e di membrana, modulate da agenti diversi e in modo diverso a seconda dello stadio di sviluppo del neurone, e degradato da diverse fosfodiesterasi (PDE) ha fatto sì che la regolazione del cGMP nei NSO rimanesse in gran parte oscura. Inoltre i dati ottenuti finora, con saggi biochimici su estratti cellulari, non hanno consentito di valutare le dinamiche spaziali e temporali di cGMP in risposta a stimoli specifici in neuroni sensoriali olfattivi vivi. I dati ottenuti in questo progetto mostrano, per la prima volta, le dinamiche spazio temporali di cGMP nei neuroni sensoriali olfattivi in coltura .

Abbiamo osservato che a seguito di trattamento dei NSO con stimoli farmacologici (ANP, attivatore di GC di membrana, e SNAP, donatore di NO e attivatore di GC solubili) e fisiologici (odori), l'incremento di cGMP è presente in tutto il NSO, dalle cilia-dendrita all'assone. Le dinamiche temporali del segnale cGMP non presentano significative differenze tra i compartimenti analizzati: cilia-dendrite, soma, assone terminale-cono di crescita (fatta eccezione per i NSO trattati con SNAP, di cui parleremo oltre). Questi dati risultano in accordo con l'omogenea distribuzione di GCp e GCs nei NSO, come evidenziato da saggi immunostochimici (19,56) .

Non è presente una sintesi costitutiva di questo secondo messaggero, come dimostrato dall'assenza di segnale nei neuroni trattati esclusivamente con inibitori delle PDE.

Abbiamo in particolare analizzato le dinamiche spazio-temporali del segnale cGMP in risposta a stimoli fisiologici, gli odori.

Nei NSO trattati con odori si registra un incremento di cGMP in tutto il neurone, dalle cilia-dendrita fino all'assone terminale. Analizzando le dinamiche temporali della risposta cGMP agli odori non abbiamo evidenziato differenze tra i vari

compartimenti di uno stesso neurone. Tuttavia abbiamo osservato significative differenze nei tempi di risposta tra neuroni diversi. Abbiamo quindi classificato i NSO in due gruppi distinti, NSO *lenti* e NSO *veloci* a seconda che l'incremento di cGMP si verifichi in tutti i compartimenti (cilia-dendrite, soma e assone terminale) dello stesso neurone in tempi maggiori o minori di 3,5 minuti.

I neuroni *veloci* si distinguono dai *lenti* anche per l'assenza di fase di latenza tra l'aggiunta dello stimolo odoroso e l'inizio del segnale cGMP.

I meccanismi sottesi a queste diverse cinetiche temporali possono essere molteplici. 1) La diversa specificità del recettore olfattivo per il ligando può determinare una maggiore o minore velocità di attivazione del recettore e, conseguentemente, del signalling intracellulare ad esso associato. Nel nostro modello sperimentale noi usiamo una mix odorosa a concentrazione fissa su una eterogenea popolazione di recettori (non noti). Quindi ciascun recettore presenta una affinità diversa per i ligandi della mix (in base al codice combinatoriale presente nell'epitelio), e diverse cinetiche di attivazione e produzione di secondi messaggeri. 2) Diversi recettori potrebbero indurre attivazione di GC attraverso meccanismi diversi. Questa ipotesi presupporrebbe due popolazioni distinte di NSO in base al metabolismo di cGMP. 3) I meccanismi di degradazione del cGMP potrebbero essere diversi in neuroni diversi.

Per quanto i NSO siano una popolazione eterogenea proprio in relazione al recettore che esprimono, i meccanismi molecolari chiave, quale appunto la sintesi e degradazione di nucleotidi ciclici (in relazione al recettore olfattivo), presenti in ciascuno sembrano essere gli stessi, differenziandosi eventualmente nei tempi di sviluppo. Quindi la prima ipotesi sembrerebbe più adatta a spiegare il fenomeno osservato, nelle nostre condizioni sperimentali.

L'incremento di cGMP a seguito di stimoli odorosi è dovuto all'attività delle GCs, dato che l'inibizione della loro attività con inibitori specifici (LY22536) annulla la risposta cGMP agli odori (21). In che modo gli odori attivano le GCs?

I nostri dati escludono la possibilità che messaggeri gassosi quali il monossido di carbonio (CO) possano essere coinvolti nella attivazione di GCs. Infatti il trattamento dei NSO in presenza di inibitori di eme ossigenasi (HO) non compromette la risposta di cGMP alla stimolazione odorosa. Questo dato è in

contrasto con dati ottenuti con saggi radioimmunologici (21,64). E' probabile che i diversi risultati siano ascrivibili alle diverse tecniche usate.

