

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE E BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO DI NEUROBIOLOGIA

CICLO XXV

**Ruolo dell'attività spontanea nella formazione dei circuiti neurali del bulbo
olfattivo e nell'elaborazione dell'informazione sensoriale**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Daniela Pietrobon

Supervisore: Dott.ssa Claudia Lodovichi

Dottorando: Paolo Lorenzon

INDICE

SUMMARY	5
SOMMARIO	7
1. INTRODUZIONE	9
1.1 Il sistema olfattivo dei roditori	9
1.2 L'epitelio olfattivo	11
1.3 Il bulbo olfattivo	14
1.4 Il glomerulo	20
1.5 Il recettore olfattivo	24
1.6 Trasduzione dello stimolo sensoriale olfattivo	26
1.7 Il codice combinatoriale	28
1.8 Organizzazione topografica	30
1.9 Organizzazione topografica epitelio	31
1.10 Organizzazione topografica bulbo	33
1.11 Mappe glomerulari funzionali	40
1.12 Sviluppo dei circuiti neurali	46
2. MATERIALI E METODI	51
2.1 Linee di topi transgenici	51
2.2 Iniezioni <i>in vivo</i>	51
2.3 Iniezioni <i>ex vivo</i>	52
2.4 Acquisizione delle immagini al confocale e analisi dei dati	53
2.5 Test comportamentali	54
2.6 Modulazione dell'espressione del gene Kir 2.1	56
2.7 Immunoistochimica	57
2.8 Soluzioni utilizzate	57

3. RISULTATI	59
3.1 Sviluppo dell'organizzazione topografica del bulbo olfattivo: le connessioni intrabulbari tra glomeruli omologhi	59
3.2 Ruolo dell'attività afferente spontanea nello sviluppo dell'organizzazione topografica del bulbo olfattivo	63
3.3 Conseguenze funzionali – comportamentali delle alterazioni dell'organizzazione topografica del bulbo olfattivo	66
3.4 Ruolo dell'attività afferente spontanea nel mantenimento della topografia del bulbo olfattivo	69
4. DISCUSSIONE	73
4.1 Ruolo dell'attività spontanea nella formazione della topografia del bulbo olfattivo	73
4.2 Ripercussioni sull'elaborazione dell'informazione sensoriale e sul comportamento olfattivo, in animali privi di attività afferente spontanea	74
4.3 Ruolo dell'attività afferente spontanea nel mantenimento della topografia del bulbo olfattivo	75
5. BIBLIOGRAFIA	77

RINGRAZIAMENTI

Summary

The mammalian central nervous system relies on precise synaptic connections to function correctly.

The development of precise neuronal circuitry is regulated by axon guidance molecules as well as by specific pattern of activity between the pre and the post synaptic elements.

In this thesis I focused on activity dependent mechanisms, and we analyzed the role of spontaneous afferent activity in the topographic organization of the olfactory bulb. To address this point we analyzed the intrabulbar connections between isofunctional glomeruli in a line of mice genetically modified to have very little spontaneous afferent activity due to the overexpression of the inward rectifying potassium channel Kir2.1 in the olfactory sensory neurons (Yu et al., 2004).

Since previous studies were limited to adults (Bellusio et al., 2002; Lodovichi et al., 2003), we first defined the development of the intrabulbar projections between isofunctional glomeruli at early stages of development in control mice. Targeting focal tracer injections to the glomerular layer, we found that the intrabulbar projection is present as early as P7 and it is targeted between homologous glomeruli. However, at this early stage of development, the projection is not confined exclusively to the homologous glomerulus but larger. We found that the connections undergo a refinement process between P15 and P30, when they reach the mature organization of a point to point projection. We then analyzed the formation and the specific targeting of the intrabulbar link in animals with reduced spontaneous activity, i.e. Kir 2.1 mice. We found that the connections are preserved in these mice, but are not exclusively confined to the homologous glomeruli. The link remains larger than in control mice at all the ages tested, from postnatal day 30 to 70, due to the lack of developmental refinement.

We then assess the effects of the unrefined connectivity of the bulbar circuits on olfactory behaviour using a classical behavioral test designed to assess the ability to discriminate between two different odorants. We found that Kir 2.1 mice were hampered in discriminating odorants that elicit similar spatial patterns of activated glomeruli (functional maps), such enantiomers, while retaining the ability to discriminate odorants that activate very distinct spatial pattern of glomeruli .

Spontaneous activity is thought to play a prominent role in circuit formation at very early stages of development. Once sensory systems become responsive to sensory stimuli, evoked activity contributes to the stabilization and further refinement of neuronal connections. It has been clearly demonstrated that sensory experience often modulates the development of neuronal circuitry within a defined period of time (critical period) in which the brain is particularly plastic.

Whether spontaneous activity can modulate synaptic connections in adult life, remains unknown.

We addressed this topic in the olfactory system and we studied whether manipulation of afferent spontaneous activity in adulthood could affect the already established and refined synaptic contacts, i.e. the intrabulbar connections. Taking advantage of the inducible nature of the Kir 2.1 construct, we allow the expression of the Kir 2.1 channels only in adulthood (P30-P60), for 30 days. We found that the expression of the Kir 2.1 channel in adults was able to induce a regression of the intrabulbar link to an unrefined and enlarged status.

Sommario

Il corretto funzionamento del sistema nervoso centrale dei mammiferi si basa sulla specificità delle connessioni sinaptiche.

Lo sviluppo di un circuito neurale è regolato sia da molecole specifiche, dette *axon guidance molecules* che da precisi schemi di attività elettrica che si stabiliscono tra i neuroni pre e post-sinaptici.

In questo lavoro di tesi mi sono focalizzato sul ruolo dell'attività elettrica nella formazione dei circuiti neurali ed in particolare ho studiato il ruolo dell'attività afferente spontanea nell'organizzazione topografica del bulbo olfattivo. Per raggiungere tale obiettivo abbiamo analizzato la connessione intrabulbare tra glomeruli isofunzionali (o omologhi) in una linea di topi geneticamente modificati, nei quali l'attività afferente spontanea è estremamente ridotta a causa dell'over-espressione di un canale potassio *inward rectifier* (Kir2.1) nei neuroni sensoriali olfattivi (Yu et al., 2004).

Poiché studi precedenti avevano analizzato la connessione intrabulbare solo in animali adulti (Belluscio et al. 2002; Lodovichi et al., 2003), abbiamo dapprima studiato lo sviluppo della connessione intrabulbare tra glomeruli omologhi, a diversi stadi di sviluppo (P7-P70), in animali di controllo. Effettuando iniezioni di un tracciante fluorescente nello strato dei glomeruli, abbiamo trovato che la connessione intrabulbare tra glomeruli omologhi è presente già a una settimana di vita post-natale (P7). Tuttavia a questo stadio di sviluppo, la connessione non è circoscritta esclusivamente al glomerulo omologo corrispondente, ma più ampia. In questa fase il rapporto tra il diametro dell'iniezione e l'estensione della proiezione è ~ 4:1. Abbiamo trovato che la connessione va incontro ad un processo di maturazione tra P15 e P30. In questo periodo si osserva un restringimento dell'estensione della proiezione che assume le dimensioni circoscritte al singolo glomerulo omologo, tale per cui il rapporto tra l'estensione della proiezione ed il diametro dell' iniezione è 1:1, proprio della connessione matura. Le dimensioni della connessione si mantengono stabili a tutti gli stadi esaminati, sino a P70.

Abbiamo quindi analizzato il ruolo dell'attività afferente spontanea nella formazione e nel mantenimento della connessione intrabulbare, in animali con ridotta attività afferente spontanea, i topi Kir 2.1. Abbiamo visto che le connessioni intrabulbari sono ancora presenti

in questi animali, sebbene non siano esclusivamente circoscritte ai glomeruli omologhi. Il rapporto tra l'estensione della proiezione ed il diametro dell'iniezione non raggiunge mai il valore di 1:1, proprio della connessione matura, a nessuna delle età analizzate (P30-P70) in animali con ridotta attività afferente. In questi animali il processo di maturazione non sembra mai completarsi.

Ci siamo poi chiesti quali fossero le ripercussioni di un'alterata circuiteria neurale nel bulbo olfattivo sul comportamento olfattivo. A tale scopo abbiamo utilizzato un test comportamentale classico elaborato per valutare la capacità di un animale di discriminare tra due differenti odori. Abbiamo osservato che gli animali con ridotta attività afferente non riuscivano a discriminare gli odori che attivano pattern spaziali di glomeruli (mappe funzionali) simili, quali gli enantiomeri, mentre mantenevano la capacità di discriminare odori in grado di attivare pattern spaziali di glomeruli molto distinti.█

Molti studi sulla formazione dei circuiti neurali nei sistemi sensoriali hanno dimostrato che l'attività spontanea gioca un ruolo chiave nella formazione dei circuiti in stadi molto precoci dello sviluppo. Una volta che i sistemi sensoriali diventano sensibili agli stimoli sensoriali specifici, l'attività elettrica evocata rafforza e completa la maturazione dei già stabiliti contatti sinaptici.

E' stato chiaramente dimostrato che l'attività sensoriale modula lo sviluppo della circuiteria neurale all'interno di un periodo circoscritto (periodo critico), in cui il sistema nervoso centrale è estremamente plastico. Se l'attività spontanea abbia un ruolo sui circuiti neurali in età adulta rimaneva oscuro.

Dato l'alto grado di plasticità del sistema olfattivo ci siamo chiesti se la manipolazione dell'attività elettrica spontanea in età adulta potesse modificare architetture neurali già consolidate, come ad esempio le connessioni intrabulbari. Sfruttando la natura inducibile del costrutto Kir 2.1, abbiamo permesso l'espressione del canale Kir 2.1 solamente in età adulta (P30-P60), per 30 giorni. Abbiamo scoperto che l'assenza di attività spontanea solo in età adulta è in grado di indurre la regressione della connessione intrabulbare ad uno stadio immaturo (la connessione risulta per tanto più larga).

Tutti assieme questi dati indicano che l'attività afferente spontanea gioca un ruolo critico non solo nella formazione dei circuiti nervosi del bulbo olfattivo, ma anche nel loro corretto mantenimento.

Inoltre la modificata architettura della circuiteria bulbare si riflette in un comportamento olfattivo alterato.

1. Introduzione

1.1 Il sistema olfattivo dei roditori

Il sistema olfattivo dei mammiferi è costituito da 2 distinti sistemi: 1) il sistema olfattivo principale; 2) il sistema olfattivo accessorio (Figura 1).

Il sistema olfattivo principale è formato da: epitelio olfattivo (EO), bulbo olfattivo principale ed aree corticali olfattive direttamente collegate ad esso, quali corteccia piriforme, nuclei olfattivi anteriori, tubercoli olfattivi, il nucleo corticale dell'amigdala e le regioni laterali della corteccia entorinale.

Nella maggior parte degli animali il sistema olfattivo gioca un ruolo fondamentale nell'espletare funzioni vitali quali procacciarsi il cibo, inseguire una preda ed identificare il partner. I segnali olfattivi coinvolti in questi processi vengono elaborati dal sistema olfattivo principale.

Il sistema olfattivo accessorio è costituito da: l'organo vomero nasale (VNO), il bulbo olfattivo accessorio e le aree corticali ad esso associate, quali amigdala mediale, amigdala corticale posteriore ed i nuclei corticali medio-posteriori dell'amigdala (Pro-Sistiaga et al., 2007). Questo sistema è deputato al riconoscimento di segnali specie-specifici, detti ferormoni, che vengono secreti nei liquidi biologici quali saliva o secrezioni genitali. I ferormoni svolgono un ruolo critico in molte importanti funzioni biologiche quali aggressività, territorialità, accoppiamento e cure parentali.

Sebbene i due sistemi siano anatomicamente ben distinti, da un punto di vista funzionale esiste un certo grado di sovrapposizione, potendo i segnali specifici del sistema olfattivo primario, gli odori, essere processati dal sistema accessorio (Trinh e Storm, 2003) e viceversa.

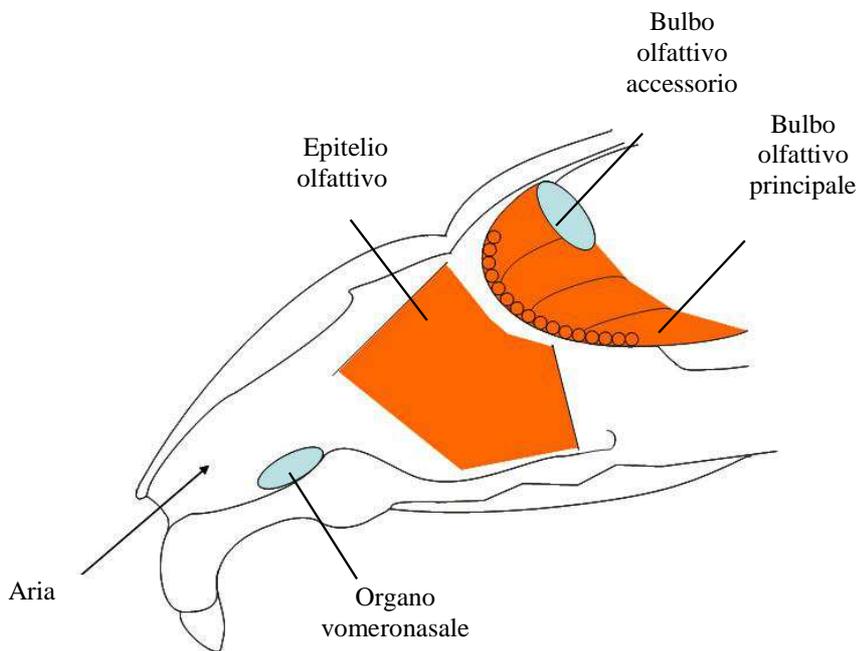


Figura 1. Rappresentazione schematica del sistema olfattivo. Sezione sagittale di una testa di roditore con il sistema olfattivo evidenziato a colori.

In questo progetto di tesi ho studiato il ruolo dell'attività afferente spontanea nella formazione e funzione dei circuiti neurali nel sistema olfattivo principale, in particolare nel bulbo olfattivo principale dei topi.

1.2 L'epitelio olfattivo

L'epitelio olfattivo (EO) è un epitelio colonnare ciliato pseudostratificato, che riveste il setto e i turbinati, strutture cartilaginee convolute localizzate nella parte postero-dorsale delle cavità nasali (Figura 2). L'epitelio olfattivo è posto direttamente in contatto con l'aria che circola nelle cavità nasali.

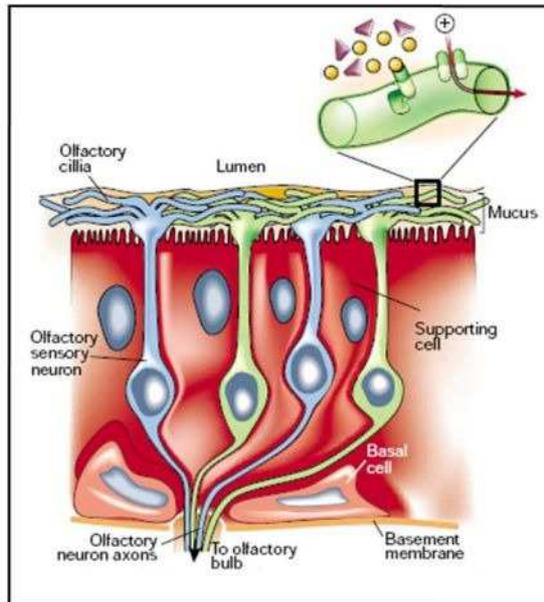


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'epitelio olfattivo. Le principali componenti dell'epitelio olfattivo: i neuroni sensoriali olfattivi (olfactory sensory neuron), le cellule basali (basal cell) e le cellule di supporto (supporting cell). Le ciglia olfattive (olfactory cilia) protrudono nelle cavità nasali. Le ciglia olfattive sono disperse in uno strato di muco acquoso. Immagine modificata da Firestein, 2001.

L'epitelio olfattivo è costituito da tre tipi cellulari principali: 1) i neuroni sensoriali olfattivi (NSO); 2) le cellule sustentcolari; 3) le cellule basali.

I neuroni sensoriali olfattivi sono gli elementi cellulari deputati al rilevamento degli odori. I neuroni sensoriali olfattivi rigenerano costantemente per tutta la durata della vita dell'individuo, presentando un'emivita di 60-90 giorni (Graziadei e Monti-Graziadei, 1979; Caggiano et al., 1994; Huard et al., 1998). Le cellule basali, poste in prossimità della membrana basale dell'epitelio olfattivo, sono i precursori da cui rigenerano i neuroni sensoriali olfattivi. Questi neuroni sensoriali (Figura 3) presentano una tipica morfologia bipolare con un unico dendrita apicale non arborizzato ed un

assone, sottile, amielinico, che dal polo prossimale della cellula proietta al bulbo olfattivo, la prima stazione di ritrasmissione dell'informazione sensoriale olfattiva. Il dendrita apicale termina in un rigonfiamento sferico detto *knob* da cui si dipartono numerosi filamenti sottili, le cilia, che protrudono nelle cavità nasali. Le cilia costituiscono la parte della cellula sensoriale che per prima incontra gli odori e li lega attraverso i recettori olfattivi espressi sulla membrana. La motilità e la struttura delle cilia olfattive facilita la ricezione delle molecole odorose. Queste sono immerse in uno spesso strato di muco acquoso, secreto dalle ghiandole di Bowman, che ricopre la superficie dell'epitelio olfattivo. Il muco serve a proteggere l'epitelio dalla disidratazione e da temperature eccessive. Esso contribuisce a prevenire gli effetti dannosi dovuti ad agenti infettanti ed a particelle non infettanti. Facilita inoltre l'interazione delle molecole odorose con i recettori olfattivi presenti sulle cilia olfattive attraverso la mediazione di specifiche proteine leganti l'odore (odorant binding proteins, OBP). Queste proteine (Garibotti et al., 1997; Pelosi, 1998) infatti fungono da intermediari tra la molecola odorosa ed il recettore olfattivo permettendo il trasporto dell'odore nel mezzo acquoso in cui sono localizzate le cilia olfattive (Tegoni et al., 2000). Gli assoni dei sensoriali attraversano la lamina cribrosa dell'osso etmoide e unendosi in fasci si portano al bulbo olfattivo. Questi fasci di fibre sono avvolti da cellule gliali altamente specializzate dette *ensheating cells*, che svolgono un ruolo fondamentale nel processo di rigenerazione dei neuroni sensoriali olfattivi (Boyd et al., 2005).

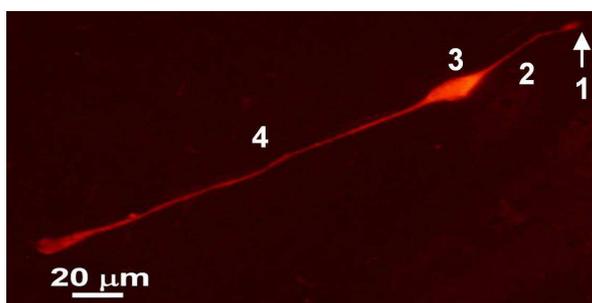


Figura 3. Immagine di neurone sensoriale olfattivo. Neurone sensoriale olfattivo in coltura marcato con anticorpi *anti-olfactory marker protein* (OMP), una proteina espressa da tutti i neuroni sensoriali olfattivi maturi. Si può notare la caratteristica morfologia bipolare. 1) knob da cui si dipartono le cilia (non visibili a questo ingrandimento); 2) dendrita; 3) corpo cellulare; 4) assone. Immagine prodotta nel laboratorio Lodovichi.

Le **cellule sustentacolari** di sostegno sono cellule non neuronali ed hanno il duplice ruolo di cellule epiteliali e gliali di supporto. Queste cellule sono responsabili del supporto trofico ai neuroni sensoriali olfattivi e del loro isolamento elettrico (Breipohl et al., 1974). Nell'epitelio adulto mediano la secrezione di fattori di crescita (neuropeptide Y) responsabili della proliferazione delle cellule basali (Hansel et al., 2001). Queste cellule inoltre secernono nel muco enzimi detossificanti, catabolizzando in questo modo composti chimici organici ed altre sostanze potenzialmente dannose per l'integrità del tessuto (Minn et al., 2002; Ding e Dahl, 2003; Mori et al., 2005).

Le **cellule basali**. Due tipi di cellule basali sono state descritti in studi di microscopia elettronica: 1) le cellule basali piatte; 2) le cellule basali globose.

1) le cellule basali piatte con citoplasma scuro, che rappresentano le cellule basali propriamente dette e si appoggiano direttamente sulla membrana basale. Queste rappresentano le cellule staminali che si dividono per dar luogo ai precursori dei sensoriali (Calof e Chikaraishi, 1989).

2) le cellule basali globose, di forma più chiaramente sferica con citoplasma chiaro. Esse sono poste al di sopra delle cellule basali piatte. Si ritiene che questo tipo di cellule basali si divida rapidamente per dar luogo a precursori dei neuroni sensoriali a seguito di stress acuti quali assotomia o eliminazione del bulbo olfattivo (Carr e Farbman, 1992).

1.3 Il bulbo olfattivo

Il bulbo olfattivo (BO) è una formazione specializzata del prosencefalo, deputata all'elaborazione degli stimoli sensoriali provenienti dai neuroni sensoriali olfattivi localizzati nell'epitelio. Si presenta come una struttura laminare concentrica composta da (dall'esterno verso l'interno): 1) lo strato del nervo olfattivo (ONL); 2) lo strato dei glomeruli (GL); 3) lo strato plessiforme esterno (EPL); 4) lo strato delle cellule mitrali (MCL); 5) lo strato plessiforme interno (IPL); 6) lo strato delle cellule dei granuli (GCL). Può essere considerato una stazione di ritrasmissione dove il segnale neurale viene processato e trasmesso alle stazioni cerebrali superiori (Figura 4 e 5) (Shepherd, 2004).