E' da escludersi anche un possibile ruolo nella attivazione di GCs del Ca^{2+} , la cui concentrazione è ben noto aumentare a seguito di stimolazione odorosa, in quanto i dati che abbiamo ottenuto indicano che l'incremento di cGMP in risposta agli odori rimane invariato in assenza di Ca^{2+} .

A seguito di esposizione agli odori si ha un rapido incremento di cAMP che gioca un ruolo chiave nella trasduzione odorosa. Abbiamo quindi investigato un possibile ruolo di cAMP nella sintesi di cGMP, una possibile interazione tra questi due nucleotidi ciclici. Questa ipotesi è già stata avanzata in altri esperimenti, sebbene i dati siano stati ottenuti con saggi biochimici (21,25,56). Stimolando i NSO con odori in presenza di inibitore di adenilato ciclasi (AC) non era possibile evidenziare alcun incremento di cGMP nei NSO, nè alle cilia-dendrita, nè all'assone terminale nè al soma. Questi dati dimostrano che la presenza di cAMP è necessaria per la successiva sintesi di cGMP.

In che modo il cAMP può influenzare la sintesi di cGMP? Un ovvio candidato era la PKA, che rappresenta il principale target di cAMP. Sorprendentemente, tuttavia, i NSO stimolati con odori in presenza di inibitore della PKA, H89, mostravano un incremento di cGMP in tutto il neurone sensoriale, dalle cilia all'assone, con dinamiche temporali analoghe a quelle riscontrate in assenza di inibitore, escludendo quindi un possibile ruolo di PKA nell'attivazione di GCs.

E' da rilevare che le modalità con cui cAMP attiva le GCs nei NSO sembrano eludere le vie consuete attraverso cui cAMP generalmente influenza vari effettori e target cellulari. Pertanto indagini ulteriori sull'interazione tra cAMP e cGMP hanno le potenzialità di scoprire nuovi meccanismi di azione di cAMP.

Come abbiamo detto precedentemente a seguito di stimoli farmacologici e fisiologici si rileva un incremento di cGMP in tutto il neurone sensoriale, dalle cilia-dendrita fino all'assone terminale cono di crescita, suggerendo ruoli diversi di cGMP nei vari compartimenti cellulari.

E' noto che cGMP gioca un ruolo importante nell'adattamento del segnale odoroso ma è anche coinvolto nello sviluppo e allungamento assonale (71,72). Il cGMP come il cAMP sembra quindi presentare un duplice ruolo nei NSO e nell'organizzazione del sistema olfattivo. Questa ipotesi sembra rafforzata dalla

presenza dei meccanismi molecolari deputati alla sintesi e degradazione del cGMP non solo alle cilia ma anche all'assone, come indicano i risultati ottenuti con esperimenti di immunistochemica (19, 56), e dai nostri dati sulle cinetiche del segnale cGMP.

Rimangono molto scarse a tutt'oggi le conoscenze su questo duplice ruolo di cGMP nei NSO.

E' noto che l'enzima deputato alla sintesi di ossido nitrico (nitric oxide synthase, NOS) è espressa abbondantemente nei NSO durante lo sviluppo embrionale e nei primi giorni di vita postatale (20, 57, 58). A seguito di bulbectomia, tuttavia, l'espressione di NOS è rapidamente indotta nei neuroni rigeneranti ed è particolarmente ricca nei terminali assonici rigeneranti. Questi dati suggerivano un ruolo dell'ossido nitrico (NO) nei processi di sviluppo e allungamento assonale (67, 68).

I NSO trattati con donatori di NO, quali SNAP, mostrano un incremento di cGMP in tutto il neurone sensoriale olfattivo, dalle cilia-dendrita all'assone terminale. Analizzando le dinamiche temporali del segnale cGMP abbiamo visto che l'incremento si instaura più rapidamente all'assone rispetto al soma e alle cilia-dendrite. Inoltre a livello assonale non è apprezzabile una fase di latenza tra l'applicazione dello stimolo (SNAP) e l'insorgenza del segnale cGMP, mentre una fase di latenza di alcuni minuti è sempre presente a livello di cilia dendrite e soma. Le differenze osservate potrebbero essere dovute a una diversa distribuzione delle GCs sensibili a NO nei vari compartimenti dei NSO, essendo esse particolarmente concentrate all'assone nei neuroni in via di sviluppo e/o rigeneranti. Potrebbero essere coinvolti anche altri meccanismi quali la presenza di diversi tipi di GCs diversamente sensibili a NO, con diversa distribuzione nei subcompartimenti cellulari dei NSO, specie in vari stadi di sviluppo e/o in diversi stati dei NSO (es. NSO rigeneranti dopo lesione). Al momento non vi sono dati relativi all'esistenza di diversi tipi di GCs con diverse sensibilità per gli stimoli gassosi. I meccanismi di degradazione di cGMP potrebbe pure rendere conto delle diverse dinamiche temporali osservate.

Qualunque siano i meccanismi molecolari responsabili delle diverse dinamiche temporali osservate i dati suggeriscono un ruolo particolare di NO e cGMP soprattutto a livello dell'assone terminale dei NSO.

Il ruolo di cGMP nella crescita direzionata degli assoni e nello sviluppo delle connessioni sinaptiche è stato ampiamente studiato in altri sistemi, in particolare in neuroni spinali di *Xenopus Leavis* (71, 72). È stato dimostrato che la risposta ad alcune molecole segnale esterne è determinata criticamente dai livelli citosolici di cGMP, come pure del cAMP e del calcio (73, 74). Si è osservato che proprio i livelli di cGMP, e in particolare i rapporti della concentrazione di cGMP in relazione alla concentrazione di cAMP, determinano la direzione di crescita dell'assone in risposta a molecole guida esterne (72).

In conclusione, in questo studio abbiamo iniziato a dissezionare i complessi meccanismi che regolano la produzione di cGMP nei NSO. In particolare, grazie alle tecniche di real time imaging su neuroni vivi, abbiamo potuto mostrare, per la prima volta, la distribuzione cellulare e le dinamiche temporali di insorgenza del segnale cGMP e le sue interazioni con cAMP.

La presenza di cGMP alle cilia dendritica, come pure all'assone terminale, e le diverse modalità con cui la sintesi di questo secondo messaggero è influenzata nei diversi compartimenti cellulari dei NSO, indicano una duplice funzione di cGMP nei neuroni sensoriali olfattivi, come già osservato per cAMP.

5. Bibliografia

- (1) Ronnett GV, Moon C. G proteins and olfactory signal transduction. *Annu.Rev.Physiol.* 2002;64:189-222.
- (2) Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol.Rev.* 2005 Jan;85(1):281-317.
- (3) Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 2001 Sep 13;413(6852):211-218.
- (4) Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 1991 Apr 5;65(1):175-187.
- (5) Godfrey PA, Malnic B, Buck LB. The mouse olfactory receptor gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2004 Feb 17;101(7):2156-2161.
- (6) Zhang X, Firestein S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat.Neurosci.* 2002 Feb;5(2):124-133.
- (7) Malnic B, Godfrey PA, Buck LB. The human olfactory receptor gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2004 Feb 24;101(8):2584-2589.
- (8) Young JM, Trask BJ. The sense of smell: genomics of vertebrate odorant receptors. *Hum.Mol.Genet.* 2002 May 15;11(10):1153-1160.
- (9) Monti-Graziadei GA, Margolis FL, Harding JW, Graziadei PP. Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. *J.Histochem.Cytochem.* 1977 Dec;25(12):1311-1316.
- (10) Chess A, Simon I, Cedar H, Axel R. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 1994 Sep 9;78(5):823-834.
- (11) Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 1999 Mar 5;96(5):713-723
- (12) *The synaptic organization of the brain.* Oxford University Press; 2004.
- (13) Shipley MT, Ennis M. Functional organization of olfactory system. *J.Neurobiol.* 1996 May;30(1):123-176.
- (14) Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 1999 Oct 22;286(5440):711-715.

- (15) Pace U, Hanski E, Salomon Y, Lancet D. Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* 1985 Jul 18-24;316(6025):255-258.
- (16) Sklar PB, Anholt RR, Snyder SH. The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *J.Biol.Chem.* 1986 Nov 25;261(33):15538-15543.
- (17) Nakamura T, Gold GH. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 1987 Jan 29-Feb 4;325(6103):442-444.
- (18) Bakalyar HA, Reed RR. The second messenger cascade in olfactory receptor neurons. *Curr.Opin.Neurobiol.* 1991 Aug;1(2):204-208.
- (19) Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 1993 Jan 15;259(5093):381-384.
- (20) Ingi T, Ronnett GV. Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons. *J.Neurosci.* 1995 Dec;15(12):8214-8222.
- (21) Moon C, Simpson PJ, Tu Y, Cho H, Ronnett GV. Regulation of intracellular cyclic GMP levels in olfactory sensory neurons. *J.Neurochem.* 2005 Oct;95(1):200-209.
- (22) Kroner C, Boekhoff I, Lohmann SM, Genieser HG, Breer H. Regulation of olfactory signalling via cGMP-dependent protein kinase. *Eur.J.Biochem.* 1996 Mar 1;236(2):632-637.
- (23) Leinders-Zufall T, Shepherd GM, Zufall F. Modulation by cyclic GMP of the odour sensitivity of vertebrate olfactory receptor cells. *Proc.Biol.Sci.* 1996 Jun 22;263(1371):803-811.
- (24) Leinders-Zufall T, Rand MN, Shepherd GM, Greer CA, Zufall F. Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J.Neurosci.* 1997 Jun 1;17(11):4136-4148.
- (25) Moon C, Sung YK, Reddy R, Ronnett GV. Odorants induce the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in olfactory receptor neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1999 Dec 7;96(25):14605-14610.
- (26) Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. Information coding in the olfactory