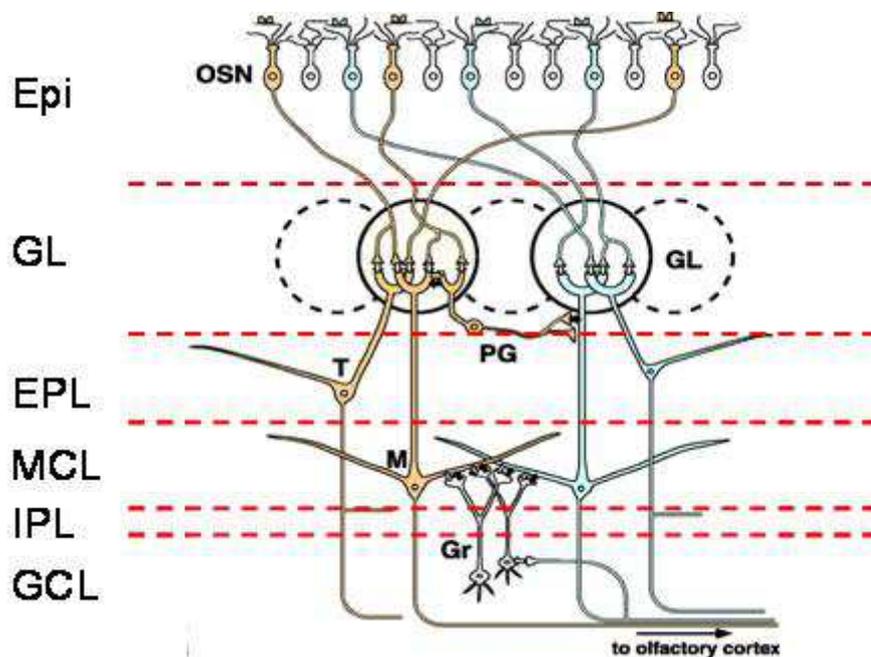


Figura 4. Rappresentazione schematica della circuiteria del bulbo olfattivo. Le principali componenti del bulbo olfattivo: i neuroni sensoriali olfattivi (OSN), i glomeruli (GL), le cellule periglomerulari (PG), le cellule tufted (T), le cellule mitrali (M) e le cellule dei granuli (Gr). Epi = epitelio olfattivo; GL = strato dei glomeruli; EPL = strato plessiforme esterno; MCL = strato delle cellule mitrali; IPL = strato plessiforme interno; GCL = strato delle cellule dei granuli. Immagine modificata da Mori et al., 1999.

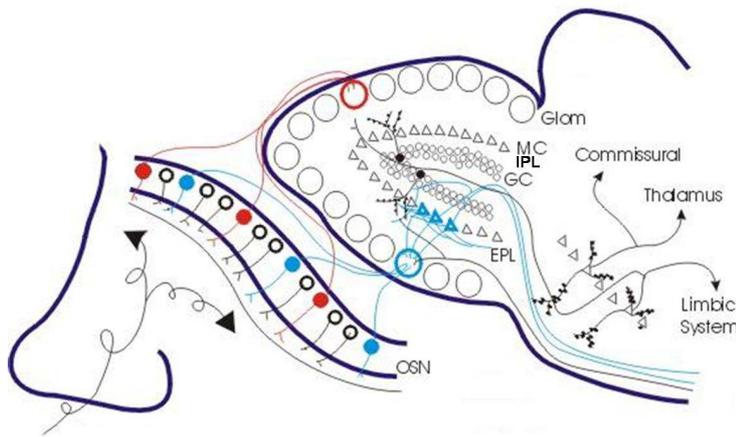


Figura 5. Rappresentazione schematica dell'organizzazione del sistema olfattivo. Organizzazione anatomica del bulbo olfattivo con le principali componenti e strati. I neuroni sensoriali olfattivi (OSN), i glomeruli (Glom), lo strato plessiforme esterno (EPL), le cellule mitrali (MC), lo strato plessiforme interno (IPL), le strato delle cellule dei granuli (GC) e le efferenze principali. Immagine modificata da Case Western Reserve University.

Anche nel bulbo olfattivo, come già osservato per l'epitelio, esiste un'alta plasticità sinaptica, legata al continuo rigenerarsi di determinate popolazioni neuronali (Lois e Alvarez-Buylla, 1994), che continua per tutta la vita dell'individuo (vedi oltre).

Già dagli studi classici con il metodo dell'impregnazione argentea (metodica messa a punto da Camillo Golgi verso la fine del 1800) Ramon y Cajal descrisse gli elementi cellulari del bulbo olfattivo e la loro distribuzione in strati (Figura 6). Tali risultati sono stati poi confermati ed estesi da studi moderni che si sono avvalsi di metodiche quali ingegneria genetica e marcatura intracellulare. Come in altre regioni cerebrali, nel bulbo olfattivo gli elementi neuronali si dividono in 3 categorie: 1) i neuroni afferenti (input); 2) i neuroni efferenti (output); 3) i neuroni intrinseci (Shepherd, 2004).

1. Neuroni afferenti (input) . Le afferenze sono costituite dagli assoni dei neuroni sensoriali, i cui corpi cellulari sono localizzati nell'epitelio nasale (vedi sopra).

Il bulbo olfattivo riceve inoltre molteplici afferenze: 1. dalla corteccia olfattoria; 2. dal nucleo olfattorio anteriore; 3. dal setto orizzontale limbico della banda diagonale dei centri colinergici basali (*basal forebrain*); 4. dal nucleo serotoninergico del rafe (Shepherd, 2004).

2. I neuroni efferenti. Le vie efferenti (output) del bulbo olfattivo sono rappresentate dagli assoni delle cellule mitrali e delle cellule tufted, i cui corpi cellulari sono posti in specifiche posizioni nel bulbo olfattivo.

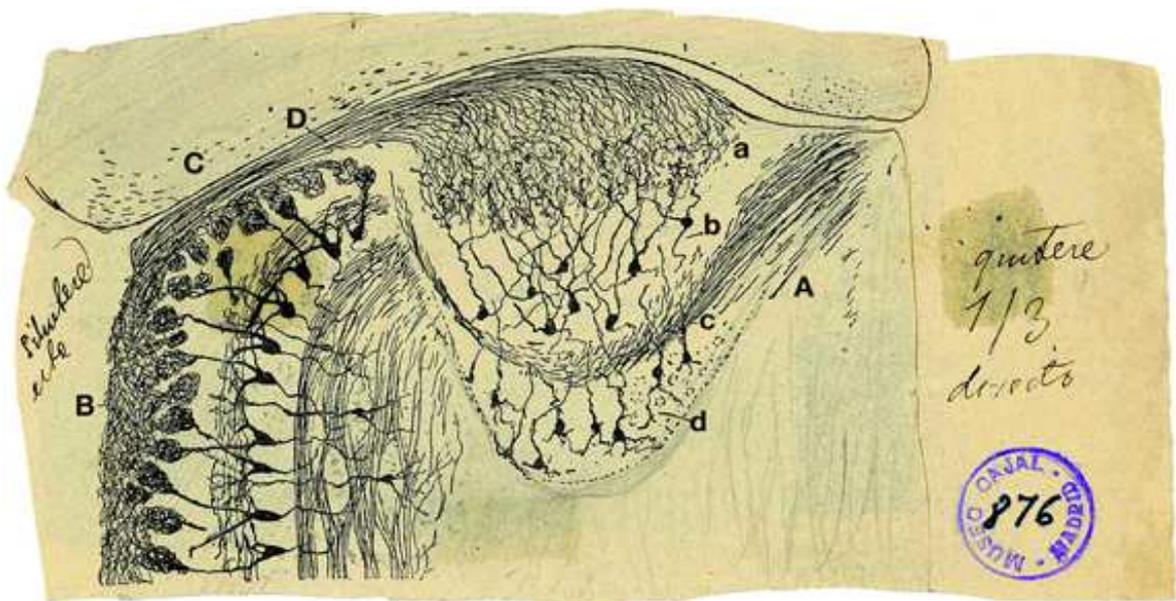


Figura 6. Disegno originale di Ramon y Cajal raffigurante il bulbo olfattivo di un topo di 20 giorni. Disegno originale dell'anatomia del bulbo olfattivo realizzato da con il metodo di Golgi o dell'impregnazione argentea su sezioni orizzontali di bulbo. A) bulbo accessorio; B) bulbo olfattivo principale; C) corteccia; D) organo vomeronasale; a) strato dei glomeruli; b) strato delle mitrali e delle tufted; c) fibre del tratto olfattorio laterale; d) cellule dei granuli. Immagine modificata da Ramon y Cajal, 1901.

Le **cellule mitrali (CM)** sono poste nello strato delle cellule mitrali, sito 200-400 μm in profondità rispetto allo strato dei glomeruli. Presentano un corpo cellulare (15-30 μm di diametro) di forma pressapoco triangolare dal cui apice emerge un dendrita principale, non ramificato, che attraversa lo strato plessiforme esterno (EPL) e si arborizza in un ciuffo (*tuft*, 80-150 μm) all'interno di un singolo glomerulo. Sono presenti inoltre molteplici dendriti laterali secondari che si irradiano nello strato plessiforme esterno per una lunghezza notevole (200-800 μm a seconda dell'angolo che formano nello strato plessiforme esterno). I dendriti delle cellule mitrali non hanno spine, caratteristica analoga ai motoneuroni, e che li distingue dai neuroni piramidali corticali. L'assone è posto ventralmente rispetto al dendrita apicale primario e scorre caudalmente per poi

formare il tratto olfattorio laterale (LOT). All'interno del bulbo olfattivo questi assoni danno luogo a collaterali che rimangono nello strato delle cellule dei granuli e dello strato plessiforme interno (Ojima et al., 1984). Dal punto di vista fisiologico si caratterizzano per essere neuroni eccitatori utilizzando principalmente glutammato come neurotrasmettitore (Liu et al., 1989).

Le **cellule tufted** hanno morfologia simile alle cellule mitrali ma differiscono per la localizzazione del corpo cellulare, non ristretta ad un unico strato, ma diffusa a vari livelli nello strato plessiforme esterno. Nel corso degli anni la nomenclatura dei differenti sottotipi si è fatta più ricca, ma nel corso della nostra trattazione faremo riferimento ai tre gruppi principali in base alla loro localizzazione (Ramon y Cajal, 1955; Macrides & Schneider, 1982; Hayar et al., 2004).

La popolazione più numerosa, le cellule tufted mediane (Tm), sono situate a metà dello strato plessiforme esterno. Hanno un corpo cellulare di dimensione leggermente minore (15-20 μm) rispetto alle cellule mitrali, posseggono svariati dendriti basali (lunghezza media 300-600 μm) e un singolo dendrita apicale primario che termina in un tuft all'interno di un unico glomerulo. Gli assoni danno luogo a collaterali che permangono all'interno dello strato plessiforme interno (IPL) e poi si uniscono a formare il tratto olfattorio laterale, per proiettare alle stazioni cerebrali successive.

Le cellule tufted esterne (Te), presentano un'arborizzazione dendritica caratteristica (Antal et al., 2006). Il corpo cellulare è localizzato al margine tra lo strato dei glomeruli e la porzione più superficiale dello strato plessiforme esterno. Queste cellule inviano le ramificazioni collaterali dei propri assoni all'interno dello strato dei granuli e dello strato plessiforme interno dando luogo al sistema associativo intrabulbare (*intra-bulbar associational system*) (Schoenfeld et al. 1985; Belluscio et al., 2002; Lodovichi et al., 2003). Alcune cellule tufted esterne non proiettano al di fuori del bulbo, ma il loro assone rimane all'interno del bulbo olfattivo, come quelle che partecipano al sistema associativo intrabulbare, e sono pertanto definite neuroni intrinseci. Alcuni sottotipi di cellule tufted esterne invece inviano il loro assone all'interno del tratto olfattorio laterale, per proiettare a stazioni al di fuori del bulbo.

Le cellule tufted interne (Ti) presentano una morfologia e una distribuzione simile alle cellule mitrali già precedentemente menzionate.

Sia le cellule mitrali che le tufted si sviluppano nel corso del periodo embrionale e completano la loro maturazione nella prima decade postnatale. In una fase iniziale presentano un dendrita apicale ramificato che si estende a molteplici glomeruli. Nel corso dello sviluppo i dendriti apicali soprannumerari vengono eliminati e viene mantenuto solo un singolo dendrita apicale che si estende e ramifica dentro un unico glomerulo (Malun and Brunjes, 1996; Treolar et al., 1999; Lin et al., 2000).

I neuroni intrinseci sono: 1) le cellule periglomerulari (PG); 2) le cellule dei granuli (CG).

Le **cellule periglomerulari** sono costituite da svariati tipi cellulari: le cellule periglomerulari, le cellule ad assone corto e le cellule tufted esterne.

Le **cellule periglomerulari** sono localizzate attorno ai glomeruli. Il diametro di queste cellule è di soli 6-8 μm , sono tra i neuroni più piccoli del cervello. Ogni cellula periglomerulare possiede un corto dendrita cespuglioso che si arborizza (per un estensione di 50-100 μm) all'interno di un singolo glomerulo (Pinching and Powell, 1971; Hayar et al., 2004). Cellule periglomerulari "*bi-tufted*", vale dire dotate di una duplice arborizzazione del dendrita apicale, che estendono i loro dendriti in due distinti glomeruli sono rare. L'assone delle cellule periglomerulari si estende lateralmente per una distanza equivalente a circa 5 glomeruli. Alcune periglomerulari sono sprovviste di assone. Morfologicamente appaiono una popolazione omogenea, ma da un punto di vista biochimico si possono distinguere molteplici sottopopolazioni in base al neurotrasmettitore usato. Le periglomerulari possono esprimere dopamina, acido γ -amminobutirrico (GABA) oppure glicina. In taluni casi la stessa cellula può co-esprimere GABA e dopamina. Questi neurotrasmettitori sono ritenuti avere prevalentemente un ruolo inibitorio. Tuttavia il ruolo della dopamina è ancora altamente controverso, in quanto potrebbe operare sia come neurotrasmettore inibitorio sia come neurotrasmettore eccitatorio.

A differenza delle cellule mitrali e tufted che si sviluppano solo nel corso del periodo prenatale e non rigenerano (sono come la maggior parte dei neuroni, cellule permanenti), le periglomerulari rigenerano di continuo per tutta la durata della vita dell'individuo (Frazer-Cierpal and Brunjes, 1989). Le periglomerulari originano da precursori posti nella zona sub-ventricolare intorno ai ventricoli laterali. Migrano

attraverso la stria migratoria rostrale e arrivano in questo modo al bulbo olfattivo. Qui si differenziano in neuroni periglomerulari e si inseriscono nella circuiteria bulbare.

Le **cellule ad assone corto**, poste in prossimità dei glomeruli, si caratterizzano per avere dimensioni maggiori rispetto alle cellule periglomerulari, assimilabile a quelle delle cellule tufted esterne (8-12 μm). L'assone si estende per un tratto maggiore rispetto all'assone delle piccole periglomerulari. I dendriti arborizzano nello spazio interglomerulare. Da un punto di vista biochimico sono ritenute essere glutamatergiche.

Le **cellule tufted esterne**, di cui abbiamo parlato sopra.

Le **cellule dei granuli (CG)**, poste nello strato delle cellule dei granuli, costituito prevalentemente dalle cellule stesse e da una scarsa popolazione di cellule ad assone corto. Le cellule dei granuli sono interneuroni inibitori. Morfologicamente sono cellule di piccole dimensioni (diametro di circa 6-8 μm), prive di assone e raggruppate in clusters all'interno dello strato dei granuli, posto al centro del bulbo olfattivo (Figura 4 e 5). Posseggono un dendrita apicale che proietta verso lo strato plessiforme esterno. Il dendrita apicale si ramifica in molteplici dendriti secondari, che si biforcano ulteriormente, contribuendo a formare un'estesa e complessa arborizzazione dendritica nello strato plessiforme esterno. Dal corpo cellulare si dipartono inoltre i dendriti basali che si ramificano nello strato plessiforme interno. I dendriti sono provvisti di spine. Possiamo individuare tre tipi differenti di cellule dei granuli in base alla localizzazione del corpo cellulare: 1) cellule dei granuli superficiali; 2) cellule dei granuli intermedie, 3) cellule dei granuli profonde (Orona et al., 1983; Schoenfeld et al. 1985).

1) Le cellule superficiali posseggono dendriti periferici che ramificano essenzialmente nella parte più superficiale dello strato plessiforme esterno, stabilendo contatti sinaptici dendro-dendritici soprattutto con i dendriti laterali delle cellule tufted esterne.

2) Le intermedie posseggono dendriti che invece ramificano a qualsiasi livello all'interno dello strato plessiforme esterno.

3) Le cellule *profonde*, proiettano i propri dendriti nello strato profondo dello strato plessiforme esterno, stabilendo contatti dendro dendritici con i dendriti laterali delle cellule mitrali.

Analogamente alle periglomerulari, anche le cellule dei granuli si rigenerano continuamente nel corso della vita dell'individuo, a partire da precursori posti nella

zona sub-ventricolare dei ventricoli laterali (Kishi, 1987; Kelsch et al., 2010). Da un punto di vista biochimico le cellule dei granuli sono neuroni inibitori, che esprimono GABA.

1.4 Il glomerulo

I glomeruli (Figura 7) sono strutture pressapoco sferiche di neuropilo (dimensione compresa tra i 50 ed i 200 μm , a seconda della specie animale considerata, nei topi ad esempio sono di circa 80-100 μm), costituiti dalla convergenza degli assoni dei neuroni sensoriali che esprimono lo stesso recettore olfattivo (circa 3000) e dai dendriti apicali delle cellule mitrali e tufted (Shafa e Meisami 1977; Mori et al., 1999) (Figura 8). Essi sono circondati dai processi delle cellule periglomerulari che formano sinapsi all'interno del glomerulo e da cellule gliali.

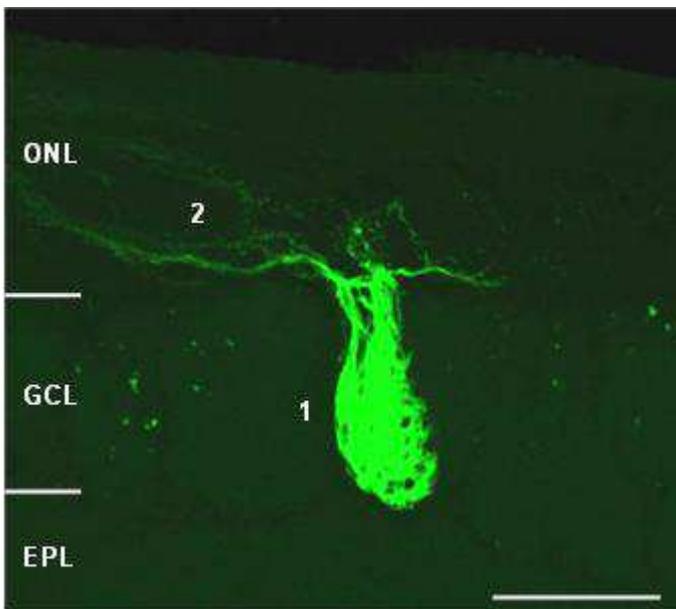


Figura 7. Immagine di un glomerulo M71-GFP. Sezione orizzontale di bulbo olfattivo (spessore 60 μm) con evidenziato il glomerulo mediale M71-GFP. 1 = glomerulo GFP; 2 = assoni GFP positivi dei neuroni sensoriali M71-GFP. ONL = strato del nervo olfattivo; GCL = strato dei glomeruli; EPL = strato plessiforme esterno. Barra = 200 μm . Immagine proveniente dal laboratorio Lodovichi.

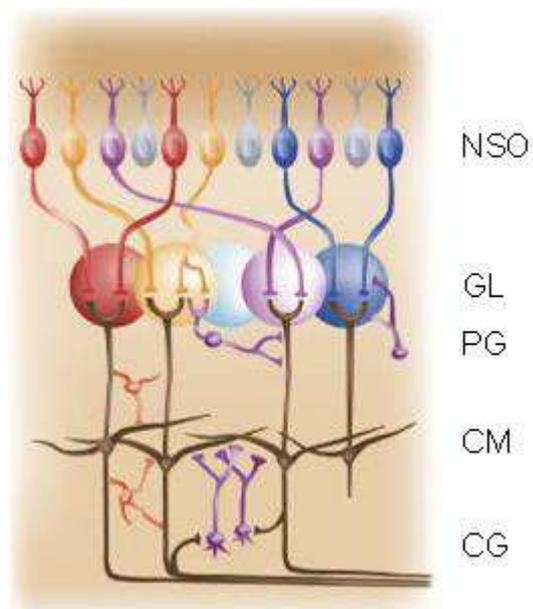


Figura 8. Organizzazione glomerulare del bulbo olfattivo. Ogni glomerulo risulta dagli input convergenti assonali dei neuroni sensoriali olfattivi (NSO) esprimenti lo stesso recettore odoroso. All'interno di ogni glomerulo (GL) gli assoni dei sensoriali stabiliscono sinapsi con i dendriti primari delle cellule mitrali (CM), delle cellule tufted e con le cellule periglomerulari (PG). Sui dendriti laterali delle cellule mitrali poi vanno a fare sinapsi inibitorie le cellule dei granuli (CG). Immagine modificata da Lledo et al., 2008.

Uno degli elementi caratterizzanti il glomerulo maturo è la sua omogeneità relativamente alle fibre che lo costituiscono: è formato esclusivamente da assoni di neuroni sensoriali olfattivi che esprimono lo stesso recettore olfattivo. Questo lo definisce come un'unità funzionale volta a processare le informazioni sensoriali rilevate da un dato recettore olfattivo. Questo tipo di struttura glomerulare ha enorme importanza sia per l'organizzazione topografica che per l'elaborazione dell'informazione sensoriale. Sin dai primi studi (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994) emerse chiaramente che il recettore non è deputato esclusivamente a rilevare gli odori ma gioca un ruolo chiave nella organizzazione del sistema olfattivo, come dimostrato anche da molti studi successivi (Wang et al., 1998; Mombaerts et al., 1996; Barnea et al., 2004; Strottmann et al., 2004; Imai et al., 2006; Maritan et al., 2009). Nelle prime fasi dello sviluppo tuttavia il glomerulo non ha una organizzazione omogenea, ma eterogenea, presenta infatti fibre che esprimono recettori olfattivi diversi. Attraverso un successivo processo di riorganizzazione si arriva alla struttura del glomerulo maturo (Zou et al., 2009, Royal e Key, 1999).

Nel topo sono presenti circa 1800 glomeruli per ogni bulbo olfattivo. All'interno di ogni glomerulo gli assoni dei neuroni sensoriali formano sinapsi con un determinato contingente (numero compreso tra 20 e 50) di cellule mitrali e tufted (Royet et al., 1998). Le cellule mitrali e tufted infatti estendono il loro unico dendrite apicale esclusivamente all'interno di un dato glomerulo.

A livello dello strato glomerulare sono presenti connessioni che si definiscono intraglomerulari, se appartengono al medesimo glomerulo, oppure interglomerulari se si realizzano tra glomeruli diversi (Shepherd et al., 2004).

I neuroni sensoriali realizzano sinapsi asso-dendritiche con i *tufts* dendritici delle cellule mitrali/tufted e con le periglomerulari (Pinching and Powell, 1971). Inoltre le cellule mitrali e tufted realizzano sinapsi dendro-dendritiche con le cellule periglomerulari.

In aggiunta alle connessioni di tipo intraglomerulare possiamo osservare anche connessioni interglomerulari, infatti oltre ai corpi cellulari delle periglomerulari, nell'intercapedine tra un glomerulo e quello adiacente hanno luogo numerose connessioni sinaptiche. 1) Gli assoni delle periglomerulari stabiliscono contatti sinaptici con corpi cellulari e dendriti di altre cellule periglomerulari e con il dendrite apicale primario delle cellule mitrali e tufted; 2) collaterali delle cellule tufted formano sinapsi con i dendriti apicali; 3) sinapsi relative a fibre centrifughe di vario tipo (Shepherd et al., 2004).

Lo strato plessiforme esterno è un ulteriore sito di contatti sinaptici volti a modulare le afferenze sensoriali. Il tipo predominante di contatto sinaptico nello strato plessiforme esterno è la sinapsi dendro-dendritica tra i dendriti laterali delle cellule mitrali/tufted ed i dendriti prossimali delle cellule dei granuli (Shepherd, 1994; Schoppa et al., 1998).

Il glomerulo risulta costituito dalle connessioni sinaptiche tra gli assoni dei neuroni sensoriali esprimenti un dato recettore olfattivo ed i dendriti delle cellule post-sinaptiche (mitrali e tufted) che estendono il loro dendrite apicale esclusivamente dentro un dato glomerulo, a cui si aggiungono i contatti sinaptici con le cellule periglomerulari e le cellule dei granuli. Questa struttura, che costituisce l'unità funzionale elementare del bulbo olfattivo, definisce a sua volta una struttura più estesa, definita **colonna odorosa**, e data dal glomerulo, dalle cellule post-sinaptiche e dalle cellule dei granuli ad esso connesse.

Il glomerulo e la corrispondente colonna odorosa sono pertanto la "struttura funzionale" in cui l'informazione sensoriale viene integrata e modulata (Figura 9).

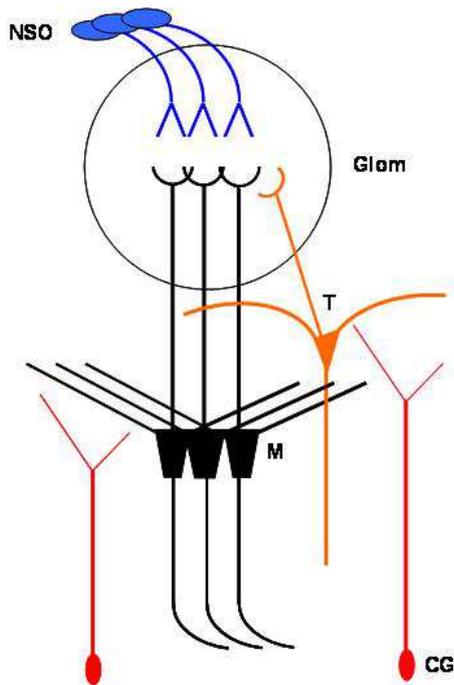


Figura 9. Rappresentazione schematica della colonna odorosa. La colonna odorosa rappresenta l'unità funzionale base che si ripete per il numero totale di glomeruli (circa 1800 nel topo). La colonna odorosa è definita da ciascun glomerulo e dalle cellule connesse ad esso. In particolare, il glomerulo risulta dalla convergenza degli assoni dei neuroni sensoriali olfattivi (NSO) esprimenti lo stesso recettore odoroso. All'interno di ogni glomerulo (GL) gli assoni dei neuroni sensoriali stabiliscono sinapsi con i dendriti primari delle cellule mitrali (M) e delle cellule tufted (T). I dendriti laterali delle cellule mitrali e delle cellule tufted formano sinapsi dendro- dendritiche con le cellule dei granuli (CG). Il glomerulo risulta inoltre circondato dalle cellule periglomerulari che formano contatti sinaptici sia con gli assoni dei neuroni sensoriali olfattivi, sia con i dendriti delle cellule postsinaptiche.

1.5 Il recettore olfattivo

Il recettore olfattivo appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) (Buck and Axel, 1991). I recettori olfattivi dei vertebrati condividono talune caratteristiche comuni alle altre GPCRs: 1) una regione codificante mancante di sequenze introniche; 2) una struttura che prevede 7 domini ad alfa-elica transmembranari (7TM) collegati da loops intra- ed extra-cellulari di lunghezza variabile; 3) una sequenza aspartato-arginina-tirosina (DRY) conservata all'interno del secondo loop intracellulare (Spehr e Munger, 2009). Una volta tradotta, la sequenza da vita ad una proteina pari a 300-350 amminoacidi (Figura 10).

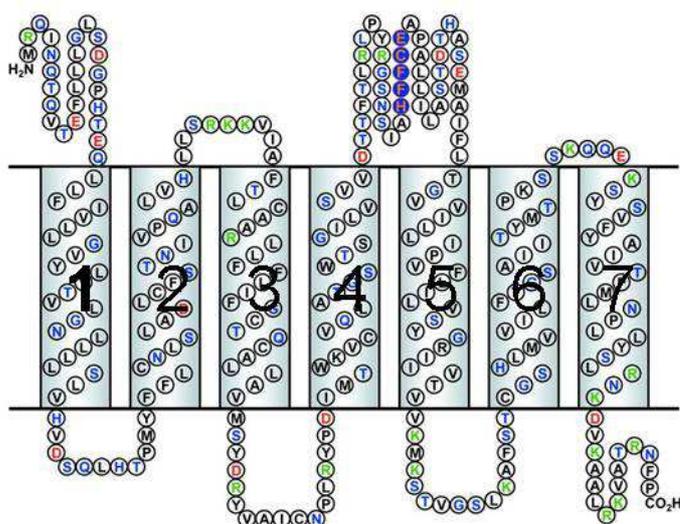


Figura 10. Rappresentazione schematica della struttura del recettore olfattivo. I residui idrofobici sono in nero, i residui polari in verde, i residui caricati positivamente in blu e quelli carichi negativamente in rosso. I residui leganti lo ione metallico sono in arancione su sfondo rosso. Immagine modificata da Wang et al., 2002.

Nei mammiferi i recettori olfattivi sono codificati da una famiglia multigenica costituita da circa 1000 geni, risultando così la più grande famiglia genica codificante per *G-protein* e probabilmente la più numerosa famiglia genica dell'intero genoma (Mombaerts, 2001).

I geni per i recettori olfattivi del topo sono perlopiù organizzati in clusters (in numero superiore ai 50, localizzati su tutti i cromosomi esclusi il 18 e Y), di dimensione variabile e dispersi senza ordine apparente all'interno del genoma (Zhang and Firestein, 2002; Godfrey et al., 2004; Niimura e Nei, 2005). E' stata dimostrata anche l'esistenza di alcuni geni isolati all'interno del genoma (Godfrey et al., 2004; Malnic et al., 2004). Nei mammiferi il numero di recettori funzionalmente attivi è variabile in numero, da più di 1000 nei roditori ai 350 degli esseri umani, dove sono presenti in gran numero pseudogeni (63-70%) che esprimono recettori funzionalmente non attivi (Rouquier et al., 1998). Questa differenza nel numero dei pseudogeni si traduce in un repertorio di recettori olfattivi funzionalmente attivi triplo nel topo rispetto all'uomo (Young e Trask, 2002; Young et al., 2002).

I recettori olfattivi possono essere suddivisi in sottofamiglie in base al grado di omologia delle sequenze codificanti, che può variare dal 40% a più del 90%. Evidenze sperimentali suggeriscono che membri appartenenti alla stessa famiglia riconoscano le medesima struttura odorosa (Buck e Axel, 1991).

Analisi di sequenza dei recettori olfattivi e studi di modeling tridimensionale hanno permesso di stabilire che, nonostante posseggano la stessa struttura generale a 7 domini transmembrana, presentano differenze nella sequenza amminoacidica in particolar modo in tre regioni. I segmenti transmembranari III, IV e V infatti divergono in maniera cospicua, e sono responsabili della formazione della tasca, putativo sito di legame per il ligando olfattivo (Pilpel and Lancet, 1999; Mombaerts, 2004).

Ogni neurone sensoriale olfattivo esprime un unico tipo di recettore olfattivo dando luogo alla regola: un recettore olfattivo – un neurone. Questo dato è stato inizialmente formulato in seguito ai risultati ottenuti con esperimenti di ibridazione *in situ* verso sequenze codificanti per i recettori olfattivi (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993) in cui si osservò che le sonde ibridavano un numero molto ristretto (< 0.1 %) di cellule rispetto all'intera popolazione di olfattivi (Nef et al., 1992; Strottmann 1994; Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993).

Questi studi sono stati poi confermati da esperimenti di *reverse transcribed – polymerase chain reaction* (RT-PCR) su singolo neurone sensoriale olfattivo, con i quali si è dimostrato che il recettore olfattivo è codificato da un solo allele (Chess et al., 1994).

L'espressione di un unico tipo di recettore olfattivo per cellula sembra essere garantita dalla espressione monoallelica dei geni codificanti i recettori olfattivi (Chess et al.,

1994). Chess et al. (1994) hanno inoltre osservato che gli alleli codificanti per i recettori olfattivi venivano replicati in modo asincrono, un fenomeno che si verifica in genere in casi di inattivazione di uno dei due alleli. Essi proposero quindi un modello di inattivazione di uno dei due alleli e la trascrizione dei geni codificanti da un unico allele. Questo meccanismo garantirebbe l'espressione di un solo tipo di recettore per ogni neurone sensoriale.

Una volta trascritta e tradotta, la proteina del recettore olfattivo viene espressa in membrana e impedisce che ulteriori recettori vengano trascritti. Questo processo si realizza attraverso un meccanismo di feed-back negativo assicurato dal recettore funzionante ed espresso in membrana. Viceversa nel caso in cui il recettore tradotto non risulti funzionante, esso non sarà in grado di mandare un segnale inibitorio al nucleo che pertanto provvederà a trascrivere un nuovo recettore olfattivo. Questo garantisce che ogni neurone esprima un unico recettore funzionante (Serizawa et al., 2003; Lewcock e Reed 2004; Shykind et al., 2004).

1.6 Trasduzione dello stimolo sensoriale olfattivo

Quando una molecola odorosa si lega al recettore olfattivo inizia una sequenza di eventi denominata cascata di trasduzione di segnale, in cui il segnale chimico di legame è convertito in un segnale elettrico che viene inviato al bulbo olfattivo. La distribuzione cellulare dei recettori nel neurone sensoriale olfattivo è stata resa possibile attraverso l'uso di anticorpi diretti contro uno specifico recettore. Attraverso questo approccio sperimentale è stato possibile stabilire che il recettore olfattivo è localizzato sulle ciglia del neurone sensoriale, dove ha inizio la trasduzione del segnale (Menco et al., 1997; Schwarzenbacher et al., 2005).

In seguito al legame della molecola odorosa con il recettore si ha l'attivazione di una proteina G eterotrimerica stimolatoria (Golf) con susseguente attivazione dell'adenilato ciclasi (AC) di tipo III (ACIII) che catalizza la conversione dell'adenosin-trifosfato (ATP) in adenosin-monofosfato ciclico (cAMP), una molecola chiave nel processo di trasduzione di segnale (Lowe et al., 1989). Il cAMP a sua volta, lega e attiva uno specifico canale ionico, il *cyclic nucleotide gated (CNG) channel*, con conseguente ingresso di ioni Na^+ e Ca^{2+} . In virtù della concentrazione basale di cAMP intracellulare

di poco sotto la soglia di attivazione dei canali CNG, anche piccoli aumenti della sua concentrazione provocano l'ingresso di Ca^{2+} (Pun and Kleene, 2003). L'aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare (dovuto all'attivazione dei canali CNG) provoca a sua volta l'apertura del canale al Cl^- - Ca^{2+} dipendenti, ANO2, presenti in membrana con l'amplificazione della corrente depolarizzante (Kleene and Gesteland, 1991; Stephan et al., 2009). Generalmente i canali ionici per il Cl^- tendono a mediare un segnale inibitorio, in quanto la normale differenza di concentrazione tra i due lati della membrana plasmatica media delle correnti *inward* con conseguente iperpolarizzazione del potenziale di membrana. I neuroni sensoriali olfattivi mantengono un'inusuale elevata concentrazione di Cl^- intracellulare, in questo modo una volta attivati i canali Cl^- Ca^{2+} dipendenti, provocano la formazione di una corrente Cl^- volta all'esterno, aumentando l'entità della depolarizzazione (Lowe and Gold, 1993). Quando l'entità della depolarizzazione supera la soglia si ha la formazione di un potenziale d'azione che si propaga per tutta la lunghezza del neurone sensoriale olfattivo (Figura 11).

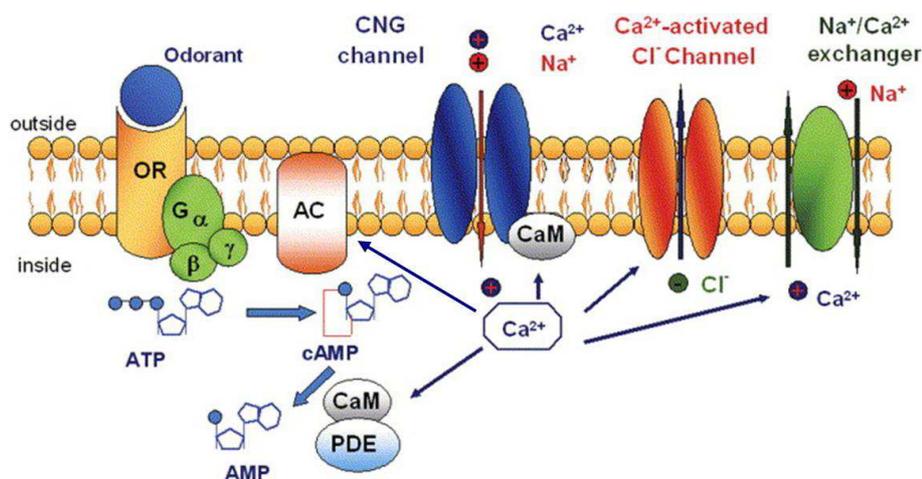


Figura 11. Schema della trasduzione del segnale olfattivo a seguito di attivazione del recettore olfattivo. Il legame della molecola odorosa stimola la produzione di cAMP, il quale a sua volta attiva i canali CNG che diventano permeabili agli ioni Na^+ e Ca^{2+} . L'aumento della concentrazione di Ca^{2+} determina l'apertura dei canali al Cl^- Ca^{2+} - dipendenti, i quali amplificano la depolarizzazione. Il Ca^{2+} intracellulare inoltre si lega alla calmodulina (CaM), abbassando così sensibilità del ligando per i canali regolati da cAMP (Canali CNG). La Ca^{2+} calmodulina inoltre inibisce la attività della adenilato ciclasi e stimola l'attività delle fosfodiesterasi (PDE). Il Ca^{2+} viene poi espulso da uno scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. OR = recettore olfattivo. $G_{\alpha,\beta,\gamma}$ = subunità proteina G accoppiata al recettore. AC = adenilato ciclasi. cAMP = adenosin-monofosfato-ciclico. ATP = adenosin-trifosfato. AMP = adenosin-monofosfato. CNG = (canale) attivato da nucleotidi ciclici. Immagine modificata da Pifferi et al., 2006.

Il Ca^{2+} ha un doppio ruolo nei neuroni sensoriali olfattivi (Matthews e Reisert, 2003):
1) esso agisce come secondo messaggero eccitatorio amplificando la risposta intracellulare innescata dalla attivazione del recettore olfattivo in risposta a un odore (vedi sopra); 2) esercita il ruolo di secondo messaggero inibitorio determinando la fine della risposta evocata da un odore, contribuendo quindi al processo di adattamento agli odori.

Il Ca^{2+} determina la fine della risposta agli odori e quindi partecipa al processo di adattamento agendo su due target principali: 1) i canali CNG; 2) gli altri compartimenti cellulari.

Gli elevati livelli di Ca^{2+} che si creano nei neuroni sensoriale olfattivi dopo stimolazione con gli odori riducono la sensibilità dei nucleotidi ciclici per i canali CNG, interagendo con essi attraverso il complesso formato da Ca^{2+} e proteina chinasi Calmodulina M.

Il processo di adattamento coinvolge anche altri elementi. In primis è noto essere coinvolta la adenilato ciclasi di tipo III, che viene inattivata attraverso fosforilazione mediata dal complesso Ca-Calmodulina M. In particolare si è visto che il ruolo di ACIII diventa preponderante in risposta a stimolazione odorosa prolungata.

E' inoltre possibile che il Ca^{2+} possa indurre la terminazione della risposta agli odori agendo sull'idrolisi del cAMP, attivando le fosfodiesterasi (enzimi deputati all'idrolisi dei nucleotidi ciclici) mediante un meccanismo ancora una volta Ca^{2+} dipendente (Borisy et al., 1992).

1.7 Il codice combinatoriale

Il sistema olfattivo ha un'enorme capacità di percepire e discriminare migliaia di odori presenti nell'ambiente anche a bassissime concentrazioni. Gli odori sono molecole organiche di basso peso molecolare (generalmente inferiore ai 400 Da), che si differenziano per una serie di parametri quali: dimensione, forma, gruppo funzionale e carica.

Quali sono le modalità di interazione del recettore olfattivo con gli odori tali da poter raggiungere un così sofisticato grado di sensibilità?

Lo studio effettuato da Malnic et al. (1999), combinando Ca^{2+} imaging e RT-PCR su singolo neurone sensoriale, ha dato un contributo fondamentale alla comprensione di come i recettori olfattivi interagiscano con le molecole odorose. In particolare, i neuroni sensoriali dissociati, *in vitro*, venivano caricati con indicatori per il Ca^{2+} (Fura-2-AM) ed esposti ad una serie di sostanze odorose (molecole alifatiche a catena lineare a 4 oppure 9 atomi di carbonio, C4-C9).

Una volta accertata la responsività all'odore, ne venivano amplificati i cDNA derivanti dagli mRNA totali presenti nel neurone sensoriale (RT-PCR) e questi venivano utilizzati per identificare il recettore olfattivo espresso dal neurone responsivo (Malnic et al., 1999). I risultati ottenuti hanno poi dimostrato che un singolo recettore olfattivo può legare vari odori, e un odore può legarsi a più recettori. Questo schema di interazione odore – recettore è stato definito “codice combinatoriale”. Questa modalità di interazione amplifica notevolmente le capacità percettive e discriminative del sistema olfattivo (Figura 12).

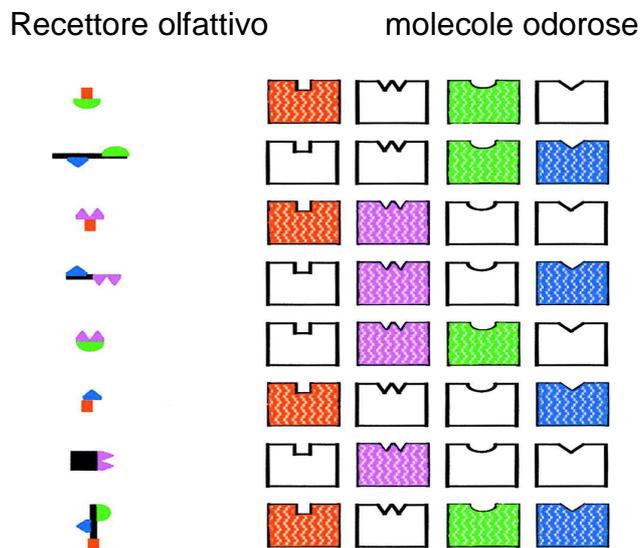


Figura 12. Schema del codice combinatoriale. In questo modello ogni recettore olfattivo, indicato dai simboli della colonna a sinistra è in grado di riconoscere e legare diversi odori, indicati nelle 4 colonne di simboli a sinistra. Immagine modificata da Malnic et al., 1999.

Ciascun recettore olfattivo presenta affinità diversa per i suoi vari ligandi, cosicché aumentando la concentrazione di un dato odore aumenta il numero di recettori a cui questo può legarsi.