system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 1994 Dec 30;79(7):1245-1255.

(27) Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 1994 Dec 16;79(6):981-991.

(28) Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, et al. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 1996 Nov 15;87(4):675-686.

(29) Strotmann J, Breer H. Formation of glomerular maps in the olfactory system. *Semin.Cell Dev.Biol.* 2006 Aug;17(4):402-410.

(30) Royal SJ, Key B. Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice. *J.Neurosci.* 1999 Nov 15;19(22):9856-9864.

(31) Zou DJ, Feinstein P, Rivers AL, Mathews GA, Kim A, Greer CA, Mombaerts P, Firestein S: Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science* 2004, 304: 1976-1979.

(32) Wang F, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 1998 Apr 3;93(1):47-60.

(33) Serizawa S, Miyamichi K, Nakatani H, Suzuki M, Saito M, Yoshihara Y, et al. Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 2003 Dec 19;302(5653):2088-2094.

(34) Cutforth T, Moring L, Mendelsohn M, Nemes A, Shah NM, Kim MM, et al. Axonal ephrin-As and odorant receptors: coordinate determination of the olfactory sensory map. *Cell* 2003 Aug 8;114(3):311-322.

(35) Serizawa S, Miyamichi K, Takeuchi H, Yamagishi Y, Suzuki M, Sakano H. A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* 2006 Dec 1;127(5):1057-1069.

(36) Taniguchi M, Nagao H, Takahashi YK, Yamaguchi M, Mitsui S, Yagi T, et al. Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A-deficient mice. *J.Neurosci.* 2003 Feb 15;23(4):1390-1397.

(37) Barnea G, O'Donnell S, Mancina F, Sun X, Nemes A, Mendelsohn M, et al. Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science* 2004 Jun 4;304(5676):1468.

- (38) Strotmann J, Levai O, Fleischer J, Schwarzenbacher K, Breer H. Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. *J.Neurosci.* 2004 Sep 1;24(35):7754-7761.
- (39) Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu.Rev.Neurosci.* 2003;26:509-563.
- (40) Murad F, Rapoport RM, Fiscus R. Role of cyclic-GMP in relaxations of vascular smooth muscle. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1985;7 Suppl 3:S111-8.
- (41) Murad F, Waldman SA, Fiscus RR, Rapoport RM. Regulation of cyclic GMP synthesis and the interactions with calcium. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1986;8 Suppl 8:S57-60.
- (42) Jia L, Furchgott RF. Inhibition by sulfhydryl compounds of vascular relaxation induced by nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1993 Oct;267(1):371-378.
- (43) Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1999 Dec;34(6):879-886.
- (44) Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ.Res.* 2003 Jul 25;93(2):96-105.
- (45) Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ.Res.* 2003 Oct 17;93(8):700-709.
- (46) Kobińska M, Gorczyca WA. Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation. *Acta Biochim.Pol.* 2000;47(3):517-528.
- (47) Leinders-Zufall T, Cockerham RE, Michalakis S, Biel M, Garbers DL, Reed RR, et al. Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2007 Sep 4;104(36):14507-14512.
- (48) Julif DM, Fulle HJ, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL, Beavo JA. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997 Apr 1;94(7):3388-3395.

- (49) Mumby MC, Martins TJ, Chang ML, Beavo JA. Identification of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase in lung tissue with monoclonal antibodies. *J.Biol.Chem.* 1982 Nov 25;257(22):13283-13290.
- (50) Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002 Sep;3(9):710-718.
- (51) Borisy FF, Ronnett GV, Cunningham AM, Juilfs D, Beavo J, Snyder SH. Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *J.Neurosci.* 1992 Mar;12(3):915-923.
- (52) Bradley J, Reisert J, Frings S. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr.Opin.Neurobiol.* 2005 Jun;15(3):343-349.
- (53) Zagotta WN, Siegelbaum SA. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu.Rev.Neurosci.* 1996;19:235-263.
- (54) Frings S, Lynch JW, Lindemann B. Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity, and blockage. *J.Gen.Physiol.* 1992 Jul;100(1):45-67.
- (55) Nakamura T. Cellular and molecular constituents of olfactory sensation in vertebrates. *Comp.Biochem.Physiol.A.Mol.Integr.Physiol.* 2000 May;126(1):17-32.
- (56) Moon C, Jaber P, Otto-Bruc A, Baehr W, Palczewski K, Ronnett GV. Calcium-sensitive particulate guanylyl cyclase as a modulator of cAMP in olfactory receptor neurons. *J.Neurosci.* 1998 May 1;18(9):3195-3205.
- (57) Roskams AJ, Brecht DS, Dawson TM, Ronnett GV. Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. *Neuron* 1994 Aug;13(2):289-299.
- (58) Roskams AJ, Brecht DS and Ronnett GV. Nitric oxide expressing during olfactory neuron development and regeneration. *Aches* 16, 308.
- (59) Brecht DS, Snyder SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 1994 Aug;13(2):301-313.
- (60) Bauer I, Wanner GA, Rensing H, Alte C, Miescher EA, Wolf B, et al. Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology* 1998 Mar;27(3):829-838.

- (61) Kutty RK, Maines MD. Selective induction of heme oxygenase-1 isozyme in rat testis by human chorionic gonadotropin. *Arch.Biochem.Biophys.* 1989 Jan;268(1):100-107.
- (62) Breer H, Klemm T, Boekhoff I. Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system. *Neuroreport* 1992 Nov;3(11):1030-1032.
- (63) Breer H, Shepherd GM. Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends Neurosci.* 1993 Jan;16(1):5-9. 101)
- (64) Zufall F, Leinders-Zufall T. Identification of a long-lasting form of odor adaptation that depends on the carbon Monoxide/cGMP second-messenger system. *J.Neurosci.* 1997 Apr 15;17(8):2703-2712.
- (65) Kurahashi T, Menini A. Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature* 1997 Feb 20;385(6618):725-729.
- (66) Chen T-Y, Yau K-W. Direct modulation by Ca^{2+} -calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neuron. *Nature* 1994 368:5454-48.
- (67) Chen J, Tu Y, Moon C, Matarazzo V, Palmer AM, Ronnett GV. The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Dev.Biol.* 2004 May 1;269(1):165-182.
- (68) Van Wagonen S, Rehder V. Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide. *J.Neurobiol.* 1999 May;39(2):168-185.
- (69) Kafitz KW, Leinders-Zufall T, Zufall F, Greer CA. Cyclic GMP evoked calcium transients in olfactory receptor cell growth cones. *Neuroreport* 2000 Mar 20;11(4):677-681.
- (70) Murphy GJ, Isaacson JS. Presynaptic cyclic nucleotide-gated ion channels modulate neurotransmission in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 2003 Feb 20;37(4):639-647.
- (71) Song H, Ming G, He Z, Lehmann M, McKerracher L, Tessier-Lavigne M, et al. Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 1998 Sep 4;281(5382):1515-1518.
- (72) Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier-Lavigne M, et al. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca^{2+} channels

sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 2003 Jun 26;423(6943):990-995.

(73) Song HJ, Poo MM. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr.Opin.Neurobiol.* 1999 Jun;9(3):355-363.

(74) Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 1997 Dec;19(6):1225-1235.

(75) Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM. The measurement of cyclic nucleotides by radioimmunoassay. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 1970;3:89-111.

(76) Miyawaki A, Tsien RY. Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* 2000;327:472-500.

(77) Zorov DB, Kobrinsky E, Juhaszova M, Sollott SJ. Examining intracellular organelle function using fluorescent probes: from animalcules to quantum dots. *Circ.Res.* 2004 Aug 6;95(3):239-252.

(78) Nikolaev VO, Gambaryan S, Lohse MJ. Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nat.Methods* 2006 Jan;3(1):23-25.

(79) Honda A, Adams SR, Sawyer CL, Lev-Ram V, Tsien RY, Dostmann WR. Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001 Feb 27;98(5):2437-2442.

(80) Ronnett GV, Hester LL, Snyder SH. Primary culture of neonatal rat olfactory neurons. *J. Neurosci* 1991, 11 (5): 1243-55.

(81) Slemmer JE, Matsushita S, De Zeeuw CI, Weber JT, Knopfel T. Glutamate-induced elevations in intracellular chloride concentration in hippocampal cell cultures derived from EYFP-expressing mice. *Eur. J. Neurosci.* 2004 Jun; 19 (11):2915-22.