Sebbene i recettori olfattivi siano stati identificati nel 1991 per lungo tempo i ligandi specifici sono rimasti sconosciuti oppure limitati a pochi recettori (Araneda et al., 2000; Zhang e Firestein, 2002; Bozza et al., 2002), data la difficoltà ad esprimere i recettori olfattivi in sistemi eterologhi. Se espressi in sistemi eterologhi (*human embryonic kidney* HEK 293T) i recettori olfattivi tendono a rimanere bloccati nel reticolo endoplasmatico e successivamente degradati dal proteasoma senza raggiungere la membrana. Pertanto la caratterizzazione dei pochi recettori olfattivi, è stata fatta utilizzando i neuroni sensoriali stessi (Araneda et al., 2000; Zhang e Firestein, 2002; Bozza et al., 2002).

Un contributo fondamentale è stato dato da Matsunami e collaboratori (Saito et al, 2004) i quali hanno identificato due proteine, RTP1 e RTP2, che permettono l'espressione dei recettori olfattivi funzionalmente attivi in membrana in sistemi eterologhi quali le cellule HEK.

I geni che codificano queste proteine sono espressi specificamente nei neuroni sensoriali olfattivi. Queste proteine interagiscono con i recettori olfattivi e da un punto di vista funzionale contribuiscono ad amplificare la risposta agli odori. I risultati ottenuti da Matsunami e collaboratori dimostrano che RTP1 e RTP2 giocano un ruolo chiave nella traslocazione dei recettori olfattivi sulla membrana plasmatica e nella risposta agli odori mediata dai recettori stessi. La scoperta di queste proteine ha pertanto permesso di esprimere i recettori olfattivi in sistemi eterologhi offrendo così la possibilità di identificare gli specifici ligandi per i diversi recettori olfattivi (Saito et al., 2004; Zhuang e Matsunami, 2007).

1.8 Organizzazione topografica

La specificità sinaptica tra i neuroni del sistema nervoso centrale è un elemento essenziale per il normale funzionamento del cervello. I sistemi sensoriali sono l'interfaccia tra gli organismi e il mondo esterno. Essi sono deputati a creare una rappresentazione interna del mondo circostante. Raggiungono questo scopo mediante la

segregazione spaziale delle afferenze sensoriali che contribuisce alla formazione di mappe topografiche. Una mappa topografica è pertanto una distribuzione spazialmente ordinata di un gruppo di neuroni che riflette a livelli cerebrali più alti, il pattern di segregazione spaziale delle afferenze sensoriali primarie. Per esempio, punti adiacenti nel campo visivo, attivano cellule gangliari adiacenti nella retina e questa relazione spaziale tra neuroni è mantenuta nelle stazioni cerebrali successive (Kaas 1997; McLaughlin e O'Leary, 2009). La mappa topografica permette di stabilire la localizzazione spaziale del segnale afferente e le sue caratteristiche.

Le prime testimonianze inerenti l'esistenza delle mappe sensoriali si ebbero da esperimenti effettuati sulla corteccia dei primati mediante stimolazione elettrica (Sherrington, 1917). Tuttavia dettagli e prove più convincenti si ebbero solamente con la realizzazione di microelettrodi di superficie per stimolazione ed utilizzando tecniche di registrazione più fini (Adrian, 1941; Talbot e Marshall, 1941).

Nel sistema nervoso dei vertebrati superiori le mappe topografiche sono comuni ed includono le mappe somatosensoriali corporee, le mappe tonotopiche per gli stimoli uditivi e le mappe visive per gli stimoli visivi.

Il sistema olfattivo differisce da questa rigorosa organizzazione spaziale (topografica) sotto vari aspetti.

1.9 Organizzazione topografica epitelio

L'epitelio olfattivo presenta solo una grossolana organizzazione topografica che si distingue dal preciso ordine spaziale con cui sono distribuiti i neuroni sensoriali nelle strutture periferiche di altre modalità, ad esempio la retina oppure la coclea. Questo mancata organizzazione spaziale in parte rispecchia anche la difficoltà di rappresentare nello spazio le caratteristiche fisico-chimiche dello stimolo sensoriale specifico, cioè le molecole organiche.

Come già menzionato precedentemente ogni singolo neurone sensoriale olfattivo esprime un unico tipo di recettore olfattivo in un repertorio di più di 1000 recettori olfattivi (Buck e Axel, 1991; Buck, 1992; Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993; Malnic et al., 1999; Serizawa et al., 2000; Michaloski et al., 2006).

Ma come si organizzano i neuroni sensoriali a livello dell'epitelio olfattivo? Esiste una regola che definisca la distribuzione spaziale dei neuroni sensoriali? Esperimenti di ibridazione *in situ* relativamente alla sequenza di specifici recettori olfattivi, hanno permesso di stabilire che neuroni sensoriali olfattivi esprimenti il medesimo recettore olfattivo sono localizzati in una zona ampia ma circoscritta dell'epitelio olfattivo. All'interno di ciascuna zona, i neuroni sensoriali esprimenti recettori olfattivi diversi sono tuttavia frammisti tra loro in modo pressoché casuale. In relazione ai dati ottenuti da questi esperimenti, l'epitelio è stato suddiviso in 4 zone, lungo l'asse dorso-ventrale (Vassar et al., 1993; Ressler et al., 1993; Strotmann et al., 1994). Studi recenti, pur confermando che un dato recettore olfattivo è espresso esclusivamente all'interno di una data zona, hanno mostrato che le zone sono distinte l'una l'altra in maniera meno netta rispetto a quanto ritenuto in passato, e che ogni neurone esprime un dato recettore olfattivo occupa un dominio caratteristico, circoscritto ma in parte sovrapposto rispetto ai domini in cui sono localizzati i neuroni sensoriali esprimenti recettori olfattivi diversi (Figura 13) (Iwema et al., 2004; Miyamichi et al., 2005).

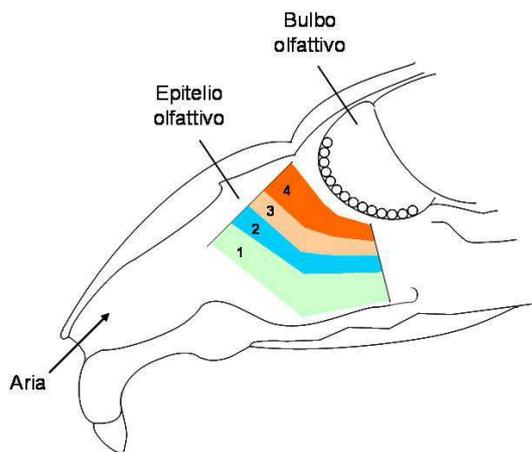


Figura 13. Rappresentazione schematica della suddivisione dorso-ventrale dell'epitelio olfattivo. I numeri (1, 2, 3, 4) indicano le quattro zone in cui classicamente è stato suddiviso l'epitelio olfattivo.

1.10 Organizzazione topografica bulbo

Un preciso ordine spaziale viene tuttavia raggiunto nel bulbo olfattivo. A questo livello i neuroni sensoriali olfattivi esprimenti lo stesso recettore olfattivo convergono con estrema precisione a formare glomeruli in specifiche posizioni sui lati mediale e laterale di ciascun bulbo olfattivo. Le zone in cui risulta suddiviso l'epitelio olfattivo in senso dorso-ventrale, trovano una corrispondenza netta in altrettante zone dorso-ventrali del bulbo olfattivo. Infatti i neuroni sensoriali olfattivi posti nella zona più dorsale proiettano i loro assoni a formare glomeruli nella zona più dorsale del bulbo olfattivo. I neuroni sensoriali olfattivi posti nella zona più ventrale proiettano e formano i corrispondenti glomeruli nella zona più ventrale del bulbo olfattivo e così via (Figura 14).

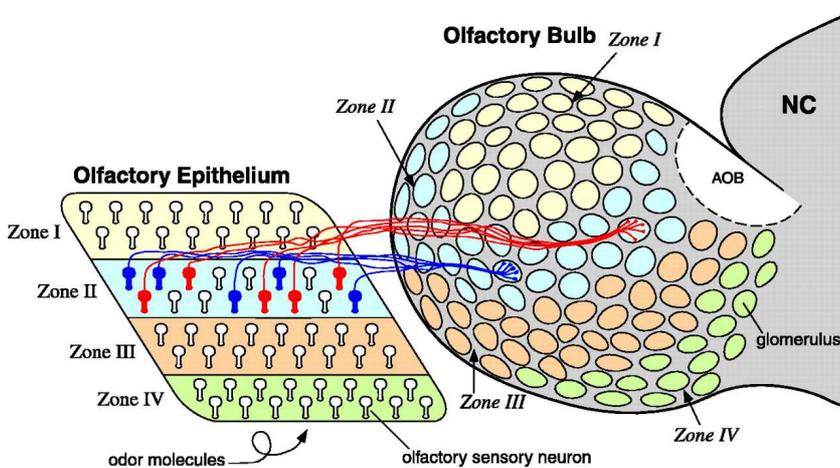


Figura 14. Corrispondenza tra zone dell'epitelio e zone del bulbo olfattivo. La distribuzione dorso-ventrale dei domini dell'epitelio olfattivo (zone I, II, III, IV, nella definizione classica) si riflette nella suddivisione in zone corrispondenti nel bulbo olfattivo. NC = neocorteccia; AOB = bulbo olfattivo accessorio. Immagine modificata da Mori et al., 1999.

La convergenza degli assoni dei neuroni sensoriali olfattivi esprimenti lo stesso recettore olfattivo a formare glomeruli in specifiche posizioni del bulbo olfattivo è stata messa in evidenza dai primi studi di Ressler e collaboratori (1993) e di Vassar e collaboratori (1994), mediante metodiche di ibridazione *in situ*.

Nel 1996 Peter Mombaerts ideò una nuova tecnica di ingegneria genetica che permise di “visualizzare” la mappa olfattiva. In questo studio riuscì a evidenziare una specifica sottopopolazione di neuroni sensoriali olfattivi esprimenti un dato recettore olfattivo (P2) facendo co-esprimere a questi neuroni LacZ (Mombaerts et al., 1996). La strategia molecolare si avvale del fatto che ogni neurone sensoriale esprime un solo tipo di recettore olfattivo, pertanto è possibile far esprimere una molecola solo ad una certa sottopopolazione di neuroni sensoriali, inserendo la molecola di interesse sotto il controllo del promotore del gene codificante il recettore olfattivo stesso. Furono create linee di topi transgenici in cui il recettore olfattivo veniva co-espresso con LacZ. La visualizzazione del reporter (LacZ) veniva quindi effettuata attraverso un X-Gal staining su tessuto fissato (Figura 15).

In studi successivi LacZ è stato sostituito da *green fluorescent protein* (GFP) una molecola fluorescente che può essere apprezzata anche in vivo. Questa diversa modalità di visualizzare una specifica sottopopolazione di sensoriali ed i corrispettivi glomeruli ha dato un contributo enorme all'avanzamento degli studi volti a capire la formazione e la funzione dei circuiti neuronali nel sistema olfattivo, permettendone studi *in vivo* (Figura 16).

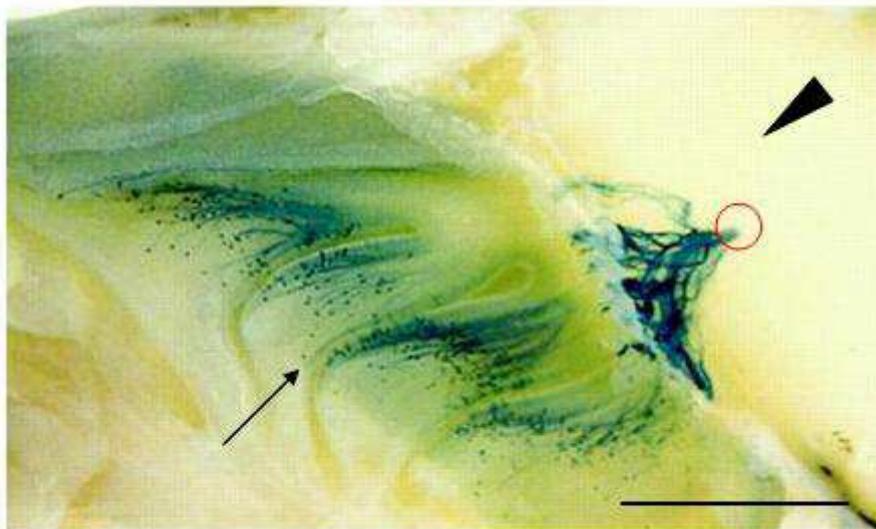


Figura 15. Immagine della convergenza dei neuroni sensoriali esprimenti lo stesso recettore olfattivo a formare il corrispondente glomerulo. Immagine in cui viene visualizzata la convergenza dei neuroni sensoriali esprimenti lo stesso recettore olfattivo (P2) e che coesprimono LacZ (P2-IRES-Tau-LacZ) (freccia), a formare il glomerulo P2 (cerchio rosso) sul lato mediale del bulbo olfattivo di topo. Il preparato è costituito dall'epitelio olfattivo (freccia), dal bulbo olfattivo (triangolo). Barra = 1mm. Immagine modificata da Mombaerts et al., 1996.

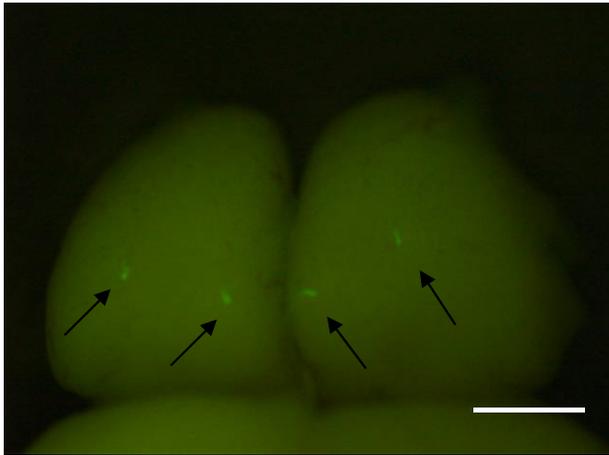


Figura 16. Bulbi olfattivi di un topo M71-GFP. Superfici dorsali dei bulbi olfattivi di un topo M71-GFP in cui lo specifico recettore M71 è coespresso con GFP. A seguito di questa manipolazione genetica i neuroni sensoriali M71 e i corrispondenti glomeruli (identificati dalle frecce) risultano marcati con GFP e così chiaramente individuabili. Barra = 500 μ m. Immagine proveniente dal laboratorio Lodovichi.

Sin dai primi studi (Vassar et al., 1993; Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1994; Ressler et al., 1994) fu chiaro che data la modalità di formazione dei glomeruli, il recettore olfattivo doveva avere un ruolo chiave non solo nel rilevamento degli odori ma anche nell'organizzazione del sistema olfattivo. Quest'ipotesi è stata corroborata da una serie di esperimenti genetici (Wang et al., 1998) in cui si è dimostrato che alterando la sequenza dei geni che codificano i recettori olfattivi, si ha una conseguente alterazione della mappa sensoriale.

La dimostrazione della presenza del recettore olfattivo all'assone terminale (Barnea et al., 2004; Strotmann et al., 2004) e la caratterizzazione del signalling ad esso associato quando espresso all'assone terminale (Imai et al., 2006; Maritan et al., 2009; Pietrobon et al., 2011; Mori e Sakano, 2011; Murthy, 2011; Lodovichi e Belluscio, 2012) hanno ulteriormente rafforzato il ruolo del recettore olfattivo nella formazione della mappa sensoriale.

La posizione dei glomeruli è uguale nei due bulbi di uno stesso animale e pressoché invariata da un animale all'altro (Strottmann et., 2004). Questa distribuzione spaziale delle afferenze sensoriali dà luogo pertanto a una vera e propria mappa topografica detta mappa sensoriale olfattiva o mappa glomerulare.

La presenza di due glomeruli ricevanti assoni da neuroni sensoriali che esprimono lo stesso recettore olfattivo (glomeruli omologhi o isofunzionali), posti sui lati mediale e laterale di ciascun bulbo olfattivo fa sì che ciascun bulbo olfattivo presenti due rappresentazioni identiche e speculari di glomeruli omologhi isofunzionali. Una siffatta distribuzione delle afferenze rappresenta un'altra peculiarità dell'organizzazione del sistema olfattivo, giacché non si conoscono altre aree cerebrali che presentino all'interno della stessa struttura anatomica mappe identiche e speculari. Si è pertanto a lungo dibattuto sulla natura e il significato di queste mappe identiche, speculari e simmetriche in ciascun bulbo olfattivo.

Nel 1985 venne dimostrata per la prima volta la presenza di una connessione, mediata dalle cellule tufted esterne, tra la parte mediale e la laterale di ciascun bulbo olfattivo (Schoenfeld 1985). Al tempo non si era potuto stabilire se questa connessione potesse essere messa in relazione a specifici glomeruli ed in particolare ai glomeruli omologhi, dato che i recettori olfattivi al tempo non erano ancora stati identificati (Buck e Axel, 1991).

Studi successivi (Belluscio et al., 2002; Lodovichi et al. 2003) hanno dimostrato che la connessione intrabulbare, mediata dalle cellule tufted esterne, unisce in maniera specifica e reciproca i glomeruli omologhi laterale e mediale di ogni bulbo olfattivo. Questo risultato è stato ottenuto grazie all'utilizzo di linee di topi transgenici in cui un dato recettore olfattivo viene coespresso con GFP (Gogos et al., 2000; Feinstein e Mombaerts, 2004; Feinstein et al., 2004). A seguito di questa manipolazione genetica, l'intero neurone sensoriale olfattivo ed il suo corrispondente glomerulo sono verdi e pertanto facilmente identificabili. Iniezioni di tracciante fluorescente confinate pressoché esclusivamente a un singolo glomerulo (identificato grazie all'espressione del GFP) vennero effettuate nel glomerulo laterale. L'animale viene sacrificato alcune ore dopo, per permettere la diffusione del tracciante. Le proiezioni delle cellule tufted esterne connesse al glomerulo iniettato, vennero analizzate su sezioni orizzontali di bulbo olfattivo, osservate al microscopio confocale. Si osservò che le cellule tufted esterne formano una proiezione nello strato plessiforme esterno, sul lato opposto del bulbo, esattamente in corrispondenza del glomerulo omologo mediale (anch'esso

facilmente identificabile grazie all'espressione di GFP). Iniezioni eseguite nel glomerulo mediale dimostrarono la reciprocità della connessione. Iniezioni di traccianti fluorescente nel glomerulo mediale, terminavano infatti in una proiezione localizzata esattamente alla base del glomerulo omologo laterale (Figura 17).

Per valutare se questa connessione reciproca interessasse l'intero bulbo olfattivo, vennero effettuati esperimenti di optical imaging of intrinsic signal combinati ad iniezioni di tracciante fluorescente confinate a singoli glomeruli. I risultati dimostrarono che la connessione tra i glomeruli omologhi, dovuta alle cellule tufted esterne, era presente in tutto il bulbo, e univa con una precisione estrema i glomeruli isofunzionali di ogni bulbo olfattivo (Lodovichi et al, 2003).

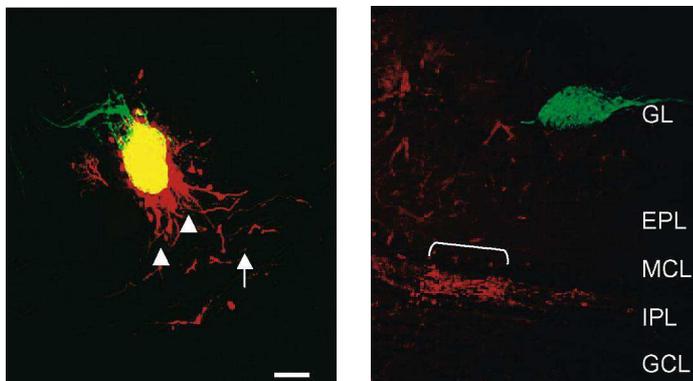


Figura 17. Connessione tra i glomeruli omologhi P2-GFP. A sinistra immagine del sito d'iniezione nel glomerulo P2-GFP, circondato dalle cellule tufted esterne (triangoli bianchi) ed i loro assoni (freccia bianca). A destra immagine della proiezione anterograda (parentesi bianca) centrata al di sotto del glomerulo isofunzionale P2-GFP, sito sul lato opposto del bulbo olfattivo rispetto al glomerulo iniettato. GL = strato dei glomeruli; EPL = strato plessiforme esterno; MCL = strato delle cellule mitrali; IPL = strato plessiforme interno; GCL = strato delle cellule dei granuli. Barra = 50 μ m. Immagine modificata da Lodovichi et al., 2003.

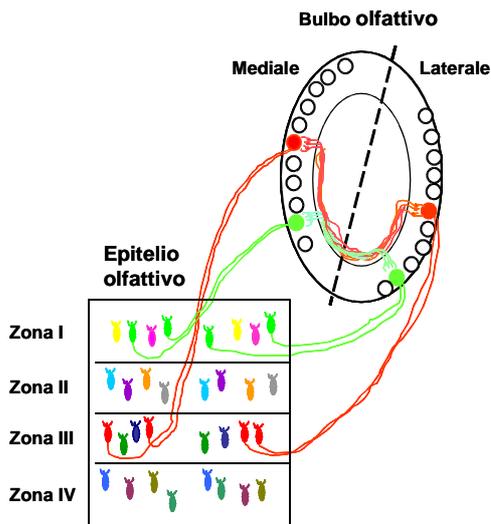


Figura 18. Rappresentazione schematica della connettività tra epitelio olfattivo e bulbo. L'epitelio olfattivo è suddiviso in zone, in senso dorso-ventrale. I neuroni sensoriali olfattivi che esprimono lo stesso recettore olfattivo (identificati con codice-colore in verde e rosso, rispettivamente) proiettano a formare glomeruli sui lati mediale e laterale del bulbo olfattivo. La linea tratteggiata, che individua l'asse di simmetria passante per il centro del bulbo olfattivo, lo divide in due metà speculari di glomeruli isofunzionali. Immagine modificata da Lodovichi et al., 2003.

Le due mappe di glomeruli omologhi all'interno del bulbo non sono pertanto due distinte entità, ma sono connesse attraverso una connessione inibitoria specifica e reciproca dovuta alle cellule tufted esterne.

Questa connessione tra le due mappe di glomeruli omologhi viene a costituire un secondo livello di organizzazione topografica del bulbo, il quale presenta pertanto due mappe topografiche: 1) la mappa sensoriale olfattiva o mappa glomerulare risultante dalla convergenza degli assoni dei neuroni sensoriali olfattivi esprimenti lo stesso recettore a formare glomeruli in specifiche posizioni sui lati mediale e laterale di ciascun bulbo; 2) la connessione intrabulbare volta a collegare in modo specifico e reciproco i glomeruli omologhi di ciascun bulbo olfattivo (Figura 18). Tale connessione viene a unire tutta la struttura definita dal glomerulo, realizzando una connessione tra colonne odorose omologhe o isofunzionali

La connessione che si stabilisce tra le due colonne isofunzionali è di tipo inibitorio. Gli assoni delle cellule tufted esterne connesse a un dato glomerulo posto sul lato mediale del bulbo olfattivo formano una proiezione nello strato plessiforme interno esattamente in corrispondenza del glomerulo isofunzionale posto sul lato laterale dello stesso bulbo

olfattivo. Gli assoni delle tufted esterne contraggono sinapsi eccitatorie, utilizzando come neurotrasmettitore colecistochinina octa-peptide (CCK-8) (Seroogy et al., 1985), con i dendriti delle cellule dei granuli connesse alla colonna odorosa del glomerulo isofunzionale laterale. I dendriti delle cellule dei granuli così attivate, formano sinapsi inibitorie dendro-denritiche con i dendriti delle cellule tufted esterne associate al glomerulo isofunzionale laterale. Questa connessione è di tipo reciproco (Figura 19 e 20).

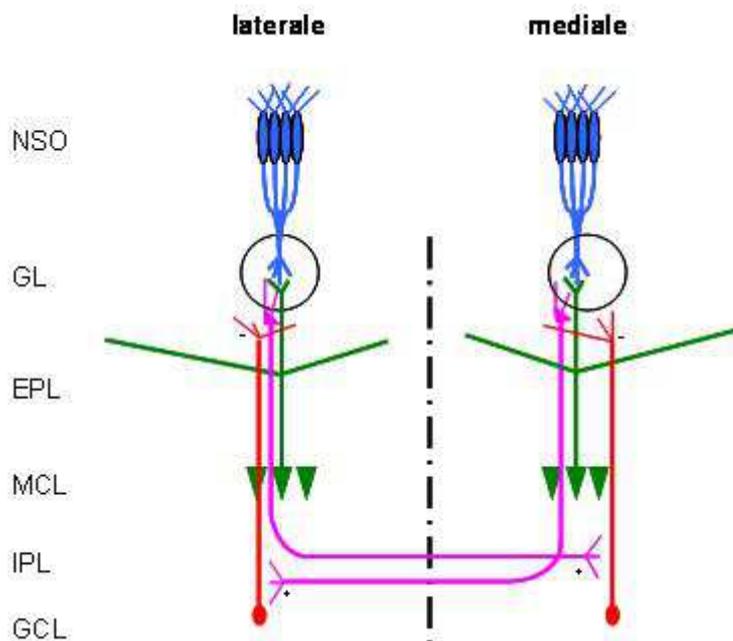


Figura 19. La connessione intrabulbare tra glomeruli omologhi. Diagramma della connessione che unisce i glomeruli omologhi posti rispettivamente sul lato mediale e sul lato laterale di ogni bulbo olfattivo. I neuroni sensoriali olfattivi (blu) fanno sinapsi con le cellule mitrali (verde), le cellule tufted esterne (viola). Le cellule tufted esterne inviano i loro assoni sul lato opposto dello stesso bulbo dove formano una proiezione a livello dello strato plessiforme interno, esattamente in corrispondenza del glomerulo omologo. Gli assoni delle cellule tufted esterne formano sinapsi con le cellule dei granuli (rosso). NSO = neuroni sensoriali olfattivi; GL = strato dei glomeruli; EPL = strato plessiforme esterno; MCL = strato delle cellule mitrali; IPL = strato plessiforme interno; GCL = strato delle cellule dei granuli. + = sinapsi eccitatoria. - = sinapsi inibitoria.

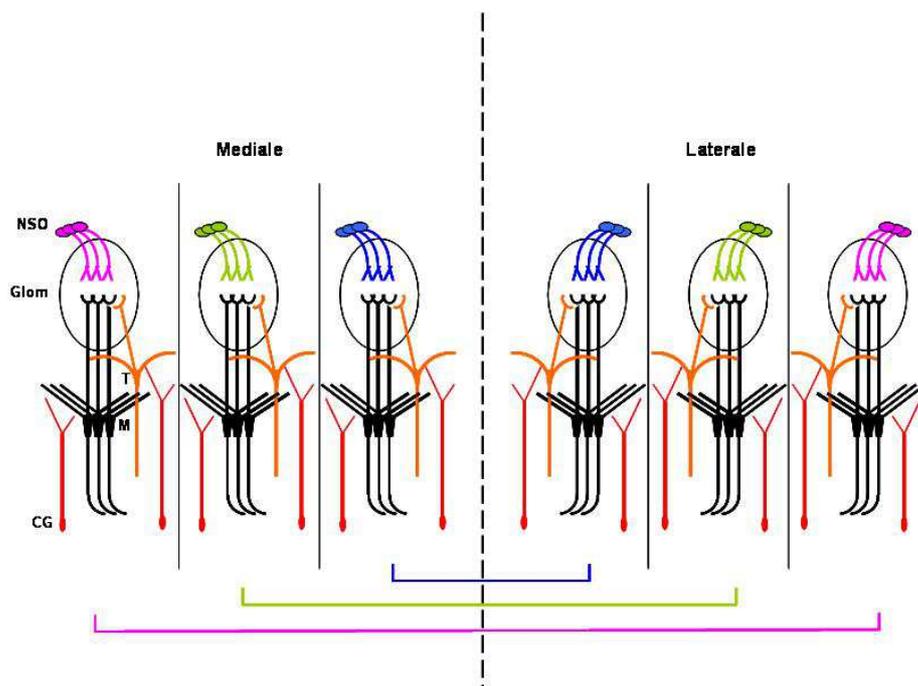


Figura 20. Diagramma della connessione intrabulbare. La connessione unisce in modo specifico e reciproco colonne odorose omologhe, poste rispettivamente sul lato mediale e laterale di ciascun bulbo olfattivo. NSO = neuroni sensoriali olfattivi; Glom = glomeruli; T = cellule tufted; M = cellule mitrali; CG = cellule dei granuli.

1.11 Mappe glomerulari funzionali

Un odore a livello del bulbo olfattivo è rappresentato da un pattern spaziale di glomeruli attivati. Questa rappresentazione viene indicata con il termine mappa funzionale in quanto è il corrispettivo funzionale delle mappe sensoriali olfattive o mappe glomerulari.

La codifica di un odore da parte di un gruppo di glomeruli deriva direttamente dalla organizzazione topografica del sistema olfattivo.

Abbiamo riferito che i neuroni sensoriali esprimenti lo stesso recettore olfattivo convergono a formare glomeruli in siti specifici di ciascun bulbo olfattivo. Abbiamo inoltre riportato che un odore è in grado di attivare un certo numero di recettori olfattivi. Ne deriva che l'interazione di un odore con i recettori olfattivi porti alla attivazione dei corrispondenti glomeruli nel bulbo olfattivo.

Le prime evidenze sperimentali di come un odore viene rappresentato a livello del bulbo olfattivo sono state ottenute su tessuto fissato, con la metodica del desossiglucosio (Coopersmith e Leon, 1984; Johnson e Leon, 2000). L'animale veniva esposto a un dato odore, quindi sacrificato e perfuso. Il bulbo olfattivo, rimosso e tagliato in sezioni viene processato, per visualizzare il desossiglucosio con incorporato il carbonio-14, esponendo lastre fotografiche sensibili al decadimento di questo isotopo, per poter visualizzare il pattern spaziale di attività metabolica a livello dello strato dei glomeruli.

Successivamente, le evoluzioni tecniche hanno permesso di visualizzare le mappe funzionali *in vivo*. Il primo studio che ha dimostrato che un odore dà luogo a un pattern spaziale di glomeruli attivati è stato condotto da Rubin e Katz (1999), sfruttando la metodica dell'optical imaging of intrinsic signal in ratti anestetizzati. Questa metodica sfrutta un segnale metabolico intrinseco. I neuroni attivi reclutano un maggiore flusso di sangue, con conseguente cambiamento dei livelli di ossi- e desossiemoglobina, e vanno incontro a tutta una serie di cambiamenti intracellulari, quali fosforilazione/de-fosforilazione di proteine, cascate di signalling, etc.

Tutti questi processi conferiscono al tessuto attivo caratteristiche ottiche differenti rispetto al tessuto circostante non attivo. Pertanto se il tessuto viene illuminato con fibre ottiche aventi una sorgente luminosa a una certa lunghezza d'onda, la luce viene rifratta e riflessa in modo diverso dal tessuto attivo rispetto al tessuto non attivo, rendendo possibile visualizzare le aree attivate (Bonhoeffer e Grinvald, 1993). La tecnica si presta molto bene a studiare aree cerebrali superficiali quali la corteccia visiva primaria e il bulbo olfattivo. Presenta una ottima risoluzione spaziale, ma una scarsa risoluzione temporale. E' pertanto particolarmente indicata a "mappare" aree cerebrali.

Utilizzando questa metodica, Rubin and Katz hanno dimostrato che un odore dà luogo a un pattern di zone attivate nei bulbi olfattivi (Figura 21). Le mappe sono pressoché identiche nei due bulbi olfattivi, riflettendo l'organizzazione topografica delle mappe sensoriali olfattive (vedi sopra). Ogni singola area o spot attivato corrisponde ad un glomerulo, come dedotto dalle dimensioni delle aree attivate. La dimostrazione diretta che le aree attivate corrispondono a singoli glomeruli è stata data da Belluscio e colleghi (2001) con esperimenti condotti su animali in cui una data popolazione di neuroni sensoriali co-esprimeva il recettore olfattivo insieme a GFP. Nel caso specifico il recettore era I7, di cui è noto il ligando (ottanale, aldeide a 8 atomi di carbonio). Facendo inalare all'animale ottanale si è visto che l'area attivata corrispondeva

pressoché esattamente al glomerulo I7-GFP. L'area attivata negli esperimenti di imaging era solo lievemente più grande (20%) del glomerulo I7-GFP. Questo risultato corrobora l'ipotesi che la maggior parte del segnale nelle mappe funzionali ottenute con optical imaging of intrinsic signal sia presinaptico, origini cioè dalla attivazione dei neuroni sensoriali (Rubin e Katz, 1999; Meister e Bonhoeffer, 2001). Un piccolo contributo (circa il 20%) deriva anche da elementi postsinaptici.

Questo studio (Rubin e Katz, 1999; Rubin e Katz, 2001) ha dimostrato come ogni odore dia luogo ad uno specifico pattern di glomeruli attivati. Uno stesso glomerulo può essere attivo in mappe attivate in seguito alla inalazione di odori diversi, ma l'identificazione dello specifico odore è resa possibile dallo specifico gruppo di glomeruli attivati.

Aumentando la concentrazione degli odori si osserva l'attivazione di un numero maggiore di glomeruli, come deducibile dal codice combinatoriale (vedi sopra).

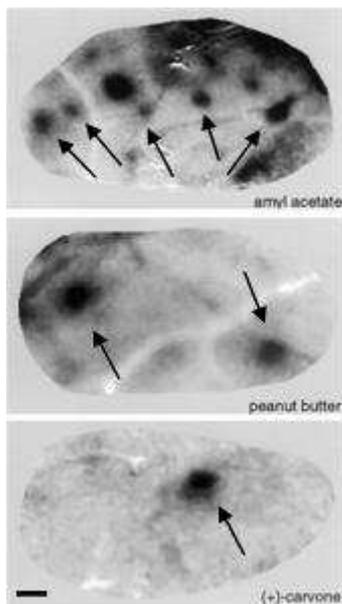


Figura 21. Mappe funzionali in risposta ad odori. Immagini di mappe funzionali ottenute con la metodica dell'optical imaging of intrinsic signal sulle superfici dorsali del bulbo olfattivo. Gli spot scuri corrispondono a glomeruli attivati (evidenziati dalle frecce). Le mappe funzionali, ovvero sia pattern spaziali di glomeruli attivati, sono ottenute in risposta all'esposizione dell'animale (ratto) a: A) amil acetato; B) burro di noccioline, C) Carvone (+). Barra = 250 μ m. Immagine modificata da Rubin e Katz, 1999.

L'estrema sensibilità olfattiva dei roditori permette a questi animali di discriminare gli enantiomeri. Gli enantiomeri sono coppie di molecole chimiche che differiscono esclusivamente per l'attività ottica del carbonio chirale. In uno studio successivo Rubin e Katz (2001) hanno dimostrato che gli enantiomeri sono rappresentate da mappe olfattive funzionali molto simili, che differiscono solamente per uno o alcuni glomeruli attivati, i quali sono localizzati in un'area ristretta. Questi risultati dimostrano che la distribuzione dei glomeruli attivati ovvero sia le mappe funzionali, contengono informazioni sufficienti a discriminare le differenze tra molecole organiche (Figura 22).

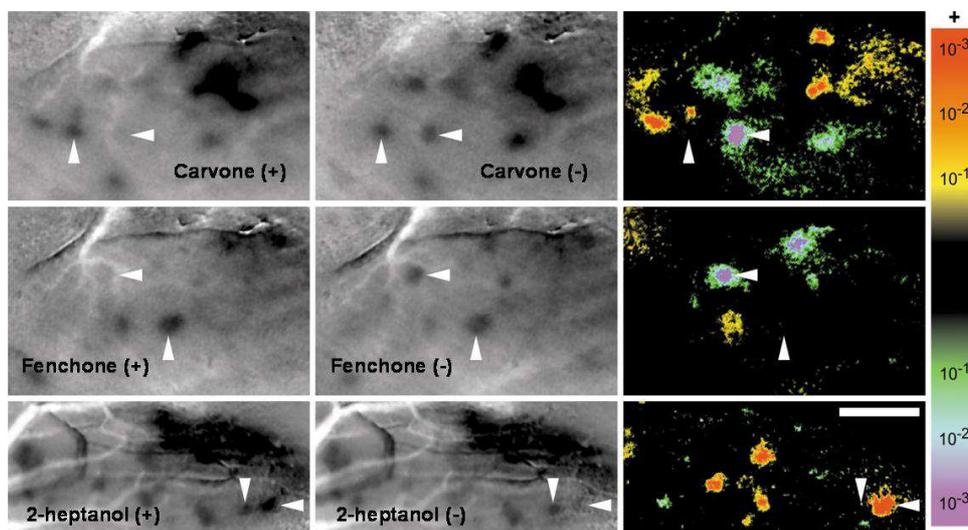


Figura 22. Mappe funzionali in risposta ad enantiomeri. Mappe funzionali ottenute con la metodica dell'optical imaging of intrinsic signal, in ratti, in risposta a coppie di enantiomeri: Carvone (+) (in alto a sinistra); Carvone (-) (in alto a destra); Fenchone (+) (in centro a sinistra); Fenchone (-) (in centro a destra); 2-eptanolo (+) (in basso a sinistra); 2-eptanolo (-) (in basso a destra). Tutti gli odori sono diluiti all'1%. I triangoli bianchi orizzontali indicano i glomeruli (spot scuri) attivati solo in una delle due mappe funzionali ottenute in risposta ad una coppia di enantiomeri. I triangoli verticali indicano i glomeruli attivati in entrambi le mappe funzionali ottenute in risposta a una coppia di enantiomeri. Le immagini a colori (colonna a destra) sono state ottenute effettuando un t-test, pixel su pixel, tra le immagini di mappe funzionali ottenute in risposta alle coppie di enantiomeri studiate. Il colore di ogni pixel rappresenta la probabilità che i 2 enantiomeri evocino la stessa risposta, dove il rosso indica la preferenza per l'enantiomero (+) ed il viola indica la preferenza per l'enantiomero (-) (Le probabilità sono indicate nella colonna di colori a destra). Barra = 250 μ m. Immagine modificata da Rubin e Katz, 2001.

Si è inoltre osservata una topografia nella rappresentazione funzionale degli odori nel topo (Belluscio e Katz, 2001). Le aldeidi a crescente catena carboniosa tendono ad attivare glomeruli che sono localizzati lungo l'asse antero-posteriore e medio-laterale del bulbo (Figura 23).

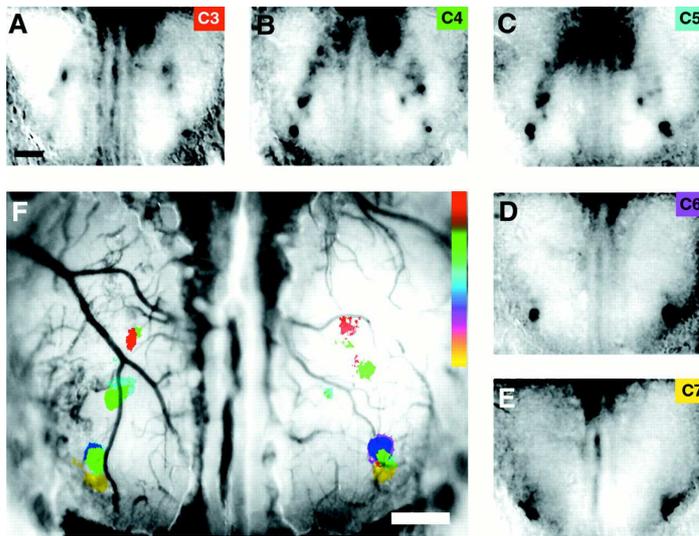


Figura 23. Rappresentazione topografica di molecole odorose. Pattern di attività sulla superficie dorsale di bulbo olfattivo di topo in seguito all'esposizione ad una serie di aldeidi alifatiche a catena progressivamente allungata (C3-C7) diluite all'1%. Tutte le mappe derivano dal medesimo animale. Barra = 500 μ m. Immagine modificata da Belluscio e Katz, 2001.

Questi risultati sono stati confermati e ampliati da molteplici studi successivi che hanno utilizzato tecniche diverse per poter visualizzare le mappe funzionali in vivo, quali il Ca^{2+} imaging e synaptophluorin.

Il Ca^{2+} viene impiegato da molto tempo come read-out dell'attivazione dei neuroni. I sensoriali olfattivi possono facilmente essere caricati con indicatori del Ca^{2+} , attraverso una semplice inalazione degli indicatori stessi in animali vivi anestetizzati. L'attivazione dei terminali assonici a seguito di stimoli odorosi dei neuroni sensoriali viene visualizzata nel corso di esperimenti di imaging *in vivo* sul bulbo olfattivo dei roditori anestetizzati. Uchida e colleghi (2000) hanno utilizzato questa metodica per identificare zone del bulbo olfattivo che venivano attivate da specifiche classi di odori quali aldeidi, chetoni, acidi etc. E' stato così dimostrato che è possibile evidenziare una mappa chemiotopica nel bulbo olfattivo dei roditori (Uchida et al., 2000) (Figura 24).

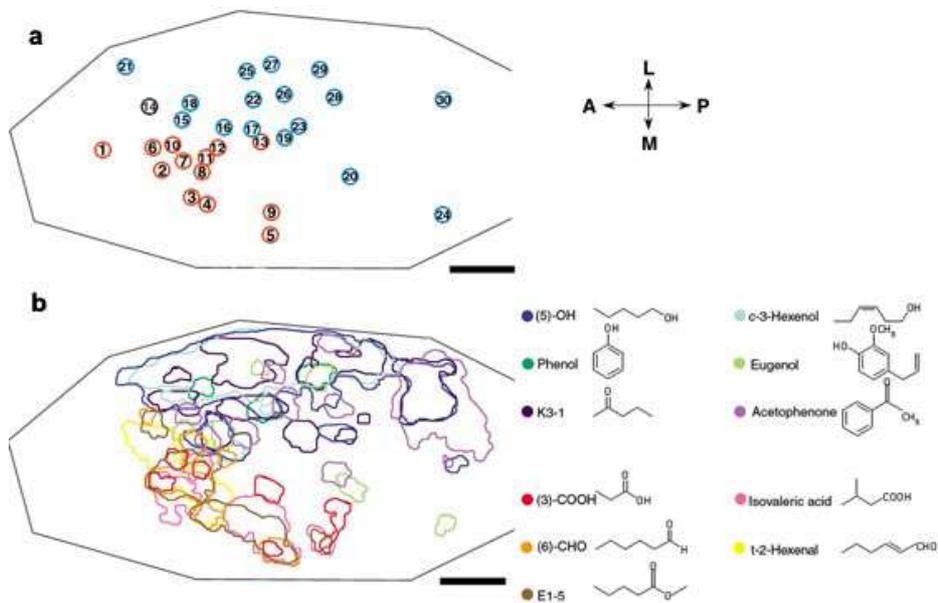


Figura 24. Mappe chemiotopiche nel bulbo olfattivo di ratto. a) Localizzazione dei glomeruli attivati in risposta a diversi composti chimici; b) Mappa di attivazione glomerulare per gli 11 odoranti rappresentativi di diverse classi chimiche, riportate sulla destra. Immagine modificata da Uchida et al., 2000.

Tecniche di mappatura glomerulare più moderne fanno uso di sonde geneticamente codificate da determinate popolazioni cellulari, come nel caso di synapto-phluorin (Bozza et al., 2004). Synapto-phluorin è una proteina di fusione (associata alla proteina vescicolare di membrana VAMP2) sensibile alle variazioni di pH viene espressa a carico dei terminali dei neuroni sensoriali olfattivi. Inattiva a pH acido (all'interno della vescicola sinaptica) la proteina diviene fluorescente in seguito a rilascio sinaptico. Synapto-phluorin quando espressa nei neuroni sensoriali olfattivi permette di visualizzare i neuroni sensoriali che si attivano in seguito a stimolazione con odori.

Questa tecnica presenta un rapporto segnale rumore più alto rispetto alle mappe ottenute con l'imaging intrinseco e presenta inoltre cinetiche più veloci e permettendo una maggiore risoluzione temporale. Il segnale ottenuto con synapto-phluorin è più stabile e permette di monitorare l'attività dei neuroni sensoriali per tempi anche lunghi senza che il segnale si degradi.

1.12 Sviluppo dei circuiti neurali

Nel sistema nervoso centrale miliardi di neuroni sono connessi mediante specifiche connessioni sinaptiche. Come già abbiamo ricordato (vedi paragrafo precedente) la specificità delle connessioni neurali è fondamentale per il normale funzionamento del cervello.

Questa specificità non è presente nella maggior parte dei mammiferi alla nascita, ma si raggiunge attraverso lo sviluppo post natale.

La specificità sinaptica si realizza attraverso un processo che è regolato da molecole capaci di guidare gli assoni verso il loro target. Le molecole deputate a guidare l'assone nel proprio tragitto verso il target definitivo variano sia per tipo che per quantità in relazione al momento dello sviluppo e al tipo neuronale considerato. E' ormai ben noto che una sequenza specifica di molecole guida viene elaborata in tempi e con modalità precise per ogni tipo neuronale. Un altro elemento fondamentale per guidare gli assoni alla loro destinazione è il pattern di attività elettrica tra i neuroni.

Le molecole guida e l'attività elettrica dei neuroni pre- e post-sinaptici rappresentano pertanto i regolatori dello sviluppo dei circuiti neurali.

Sebbene spesso trattati e studiati indipendentemente (anche per praticità di esposizione o limiti dei gruppi interessati a studiare questo problema scientifico) è ormai ben noto che questi due elementi coesistono e si influenzano in modo reciproco attraverso un gioco di interazioni complesse.

In questo progetto di tesi mi sono occupato del ruolo dell'attività elettrica nella formazione dei circuiti neurali del bulbo olfattivo. Non mi soffermo per tanto a descrivere il ruolo delle molecole guida, che può essere letto in molte reviews che hanno in modo esaustivo affrontato l'argomento (Sakano, 2010; Mori e Sakano, 2011). Mi concentrerò esclusivamente sul ruolo della attività elettrica.

L'attività elettrica dei neuroni è un evento complesso che può essere distinta in due maggiori sottoclassi: 1) attività spontanea; 2) attività evocata.

Con "attività spontanea" si designa la presenza di potenziali di azione che insorgono spontaneamente nei neuroni indipendentemente da e in assenza di stimoli specifici.

L'attività evocata invece designa i potenziali d'azione che vengono generati in risposta a stimoli specifici, la cui natura cambia in relazione al tipo di neurone considerato. Nei

sistemi sensoriali gli stimoli sono rappresentati dagli stimoli sensoriali specifici, quali la luce per la retina, i suoni per la coclea o gli odori per l'epitelio olfattivo.

Sia l'attività evocata che l'attività spontanea giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo dei circuiti neurali. Il tipo di attività richiesto nelle varie fasi di sviluppo e il tipo di funzione (istitutiva o permissiva, vedi sotto) svolto da ciascun tipo di attività, rimane al centro di un animato dibattito scientifico.

L'attività elettrica può infatti avere un ruolo "permissivo" e pertanto semplicemente permettere lo svolgersi di un programma definito da elementi molecolari. Oppure può agire come un regolatore necessario e insostituibile e pertanto avere un ruolo "istitutivo".

Il ruolo della attività elettrica nello sviluppo dei circuiti neurali è stato ampiamente studiato e dissezionato in altre modalità sensoriali, quali il visivo, ma rimane in gran parte da essere capito nel sistema olfattivo.

Come abbiamo esposto sopra, il recettore olfattivo gioca un ruolo chiave non solo nella rilevazione degli stimoli odorosi ma anche nella organizzazione del sistema olfattivo. La convergenza degli assoni a formare la mappa olfattiva sensoriale è basata sulla natura del recettore olfattivo, dato che solo ed esclusivamente i neuroni che esprimono lo stesso recettore olfattivo convergono a formare un dato glomerulo in precise posizioni di ogni bulbo. Il glomerulo così formatosi definisce una unità funzionale, la colonna odorosa, in cui viene processata l'informazione sensoriale veicolata dal recettore olfattivo espresso dagli assoni dei neuroni sensoriali che si sono uniti per formare il corrispettivo glomerulo. Anche la connessione intrabulbare è basata sulla specificità dei recettori olfattivi, infatti sono uniti in modo specifico e reciproco quei glomeruli che ricevono le afferenze dai neuroni sensoriali esprimenti lo stesso recettore olfattivo.

Nonostante questo, l'attività elettrica evocata, mediata dall'attivazione del recettore olfattivo, ha scarsa influenza sulla formazione della mappa sensoriale.

Molti studi hanno dimostrato come nonostante si elimini l'attività evocata, attraverso manipolazioni genetiche che interrompano il signalling intracellulare associato al recettore olfattivo, la mappa sensoriale si forma correttamente. Questo è stato dimostrato per i topi in cui è stata eliminata, mediante manipolazioni genetiche, l'espressione dei canali CNG (Brunet et al., 1996; Zhang and Firestein, 2002). In questi topi l'attività evocata è abolita, come mostrato da registrazioni elettrofisiologiche dell'elettro-olfattogramma in risposta a stimoli odorosi. La mappa sensoriale si forma tuttavia in maniera pressoché normale.

Risultati analoghi sono stati osservati per i topi in cui manipolazioni genetiche hanno eliminato l'espressione della proteina G_{olf} (Belluscio et al., 1998). Anche in questo caso l'eliminazione della attività evocata coesiste a mappe sensoriali normali nel bulbo olfattivo.

L'abolizione dell'attività evocata a seguito della soppressione nell'espressione dell'adenilato ciclasi di tipo III è tuttavia associata ad anomalità della mappa sensoriale olfattiva (Trinh e Storm, 2003; Col et al., 2007; Chesler et al., 2007; Zou et al., 2007). In questo caso l'interruzione del signalling intracellulare associato al recettore olfattivo implica l'abolizione della sintesi di cAMP, che non si verifica nelle due manipolazioni precedentemente esposte.

Nel caso di topi knock-out per la sub-unità α del canale CNG, la modificazione genetica elimina elementi che sono a valle nella cascata di trasduzione del segnale rispetto all'adenilato ciclasi di tipo III, che è integra e pertanto può funzionare. Il cAMP prodotto, tuttavia, non è in grado di indurre depolarizzazione del neurone e pertanto risposte evocate, in quanto il target del cAMP, i canali CNG non sono funzionanti. Il cAMP prodotto dopo attivazione del recettore olfattivo è comunque in grado di svolgere altre funzioni, ad esempio quelle potenzialmente associate alla guida dell'assone al suo target finale.

Nel caso di topi knock-out per G_{olf} , la funzione di attivare l'adenilato ciclasi di tipo III è molto probabilmente vicariata da un'altra proteina G ($G\alpha$), che è noto essere presente nei neuroni sensoriali in fasi precoci dello sviluppo e che viene molto probabilmente riattivata in queste circostanze. I topi ko per G_{olf} non presentano infatti una completa eliminazione della attività evocata, sebbene sia fortemente ridotta. E le quantità di cAMP prodotta in queste condizioni sembrano sufficienti a garantire un normale sviluppo della mappa glomerulare.

In caso di eliminazione della attività evocata a seguito di abolizione dell'espressione dell'adenilato ciclasi di tipo III, la mancata attività evocata si associa a eliminazione di sintesi del cAMP.

Questo ha portato anche a ipotizzare che il cAMP prodotto a seguito della attivazione del recettore olfattivo svolga un ruolo chiave nella formazione della mappa sensoriale, come dimostrato dagli studi recenti (Imai et al., 2006; Maritan et al., 2009; Pietrobon et al., 2011).

La conclusione che si può trarre da questi studi è che l'attività evocata di per se non sia necessaria per una corretta formazione della mappa sensoriale.

Studi più recenti hanno messo in evidenza che l'attività evocata è invece necessaria al corretto sviluppo delle connessioni intrabulbari (Marks et al., 2006). In assenza di attività evocata, in topi CNG knock-out, le connessioni intrabulbari tra i glomeruli omologhi sono molto larghe e comprendono molteplici glomeruli. Non hanno più la specificità delle connessioni puntiformi che si realizzano tra glomeruli omologhi negli animali di controllo.

Il ruolo della attività spontanea nella formazione dei circuiti neurali è stato ampiamente studiato in altre modalità, in particolare nel visivo (Galli e Maffei 1988; Meister et al., 1991) e rimandiamo a review esaustive che hanno sintetizzato gli studi più che trentennali su questo argomento (Huberman et al., 2008), ma rimane comunque da essere compreso nel sistema olfattivo.

Nel 2004 Ron Yu e colleghi hanno pubblicato uno studio volto a studiare il ruolo della attività spontanea nella formazione della mappa sensoriale olfattiva. Per raggiungere questo scopo è stata creata una linea di topi transgenici in cui l'attività spontanea è pressoché abolita nei neuroni sensoriali a seguito dell'espressione di un canale potassio (inward-rectifier), il canale Kir2.1, in tutti i neuroni sensoriali olfattivi. Essi hanno mostrato che in questi animali gli assoni dei sensoriali proiettano al bulbo olfattivo con ritardo e in modo anomalo, dando luogo a glomeruli multipli, invece dei due glomeruli omologhi che troviamo nei controlli (Yu et al., 2004).

Tuttavia molte domande relative alla organizzazione della mappa sensoriale, in particolare la localizzazione dei glomeruli nel bulbo e la loro organizzazione, elementi fondamentali per la corrispondente mappa topografica sensoriale, rimanevano da essere studiati.

Non era inoltre stato affrontato se e in che modo l'assenza di attività spontanea potesse influenzare il secondo livello dell'organizzazione topografica del bulbo, vale a dire le connessioni intrabulbari.

In questo progetto di tesi mi sono pertanto occupato di studiare il ruolo della attività afferente spontanea nella formazione e nel mantenimento delle connessioni intrabulbari.

Questo mio lavoro di tesi si inserisce in un progetto più ampio condotto in collaborazione con altri membri del laboratorio e con collaboratori esterni, volto a studiare il ruolo della attività elettrica afferente spontanea nella formazione e funzione dei circuiti neurali del bulbo olfattivo.

Pertanto presenterò esclusivamente la parte sperimentale che io ho condotto e farò riferimento agli esperimenti condotti dagli altri ricercatori (indicandolo nel testo), quando questo si renda necessario a rendere comprensibile alcuni passaggi del mio lavoro.

2. Materiali e metodi

2.1 Linee di topi transgenici

Gli esperimenti sono stati effettuati su animali di età compresa tra P7 e P70. Sono state utilizzate cinque linee di topi, una di wild-type C57/B6 e quattro geneticamente modificate: OMP-IRES-tTA; TetO-Kir 2.1-IRES-tau-LacZ (Kir 2.1); P2-IRES-GFP (P2-GFP) e M71-IRES-GFP (M71-GFP). La linea di topi TetO-Kir 2.1-IRES-tau-LacZ (Kir 2.1) è stata incrociata con la linea OMP-IRES-tTA per guidare l'espressione del Kir 2.1. I topi eterozigoti per Kir 2.1 sono stati poi incrociati con i topi P2-GFP o con i topi M71-GFP.

Le linee mutanti TetO-Kir 2.1-IRES-tau-LacZ e P2-IRES-GFP (P2-GFP) sono state generosamente fornite dal laboratorio di J.A. Gogos (Columbia University, New York, NY). Tali linee sono state descritte in dettaglio in precedenti lavori (Gogos et al., 2000; Yu et al., 2004). La linea M71-IRES-GFP (M71-GFP), descritta in dettaglio in precedenti studi (Feinstein et al., 2004), è stata acquistata da Jackson Laboratories.

Tutte le procedure sperimentali sono state effettuate sotto stretto controllo del comitato etico di Ateneo dell'Università di Padova.

2.2 Iniezioni *in vivo*

Per questa metodica sono state utilizzate tre differenti linee di animali, una di wild-type C57/BL6 e due linee transgeniche: M71-GFP e Kir 2.1. Gli animali vengono anestetizzati con una miscela 1:1 di Zoletil 100 (una combinazione di Zolazepam e Tiletamina in proporzione di 1:1, da somministrarsi ad una concentrazione pari a 10 mg/kg di animale, prodotto dai Laboratori Virbac) e Xilor (Xilazina al 2%, da somministrarsi ad una concentrazione pari a 0.06 ml/kg di animale, prodotto dalla Bio98), somministrata per via intraperitoneale. Gli animali vengono posti in un apparato stereotassico. La temperatura corporea viene costantemente monitorata e mantenuta costante a 37.5 °C attraverso un tappetino riscaldante. Lo scalpo viene tagliato, l'osso esposto e assottigliato attraverso l'uso di una fresa chirurgica per permetterne l'accesso ai sottostanti bulbi olfattivi. Una volta assottigliato, l'osso viene rimosso ed i bulbi

esposti. Per minimizzare i rischi di disidratazione, il tessuto viene mantenuto umido mediante applicazione continua di soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) fredda. I bulbi sono visualizzati sotto uno stereomicroscopio ad epifluorescenza (Leica MZ16). Microiniezioni di un colorante fluorescente [10% tetramethylrhodamine (TMR) dextran coniugated (3000MW) (Invitrogen – Molecular Probes)] diluito in soluzione fisiologica filtrata sono effettuate nello strato dei glomeruli e in alcuni casi (specificati nel testo) nel glomerulo marcato con GFP, in particolare M71-GFP e P2-GFP. Il tracciante viene iniettato per ionoforesi (2 μ A, 50% duty cycle, impulsi della durata di 7 secondi per un tempo non superiore ai 3 minuti) attraverso una micropipetta di vetro borosilicato del diametro di 4-5 μ m (World Precision Instrument – WPI). Dopo un tempo di incubazione variabile tra le 8/12 ore, gli animali venivano sacrificati con una overdose di Zoletil 100 e Xilor. Gli animali venivano successivamente perfusi per via transcardiaca con soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) fredda, seguita da una soluzione di paraformaldeide (PFA) al 4% in tampone fosfato (PBS) 0.1 M fredda. Il cranio dell'animale veniva aperto e i bulbi olfattivi rimossi. Questi ultimi erano post-fissati durante la notte (12-16 ore) in soluzione di paraformaldeide 4%. I bulbi olfattivi erano tagliati in sezioni orizzontali (spessore 60 μ m) al vibratomo (VT 1000S, Leica Microsystems). Le sezioni venivano poi montate su vetrino con montante specifico a base d'acqua (Aquapolymount, Polysciences).

2.3 Iniezioni *ex vivo*

Per questa metodica sono stati utilizzati animali P2-GFP e Kir 2.1 x P2-GFP. L'età degli animali usati per questa metodica deve essere inferiore a P30, in quanto in animali di età maggiore il tracciante non viene trasportato adeguatamente. A causa della differente localizzazione dei glomeruli P2, posti sulla parete mediale del bulbo, era necessario un approccio sperimentale diverso rispetto a quello seguito per le iniezioni in vivo, possibili solo per i glomeruli localizzati sulla superficie dorsale del bulbo olfattivo, quali i glomeruli M71. Abbiamo quindi utilizzato un preparato *ex vivo*, preparato di emiteste, messo a punto in uno studio precedente (Lodovichi et al., 2003). Gli animali vengono anestetizzati con una miscela 1:1 di Zoletil 100 e Xilor, somministrata per via intraperitoneale, e successivamente decapitati. La testa

dell'animale veniva tagliata lungo l'asse sagittale, in modo da esporre il lato mediale del bulbo, che mantiene le sue connessioni sia con l'epitelio sia con il cervello.

Le emiteste venivano preparate e mantenute in una soluzione di liquido cerebrospinale artificiale (McQuiston e Katz, 2001) e costantemente ossigenate con una miscela gassosa (O₂ 95% e CO₂ 5%). Il lato mediale del bulbo olfattivo veniva così a essere esposto e i glomeruli posti sul lato mediale, erano facilmente identificabili, sotto uno stereomicroscopio ad epifluorescenza (Leica MZ16). Microiniezioni di tetramethylrhodamine (TMR) dextran coniugated (3000MW) (Invitrogen – Molecular Probes) erano effettuate in corrispondenza del glomerulo mediale di interesse, in particolare il glomerulo P2-GFP, utilizzando gli stessi parametri utilizzati per le iniezioni *in vivo*. Una volta iniettati i bulbi venivano mantenuti in incubazione a temperatura ambiente in liquido cerebrospinale artificiale e continuamente ossigenati con una miscela gassosa (O₂ 95% e CO₂ 5%). per 4-5 ore a temperatura ambiente, e successivamente fissati e processati come descritto precedentemente.

2.4 Acquisizione delle immagini al confocale e analisi dei dati

I bulbi iniettati e processati, venivano tagliati in sezioni orizzontali (vedi sopra) e analizzati al microscopio confocale (SP5 Leica). L'obiettivo utilizzato per questo scopo è un HC PL Fluotar 20X/0.50 NA ad aria.

I fluorofori venivano rilevati con le seguenti lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione:

GFP, eccitazione 488 nm, emissione 507 nm; TMR eccitazione 554 nm, emissione 580 nm.

Immagini Z-stacks venivano acquisite per ogni sezione orizzontale contenente il sito di iniezione e la corrispondente proiezione. Le Z-stacks venivano quindi proiettate sul piano XY per ottenere la proiezione massima, contenente l'intera ricostruzione della proiezione e del sito di iniezione. Le immagini venivano successivamente analizzate utilizzando il software ImageJ (NIH).

Per quantificare le dimensioni dell'iniezione e l'estensione della proiezione, le immagini venivano analizzate come segue: 1) l'immagine veniva convertita da RGB a 8 Bit; 2) veniva creata una soglia per l'intensità di bianco e nero; 3) veniva creata una

maschera a 8 Bit da sovrapporre all'immagine originaria; 4) una funzione di ImageJ basata sull'algoritmo di Sobel (Edge detection) veniva utilizzata per mettere in risalto i contorni dell'immagine così ottenuta; 5) la distanza tra i bordi dell'oggetto così ottenuto veniva misurata.

Il rapporto tra l'estensione della proiezione e la dimensione dell'iniezione (R P/I) veniva così calcolato. I valori dei rapporti proiezione/ iniezione per i casi di ogni gruppo sperimentale e di controllo venivano presentati come media aritmetica \pm deviazione standard.

Per calcolare la significatività statistica della popolazione si è effettuato un test di Student (t-test). La numerosità campionaria è definita dagli N. La significatività statistica è definita secondo il seguente criterio : * $0.01 < P \leq 0.05$; ** $0.001 < P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

2.5 Test comportamentali

Per valutare la capacità di discriminare odori diversi, abbiamo impiegato un test classico di discriminazione olfattiva (Schellinck et al., 2001). In breve, gli animali, controlli wild-type e Kir 2.1, maschi adulti di età compresa tra le P30 e P50, con un peso compreso tra i 20 ed i 30 grammi, venivano allenati a discriminare due odori diversi. Tre giorni prima dell'inizio del test comportamentale, gli animali venivano messi a dieta per poter mantenere il loro peso corporeo all'80-85% del peso che gli animali presentavano prima dell'inizio del test. L'acqua era disponibile ad libitum. Gli animali venivano pesati prima di iniziare il test comportamentale e in seguito tutti i giorni prima di ogni sessione dell'esperimento di comportamento.

Il test comportamentale prevede 4 giorni di allenamento e un quinto giorno di test, in cui le capacità di differenziare i due odori venivano verificate.

L'allenamento per i primi 4 giorni si svolge nel modo seguente. Giornalmente, ogni topo veniva esposto per 10 minuti , per 4 volte, ad un odore accoppiato ad una ricompensa, costituita da un grano di zucchero del peso di 0.05 grammi (stimolo condizionato – CS+). Ogni topo inoltre veniva esposto ad un secondo odore, non associato a ricompensa (stimolo non condizionato – CS-), sempre per 4 volte, ciascuna di 10 minuti. Gli stimoli condizionati e non, erano presentati in successione in modo

casuale. Un quantità di 20 μ L di odore veniva fatta assorbire su di un disco di carta da filtro (Whatman), che era successivamente posto dentro ad una capsula Petri di plastica (BD), sul cui coperchio venivano fatti 8 fori (diametro fori 2 mm). La Petri era inserita nella gabbia e nascosta all'interno della lettiera, per permettere all'animale di venire in contatto solamente con i vapori dell'odore. I due odori vengono presentati in 2 distinte gabbie ed ogni topo viene esposto in maniera casuale al CS+ oppure al CS-. Nei 4 giorni di allenamento ogni topo viene esposto a 32 prove complessive.

Il quinto giorno il topo veniva testato in un apparecchiatura costituita da una scatola di plexiglass (69 \times 20 \times 20 cm) suddivisa in 3 camere eguali e divise da 2 fogli (spessore 3 mm) di acrilico trasparente. L'accesso alle tre camere dell'apparato è libero. Nei compartimenti di destra e di sinistra vengono posti i 2 odori all'interno delle capsule Petri nascoste nella lettiera. La ricompensa in questa fase non è presente. Gli animali vengono dapprima introdotti singolarmente per 2 minuti in assenza degli odori per avere la possibilità di abituarsi al nuovo apparato a tre camere. Vengono quindi riportati nella gabbia di stabulazione per 5 minuti di riposo. Trascorso questo tempo ha luogo il test vero e proprio. Le Petri con i 2 odori vengono nascoste al di sotto dello strato di lettiera pulita, nelle camere laterali. Il topo veniva introdotto nella camera centrale e le porte a scomparsa rimosse per permettere all'animale di potersi muovere liberamente e accedere alle camere laterali all'interno dell'apparecchiatura. L'abilità del topo nel distinguere i 2 odori veniva valutata in base al tempo (secondi), registrato con un cronometro, trascorso a scavare e ad annusare in corrispondenza dell'uno o dell'altro odore, nel corso di 2 minuti totali di test. Il test discriminativo viene condotto in cieco rispetto all'operatore. Le sessioni di allenamento e di verifica vengono registrate con una telecamera per permettere l'analisi off-line.

Alla fine di ogni prova la gabbia del test viene lavata accuratamente con acqua calda per eliminare ogni traccia di eventuali odori e successivamente asciugata.

Le concentrazioni degli odori sono le seguenti: (-)carvone (6.4 M); (+)carvone (6.4 M); (-) fenchone (6.2 M); (+)fenchone (6.2 M); (-)2-eptanolo (7.03 M); (+)2-eptanolo (7.01 M); acido 2-metil-butirrico (2-MB) (9.1 M); acido ciclo-butan-carbossilico (cB) (10.4 M). Tutti gli odori sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

La numerosità campionaria è definita dagli N. Per valutare la significatività statistica del nostro approccio sperimentale ci siamo affidati al test non parametrico di Wilcoxon-

Mann-Whitney. La significatività statistica è definita secondo il seguente criterio : * $0.01 < P \leq 0.05$; ** $0.001 < P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

2.6 Modulazione dell'espressione del gene Kir2.1

Per permettere l'over-espressione del canale Kir 2.1 solamente negli adulti, abbiamo utilizzato 2 distinte procedure sperimentali.

Nel primo approccio gli animali (femmine Kir 2.1 gravide) venivano alimentati con cibo (pellet) addizionato di un antibiotico (doxiciclina) (6mg/g pellet) per tutta la durata della gestazione fino a quando la prole non è giunta a 30 giorni di vita post-natale. In questo modo veniva abolita l'espressione del transgene Kir 2.1. Iniezioni di tracciante (TMR) erano effettuate *in vivo* come descritto precedentemente, sia nei Kir 2.1 che nei controlli a 30 giorni dopo la nascita (P30).

Nella secondo approccio sperimentale, la somministrazione di doxiciclina era interrotta a 30 giorni di vita post-natali e gli animali (Kir 2.1 e controlli littermate) erano iniettati *in vivo* a 60 giorni di vita post-natale. In questo caso il gene Kir2.1 veniva espresso tra P30 e P60 . Gli animali una volta iniettati vengono fissati e processati come descritto precedentemente. L'acquisizione dei siti di iniezione e delle proiezioni avviene come descritto sopra.

Per calcolare la significatività statistica della popolazione si è effettuato un test di Student (t-test). La numerosità campionaria è definita dagli N. La significatività statistica è definita secondo il seguente criterio : * $0.01 < P \leq 0.05$; ** $0.001 < P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Per verificare la corretta espressione del transgene Kir2.1 abbiamo effettuato un saggio immunostochimico su ogni animale iniettato, sia esso un controllo littermate oppure Kir 2.1. Sezioni orizzontali (spessore 60 μm) di bulbo olfattivo (Kir 2.1 e controlli littermate a P30 e a P60) venivano bloccate con 10% di siero d'asino normale, in tampone fosfato 0.1 M (PBS) addizionato di Triton-X100 0.5%. Quindi i campioni erano incubati con anticorpo primario specifico contro β -Galattosidasi (β Gal) (1:1000, Morphosys) a 4°C overnight (12-16 ore). Le sezioni erano quindi lavate 3 volte in PBS 0.1 M e successivamente incubate con anticorpo secondario coniugato a Cy3 (1:1000, Jackson ImmunoResearch).

2.7 Immunoistochimica

Gli epiteli ed i bulbi olfattivi dei topi Kir 2.1 erano dissezionati. Gli epiteli venivano crioprotetti in una soluzione di saccarosio (30%) per un tempo non superiore ai 3 giorni a 4°C. Successivamente all'inclusione, l'epitelio olfattivo veniva tagliato in sezioni coronali (spessore 20 µm) al criostato (Leica Microsystems). I bulbi precedentemente fissati venivano tagliati in sezioni orizzontali (spessore 60 µm). I campioni così ottenuti di epitelio e bulbo olfattivo (Kir 2.1 e controlli littermate a P30) venivano bloccati con 10% di siero d'asino normale, in tampone fosfato 0.1 M (PBS) addizionato di Triton-X100 0.5%. Quindi i campioni venivano incubati con anticorpo primario specifico contro β-Galattosidasi (βGal) (1:1000, Morphosys) oppure tirosina-idrossilasi (TH) (1:400, Chemicon) a 4°C overnight (12-16 ore). Le sezioni venivano quindi lavate 3 volte in PBS 0.1 M e successivamente incubate con anticorpo secondario coniugato a Cy3 (1:1000, Jackson ImmunoResearch) oppure FITC (1:200, Jackson ImmunoResearch) ed incubate per 2 ore a temperatura ambiente. Successivamente venivano lavate 3 volte in PBS 0.1 M per lavare l'eccesso di anticorpo secondario ed incubate con marcatore nucleare (DAPI). Infine montate su vetrino.

Le sezioni orizzontali analizzate al microscopio confocale (SP5 Leica). L'obiettivo utilizzato per questo scopo è un HC PL Fluotar 20X/0.50 NA ad aria.

2.8 Soluzioni utilizzate

I preparati di emiteste e la loro iniezione avveniva in liquido cerebrospinale artificiale (ACSF) freddo a bassa concentrazione di Ca²⁺ contenente (in mM): NaCl 140, MgSO₄ 1.3, CaCl₂·2H₂O 2, KCl 1.5, KH₂PO₄ 1, Hepes 20, Glucose 25, MgCl₂ 9 (95% O₂/5% CO₂) (pH 7.4). L'incubazione dei preparati di emiteste aveva luogo in liquido cerebrospinale artificiale (ACSF) a normale concentrazione di Ca²⁺ contenente (in mM): NaCl 119, MgSO₄ 1.3, CaCl₂·2H₂O 2.5, KCl 1.5, KH₂PO₄ 1, Glucose 11, MgCl₂ 9, NaHCO₃ 26 (95% O₂/5% CO₂) (pH 7.4).

Il PBS era preparato in concentrazione 10X contenente (in mM): NaCl 137, KCl 27, Na₂HPO₄ 101.4, KH₂PO₄ 17.6 (pH 7.4).

La PFA al 4% era sciolta in PBS 0.1 M a caldo.

Tutti i reattivi utilizzati provengono dalla Sigma-Aldrich.

3. Risultati

3.1 Sviluppo dell'organizzazione topografica del bulbo olfattivo: le connessioni intrabulbari tra glomeruli omologhi

Per poter valutare l'effetto dell'attività afferente spontanea sulla proiezione intrabulbare dovuta alle cellule tufted esterne, era, in primo luogo, necessario caratterizzare lo sviluppo fisiologico delle connessioni tra i glomeruli omologhi. Gli studi precedenti si erano limitati alla descrizione di tale connessione in animali adulti (Belluscio et al., 2002; Lodovichi et al., 2003). Nelle fasi precoci di sviluppo è infatti possibile che le proiezioni delle cellule tufted esterne non siano dirette al proprio target in maniera precisa e/o che la loro estensione sia maggiore rispetto a quella osservata in età adulta, vale a dire che non siano esclusivamente confinate a un singolo glomerulo, ma più grandi. A seguito di questa possibile alterata distribuzione delle proiezioni assionali delle tufted esterne, la corrispondente mappa topografica risulterebbe essere meno definita nei primi stadi di sviluppo. Pertanto in una prima serie di esperimenti abbiamo caratterizzato lo sviluppo della connessione intrabulbare, analizzandone la morfologia in animali wild-type di età compresa tra i 7 (P7) ed i 70 (P70) giorni postnatali.

Per valutare se le proiezioni delle tufted esterne erano confinate ad un unico glomerulo o meno abbiamo effettuato iniezioni di un tracciante fluorescente anterogrado (tetrametilrodamina), limitate pressoché a un singolo glomerulo, nello strato glomerulare. Abbiamo quindi misurato il rapporto tra la lunghezza della proiezione ed il diametro del sito d'iniezione. Sappiamo da lavori precedenti che il rapporto proiezione/iniezione è pari a 1:1 in animali adulti (di età maggiore a 3-4 settimane) (Lodovichi et al., 2003). A 15 giorni postnatali (P15) abbiamo riscontrato come un'iniezione focalizzata ad un glomerulo dia luogo ad una proiezione non circoscritta a un singolo glomerulo, ma più grande (rapporto lunghezza proiezione/diametro iniezione = 2.7 ± 0.12 , n = 5, Figura 29). La proiezione intrabulbare va incontro ad un processo di refinement tra P15 e P30, quando viene raggiunto il rapporto 1:1 tra estensione della proiezione/diametro della iniezione. Dopo P30 la proiezione mantiene le sue dimensioni, di proiezione circoscritta a un singolo glomerulo. (rapporto (R) proiezione/sito d'iniezione a P30 = 1.04 ± 0.09 , n = 6; P50, R = 1.03 ± 0.03 , n = 4; P70,

$R = 1.03 \pm 0.01$, $n = 4$. T-test: P15-P30, ratio $p = 0.001^{***}$; P30-P50, ratio $p = 0.8$; P50-P70, ratio $p = 0.9$ (Figura 25 e Figura 29).

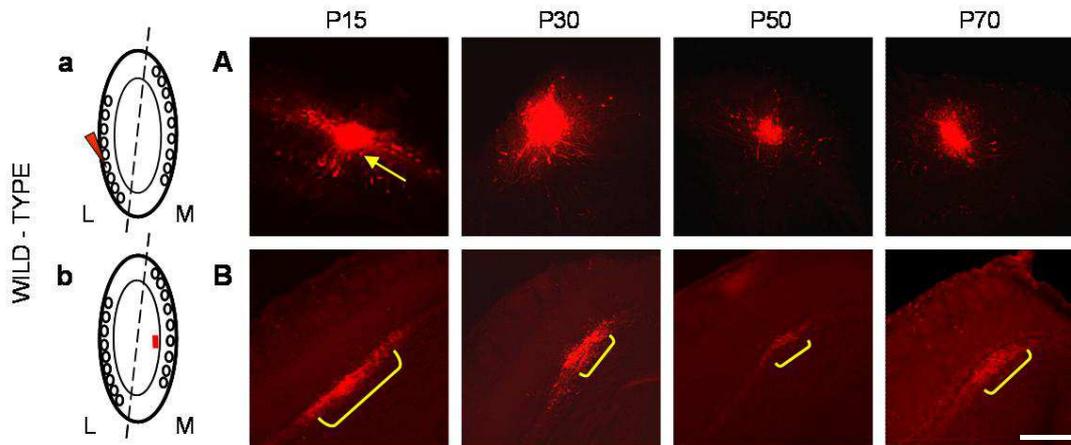


Figura 25. Sviluppo della connessione intrabulbare in animali di controllo: estensione della proiezione. **a, b**, Schemi rappresentanti sezioni orizzontali di bulbo olfattivo. La linea tratteggiata definisce l'asse di simmetria. In **a**, il triangolo rosso rappresenta l'iniezione di tracciante centrata in un glomerulo nello strato dei glomeruli. In **b**, la linea rossa indica la proiezione delle cellule tufted esterne al lato opposto dello stesso bulbo olfattivo. In **A**, esempi di piccole iniezioni centrate allo strato glomerulare da P15 a P70. La freccia indica le cellule tufted esterne marcate. In **B**, gli assoni delle cellule tufted riempiti di tracciante (**A**) terminano in una proiezione anterograda (parentesi gialle) al lato opposto dello stesso bulbo. Barra = 200 μm .

Una volta definita l'estensione della proiezione della tufted esterne nel corso dello sviluppo, era necessario stabilire se in fasi precoci tale proiezione fosse specificamente localizzata alla base del glomerulo omologo o meno.

Per poter raggiungere questo obiettivo era necessario utilizzare linee di topi in cui i glomeruli omologhi potessero essere identificati. Ci siamo pertanto avvalsi di linee di topi geneticamente modificate in cui un dato recettore olfattivo è coespresso con la green fluorescent protein (GFP). A seguito di questa manipolazione genetica l'intero neurone sensoriale olfattivo e il corrispondente glomerulo risultano verdi e pertanto facilmente identificabili.

In particolare abbiamo utilizzato la linea M71-GFP in cui i glomeruli M71 (laterale e mediale) sono situati sulla superficie dorsale del bulbo olfattivo, una regione particolarmente adatta a fare iniezioni di tracciante in vivo. Abbiamo effettuato iniezioni focali nel glomerulo M71-GFP laterale in topi di età compresa tra P15 e P70. Abbiamo osservato che, a tutte le età analizzate, la proiezione era localizzata

precisamente al di sotto del glomerulo M71-GFP mediale (isofunzionale), sebbene a P15 non fosse esclusivamente circoscritta al glomerulo stesso, ma più larga ($R = 2.7 \pm 0.35$, $n = 6$). Anche in questo caso abbiamo osservato un processo di refinement, tra P15 e P30, quando il rapporto tra estensione della proiezione/diametro iniezione diviene pari a 1 (P30, $R = 1.03 \pm 0.04$, $n = 6$; P50, $R = 1.01 \pm 0.03$, $n = 3$; P70, $R = 1.03 \pm 0.001$, $n = 4$. T-test: P15-P30, ratio $p < 0.001^{***}$; P30-P50, ratio $p = 0.4$; P50-P70, ratio $p = 0.9$ Figura 26 e Figura 29).

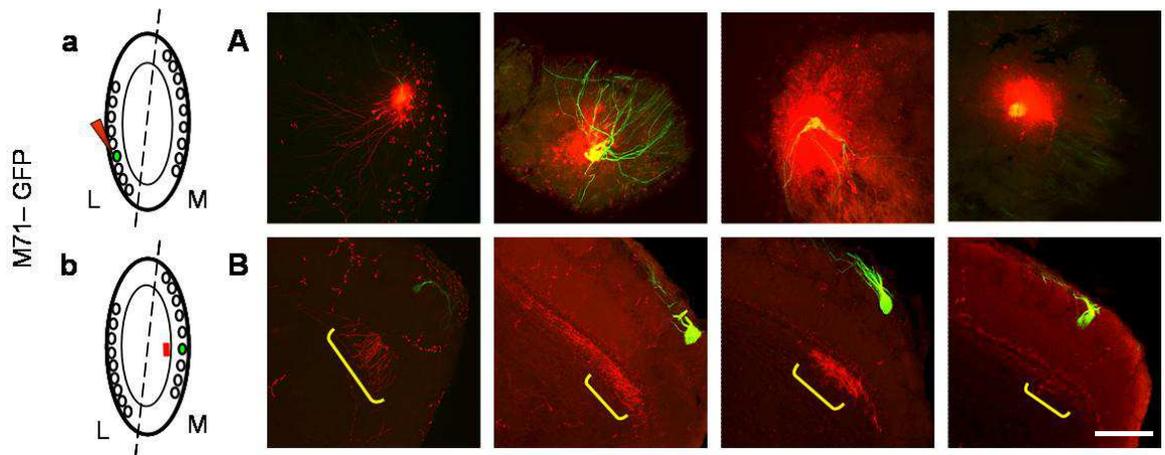


Figura 26. Sviluppo della connessione tra glomeruli omologhi (M71) in animali di controllo: specificità della localizzazione della proiezione. **a, b**, Schemi rappresentanti sezioni orizzontali di bulbo olfattivo. La linea tratteggiata definisce l'asse di simmetria. In **a**, il triangolo rosso rappresenta l'iniezione di tracciante centrata al glomerulo M71. In **b**, la linea rossa indica la proiezione delle cellule tufted esterne sotto al glomerulo isofunzionale, sul lato opposto dello stesso bulbo olfattivo. In **A**, esempi di piccole iniezioni centrate al glomerulo M71-GFP da P15 a P70. In **B**, gli assoni delle cellule tufted esterne riempiti di tracciante (**A**) terminano in una proiezione anterograda (parentesi gialle) al di sotto del glomerulo omologo M71-GFP sul lato opposto dello stesso bulbo olfattivo. Barra = 200 μm .

Per stabilire se la specificità della connessione intrabulbare fosse presente anche in altri glomeruli, associati a diversi recettori olfattivi (vedi introduzione), abbiamo utilizzato un'altra linea di topi transgenici in cui il recettore P2 è coespresso con GFP, P2-GFP. I glomeruli P2 non sono localizzati sulla superficie dorsale bensì sul lato mediale del bulbo olfattivo, che non è raggiungibile *in vivo*. Per ovviare a questo inconveniente, le iniezioni sono state effettuate su un preparato *ex vivo*, il preparato di emitesta. Questo preparato risulta dalla sezione sagittale della testa dell'animale, cosicché il lato mediale

del bulbo viene esposto mantenendo le sue connessioni con l'epitelio olfattivo ed il cervello (Figura 27) (Lodovichi et al., 2003).

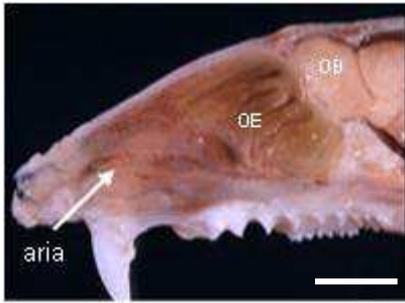


Figura 27. Preparato di emitesta. La testa di topo viene tagliata sagittalmente; si può apprezzare la continuità delle connessioni del sistema olfattivo (epitelio, bulbo e corteccia). OE = epitelio olfattivo; OB = bulbo olfattivo. Barra = 1 mm.

Studi precedenti (Royal e Key, 1999), hanno mostrato come i glomeruli P2 si sviluppano precocemente. Abbiamo pertanto iniziato a studiare lo sviluppo della connessione intrabulbare in topi P2-GFP da P7. Anche in questo caso, a tutti i punti temporali analizzati, le proiezioni assionali delle cellule tufted esterne terminano specificamente al di sotto del glomerulo omologo, sebbene a stadi precoci dello sviluppo post-natale la proiezione sia più ampia (rapporto (R) proiezione/sito d'iniezione a P7 = 4.8 ± 0.6 , n = 3; P15, R = 2.7 ± 0.09 , n = 4 Figura 26), raggiungendo il rapporto 1:1 a P30 (R = 1.03 ± 0.03 , n = 3. T-test: P7-P15, ratio p < 0.001***; P15-P30, ratio p < 0.001*** Figura 28 e Figura 29).

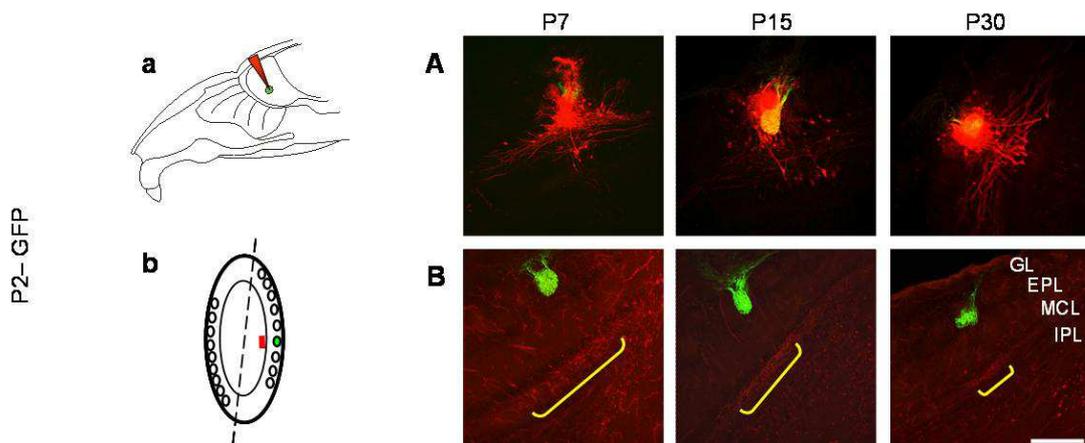


Figura 28. Sviluppo della connessione tra glomeruli omologhi (P2-GFP) in animali di controllo: specificità della connessione. a, b, Schemi rappresentanti la preparazione di emitesta. La linea tratteggiata definisce l'asse di simmetria. In a, il triangolo rosso rappresenta l'iniezione di tracciante

centrata nel glomerulo P2-GFP. In **b**, la linea rossa indica la proiezione delle cellule tufted esterne sotto al glomerulo isofunzionale, sul lato opposto dello stesso bulbo olfattivo. In **A**, esempi di piccole iniezioni centrate nel glomerulo mediale P2-GFP da P7 a P30. In **B**, gli assoni delle cellule tufted esterne riempiti di tracciante (**A**) terminano in una proiezione anterograda (parentesi gialle) al di sotto del glomerulo omologo laterale, nello stesso bulbo olfattivo. GL = strato dei glomeruli; EPL = strato plessiforme esterno; MCL = strato delle cellule mitrali; IPL = strato plessiforme interno. Barra = 200 μ m.

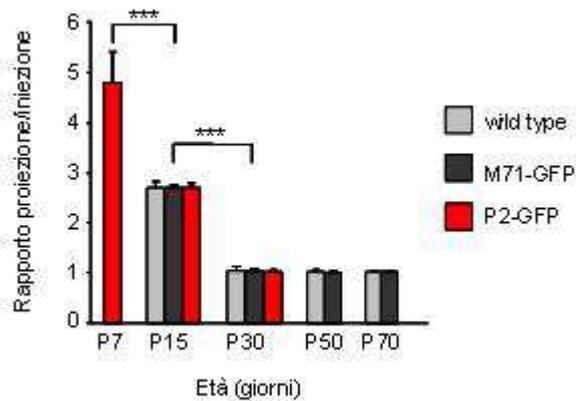


Figura 29. Grafico riassuntivo. Sviluppo della connessione intrabulbare tra glomeruli omologhi. I dati vengono presentati come media aritmetica \pm deviazione standard.

3.2 Ruolo dell'attività afferente spontanea nello sviluppo dell'organizzazione topografica del bulbo olfattivo

Per poter valutare il ruolo dell'attività afferente spontanea nella formazione della circuiteria intrabulbare abbiamo sfruttato una linea di topi in cui tutti i neuroni sensoriali olfattivi over-esprimono uno specifico canale potassio inward-rectifier, Kir 2.1. L'iperpolarizzazione dei neuroni sensoriali, ottenuta mediante questa manipolazione genetica, provoca l'abolizione dell'attività elettrica spontanea pur mantenendo l'attività evocata (come dimostrato da esperimenti di imaging funzionale e comportamento condotti nel nostro laboratorio). Abbiamo effettuato delle iniezioni focali di tracciante fluorescente nello strato dei glomeruli in topi di età ≥ 30 giorni postnatali (P30), età in cui la connessione punto a punto tra glomeruli omologhi è presente e già completamente matura negli animali di controllo (vedi sopra e Lodovichi et al., 2003). A tutti i punti temporali analizzati, compresi tra P30 e P70, una piccola iniezione di tracciante,

circoscritta a un unico glomerulo, dà luogo ad una proiezione non confinata ad un unico glomerulo, ma più larga (Figura 30). Sebbene abbiamo osservato una riduzione nel rapporto tra proiezione/sito d'iniezione tra P30 e P70, tale rapporto non raggiunge mai il valore 1 come negli animali di controllo (P30 $R = 2.33 \pm 0.1$, $n = 9$; P50 $R = 2 \pm 0.05$, $n = 5$; P70 $R = 1.92 \pm 0.13$, $n = 3$. T-test: Kir 2.1 P30-P50, ratio $p < 0.001^{***}$; Kir 2.1 P50-P70, ratio = $p 0.3$; P30 wt-P30 Kir 2.1, ratio $p < 0.001^{***}$; P50 wt-P50 Kir 2.1, ratio $p < 0.001^{***}$; P70 wt-P70 Kir 2.1 ratio $p < 0.001^{***}$ Figura 30 e Figura 32).

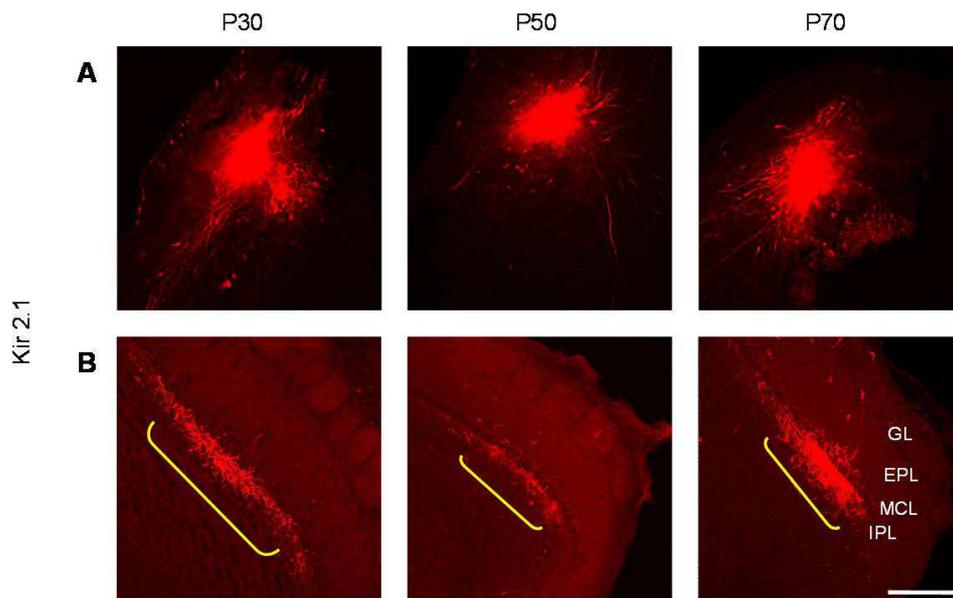


Figura 30. L'assenza di attività spontanea impedisce la corretta maturazione della connessione intrabulbare. In A, esempi di piccole iniezioni focalizzate a livello dello strato dei glomeruli da P30 a P70. In B, gli assoni delle cellule tufted esterne riempiti di tracciante (A) terminano in una proiezione anterograda (parentesi gialle) nel lato opposto dello stesso bulbo olfattivo. GL = strato dei glomeruli; EPL = strato plessiforme esterno; MCL = strato delle cellule mitrali; IPL = strato plessiforme interno. Barra = 200 μm .

Abbiamo quindi studiato se l'assenza di attività afferente spontanea potesse influenzare la specifica localizzazione della proiezione alla base del glomerulo omologo. Per raggiungere questo obiettivo linee di topi Kir 2.1 sono state incrociate con i topi P2-GFP e le iniezioni effettuate nei glomeruli P2-GFP mediali. I dati ottenuti dimostrano che una iniezione circoscritta al glomerulo P2-GFP mediale dà luogo a una proiezione localizzata esattamente in corrispondenza del glomerulo P2-GFP laterale, che per estensione non è circoscritta esclusivamente al glomerulo P2-GFP ma più grande (P30

R = 2.37 ± 0.08 , n = 6, T-test: Kir 2.1 x P2-GFP vs P2-GFP ratio p < 0.001***; Kir 2.1 x P2-GFP vs Kir 2.1 ratio = 0.5 (Figura 31 e Figura 32).

Kir 2.1 x P2-GFP

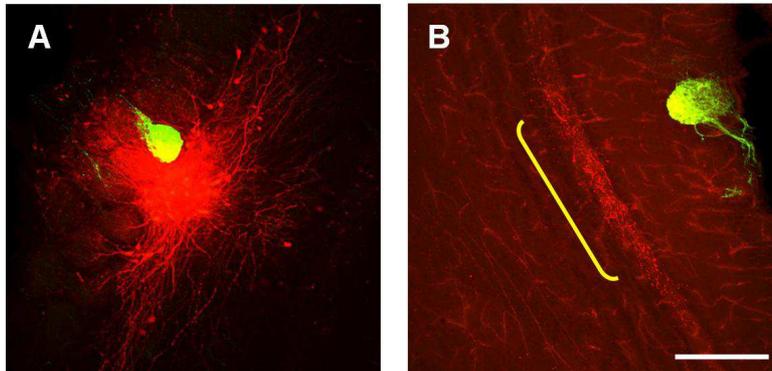


Figura 31. L'assenza di attività spontanea impedisce la corretta maturazione della connessione intrabulbare pur mantenendo il targeting tra glomeruli omologhi. In **A**, una piccola iniezione targettata al glomerulo P2-GFP in animali P2-GFP x Kir 2.1 a P30. In **B**, gli assoni delle cellule tufted esterne riempiti di tracciante (**A**) terminano in una proiezione anterograda (parentesi gialle) nel lato opposto dello stesso bulbo olfattivo al di sotto del glomerulo isofunzionale P2-GFP, laterale. Barra = 200 μ m.

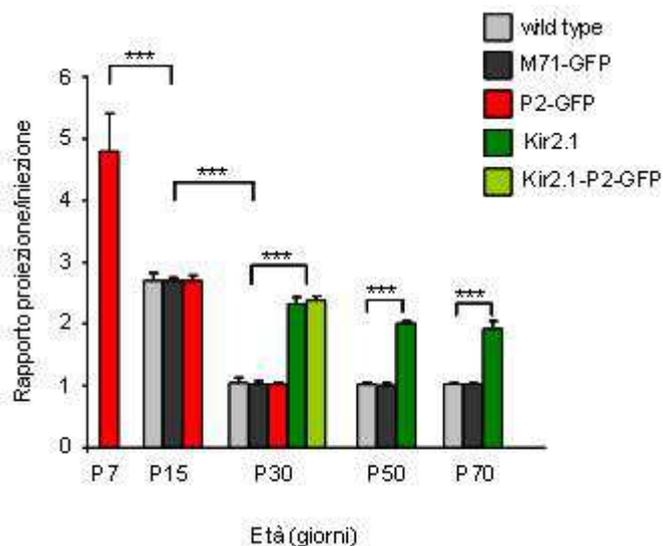


Figura 32. Grafico riassuntivo. Sviluppo della connessione intrabulbare tra glomeruli omologhi in animali in cui l'attività spontanea è abolita. I valori vengono presentati come media aritmetica \pm deviazione standard.

Non abbiamo potuto valutare l'effetto dell'abolizione dell'attività spontanea sulla connessione tra i glomeruli M71-GFP nella linea di topi M71 x Kir 2.1 in quanto abbiamo dimostrato (Nelly Redolfi, nel laboratorio Lodovichi) che in assenza di attività afferente spontanea i glomeruli M71-GFP sono significativamente più piccoli. Abbiamo riscontrato che la riduzione delle dimensioni dei glomeruli M71 rendeva tecnicamente impossibile identificare e fare iniezioni ripetibili in questa linea di animali.

Questi dati presi complessivamente indicano che la connessione tra i glomeruli omologhi è specificamente mantenuta in assenza di attività spontanea afferente, sebbene non sia più confinata in maniera esclusiva tra i glomeruli isofunzionali, ma sia più estesa. Questa alterazione sembra ascrivibile al mancato processo di refinement delle proiezioni assionali delle cellule tufted esterne, che abbiamo dimostrato avere luogo tra P15 e P30 negli animali di controllo.

3.3 Conseguenze funzionali – comportamentali delle alterazioni dell'organizzazione topografica del bulbo olfattivo

I dati da noi ottenuti (esposti nei paragrafi precedenti) dimostrano che in assenza di attività afferente spontanea, la mappa topografica del bulbo olfattivo, legata alla connessione tra glomeruli omologhi si forma, ma non è circoscritta esclusivamente ai glomeruli isofunzionali, ma più grande. Sappiamo che un glomerulo definisce una unità funzionale, la colonna odorosa (vedi introduzione precedente), che svolge un ruolo chiave nella elaborazione della informazione sensoriale.

Ci siamo quindi chiesti quali conseguenze potesse avere la alterata organizzazione topografica del bulbo olfattivo nella elaborazione della informazione sensoriale.

Per poter rispondere a questa domanda abbiamo deciso di studiare il comportamento olfattivo dei topi privi di attività afferente spontanea, in particolare la capacità di discriminare odori diversi.

Il tipo di difetto topografico che abbiamo rilevato nei topi Kir 2.1 è piuttosto circoscritto. Infatti la connessione intrabulbare non è confinata a un singolo glomerulo ma si estende a due o tre glomeruli adiacenti al glomerulo principale di interesse. Abbiamo quindi ipotizzato che gli animali Kir 2.1 possano avere difficoltà nella

discriminazione di odori che attivano un pattern di glomeruli dislocati in un'area molto circoscritta, come succede per esempio nel caso degli enantiomeri.

Gli enantiomeri, coppie di molecole chimiche che differiscono esclusivamente per l'attività ottica del carbonio chirale, sono rappresentate da mappe olfattive funzionali molto simili, che differiscono solamente per uno o alcuni glomeruli attivati, i quali sono localizzati in un'area ristretta (Rubin e Katz, 2001). I roditori sono in grado di discriminare gli elementi che costituiscono le coppie di enantiomeri. Questi studi hanno dimostrato (utilizzando metodiche di imaging funzionale) che il pattern spaziale di attività glomerulare, tipico e specifico per ogni elemento di una coppia di enantiomeri, fornisce sufficienti informazioni per poter discriminare la conformazione sterica di una molecola, e pertanto per potere distinguere i singoli elementi di una coppia di enantiomeri (Linster et al., 2001; Rubin e Katz, 2001; Kobayakawa et al., 2007; Clarin et al., 2010; Mori e Sakano, 2011; Murthy, 2011).

Abbiamo quindi deciso di studiare la capacità dei topi Kir 2.1 di discriminare gli elementi di varie coppie di enantiomeri, utilizzando un classico test di discriminazione olfattiva (Schellink, 2001).

I topi sono stati allenati per 4 giorni a imparare a discriminare tra due odori di cui uno è accoppiato ad una ricompensa (stimolo condizionato) e l'altro non accoppiato a ricompensa (stimolo non condizionato). La ricompensa è rappresentata da un granello di zucchero.

Il quinto giorno gli animali sono testati, per valutare se hanno imparato a discriminare i due odori. Gli animali vengono introdotti nella camera centrale di un apparato costituito da tre camere, in cui l'accesso alle camere laterali è libero. Gli odori verso i quali i topi sono stati allenati nei 4 giorni di allenamento sono nascosti nelle camere laterali, rispettivamente, e la ricompensa non è presente. La capacità di riconoscere l'odore condizionato, viene valutata come il tempo speso a scavare e annusare (digging time) in prossimità dell'odore condizionato, su un tempo massimo di test di due minuti (Figura 33). Gli animali capaci di discriminare i due odori passano la maggior parte del tempo presso l'odore condizionato, che nella fase di allenamento era associato alla ricompensa. I risultati che abbiamo ottenuto dimostrano che i topi che over-esprimono il canale Kir 2.1 sono incapaci di discriminare tra due odori che danno luogo a mappe funzionali molto simili, come le coppie di enantiomeri 2-eptanolo(+) e (-), fenchone (+) e (-) e carvone (+) e (-).

Quando tuttavia i topi Kir 2.1 sono stati esaminati per studiare le loro capacità di discriminare odori che danno luogo a mappe funzionali molto diverse, vale a dire odori che attivano un pattern di glomeruli che sono localizzati nel bulbo in sedi molto lontane uno rispetto all'altro, quali l'acido 2-metilbutirrico e l'acido ciclobutancarbossilico (2-MB e cB), abbiamo visto che i topi Kir 2.1 mantenevano la capacità di discriminare questi stimoli odorosi (Figura 33).

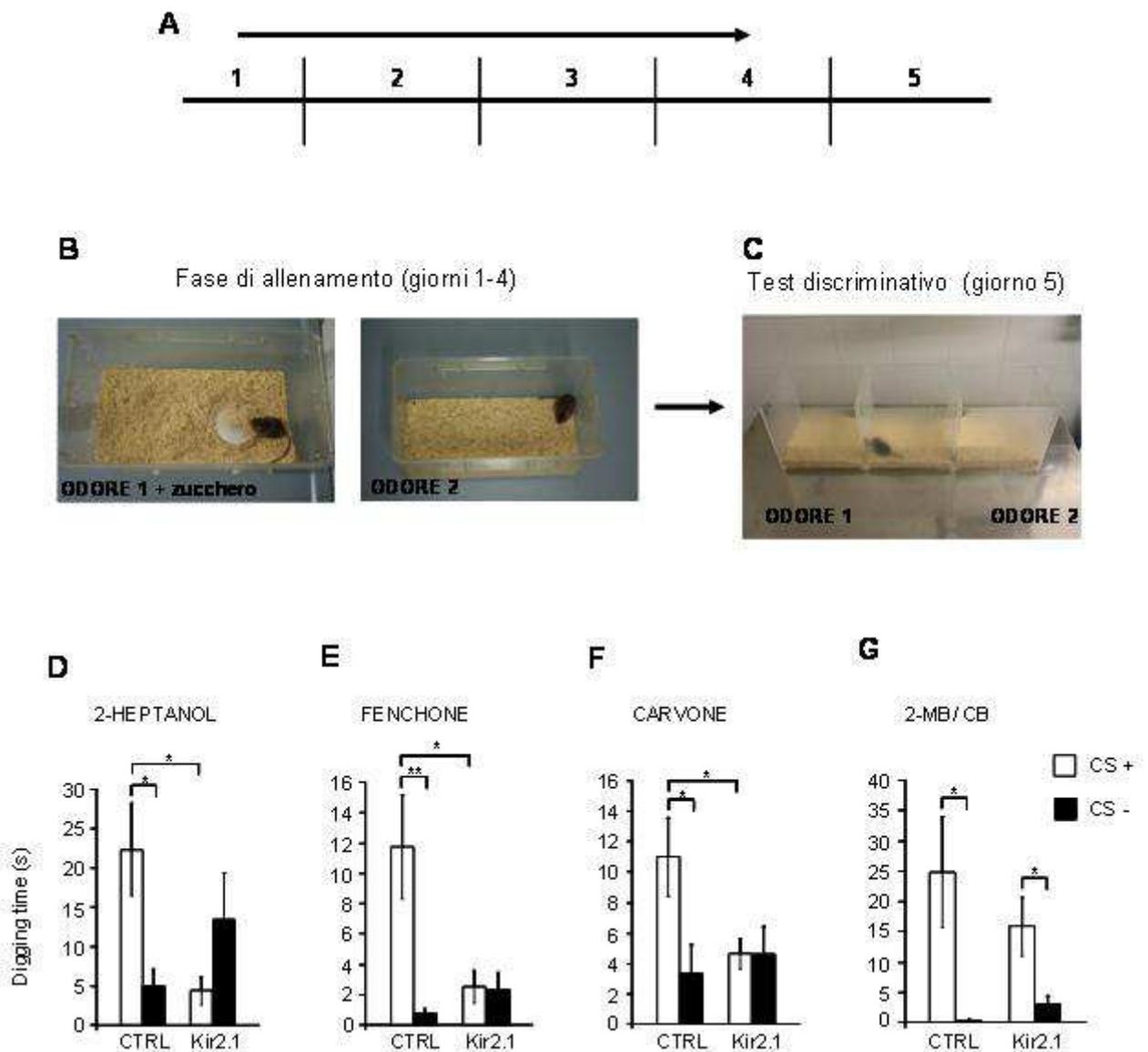


Figura 33. Comportamento olfattivo in animali di controllo vs. Kir 2.1. A, rappresentazione schematica del paradigma comportamentale. B, gli animali di controllo ed i Kir 2.1 vengono allenati per 4 giorni a discriminare tra odori condizionati (odore 1 + zucchero, CS+) ed odori non condizionati (odore 2, CS-). Al quinto giorno (C) gli animali vengono testati in un apparato diviso in tre camere e viene

misurato il tempo medio speso a scavare ed annusare presso l'uno o l'altro odore. **D-G**, tempo medio per ogni coppia di odore testato. I dati vengono presentati come media aritmetica \pm deviazione standard.

3.4 Ruolo dell'attività afferente spontanea nel mantenimento della topografia del bulbo olfattivo

L'attività spontanea è ritenuta svolgere un ruolo preponderante nella maturazione dei circuiti neurali soprattutto nel corso degli stadi precoci dello sviluppo (Goodman and Shatz, 1993; Huberman et al., 2008). Una volta che il sistema sensoriale diventa responsivo agli stimoli ambientali, l'attività evocata contribuisce alla stabilizzazione ed al successivo refinement delle connessioni neuronali (Katz e Shatz, 1996; Hensch, 2004).

Se e come l'attività spontanea possa modulare le connessioni sinaptiche nella vita adulta, rimane da scoprire.

Per poter rispondere a questo quesito abbiamo sfruttato la natura inducibile del nostro costrutto Kir 2.1. Gli animali sperimentali sono stati divisi in due gruppi, in relazione al trattamento. In un gruppo di animali sperimentali, l'espressione del canale potassio Kir 2.1 è stata silenziata mediante la somministrazione di doxiciclina (nel cibo degli animali) nel corso della gestazione e nei primi 30 giorni di vita post-natale (P30)(Figura 34A). In un secondo gruppo di animali, a P30, veniva sospeso il trattamento farmacologico di doxiciclina permettendo la ri-espressione del canale Kir 2.1 sino a P60 (Figura 34H). Nel primo gruppo sperimentale, una piccola iniezione di tracciante anatomico veniva eseguita allo strato dei glomeruli, a P30, in topi Kir2.1 e nei controlli. Gli assoni delle cellule tufted esterne così marcate davano da luogo ad una piccola proiezione, confinata ad un singolo glomerulo, sul lato opposto dello stesso bulbo olfattivo (P30, wild-type + doxiciclina $R = 1.01 \pm 0.03$, $n = 3$; P30, Kir 2.1 + doxiciclina $R = 1.1 \pm 0.09$, $n = 3$. T-test: Kir 2.1 vs wild-type, ratio = $p 0.2$ Figura 35). Come mostrato nella figura 34G, il trattamento con doxiciclina abolisce completamente l'espressione del gene Kir 2.1.

Nel secondo gruppo sperimentale, un'iniezione focalizzata allo strato dei glomeruli veniva eseguita a P60, nei topi Kir 2.1 e nei controlli. Le cellule tufted esterne in questo caso davano luogo a una proiezione più estesa nei topi Kir 2.1 rispetto ai controlli. Analizzando la proiezione delle cellule tufted esterne, in questo caso abbiamo osservato che essa risultava essere più estesa negli animali sperimentali (in cui il canale Kir 2.1 era stato over-espresso tra P30 e P60) rispetto ai controlli (P60, wild-type $R = 1.1 \pm 0.09$, $n = 3$; P60, Kir 2.1 $R = 1.8 \pm 0.2$, $n = 3$. T-test: Kir 2.1 vs wild-type, ratio = $p = 0.002^{**}$ Figura 35).

L'interruzione nella somministrazione di doxiciclina da P30 a P60 è stata sufficiente ad indurre una forte ri-espressione del transgene (Kir 2.1), come evidenziato nella figura 34N.

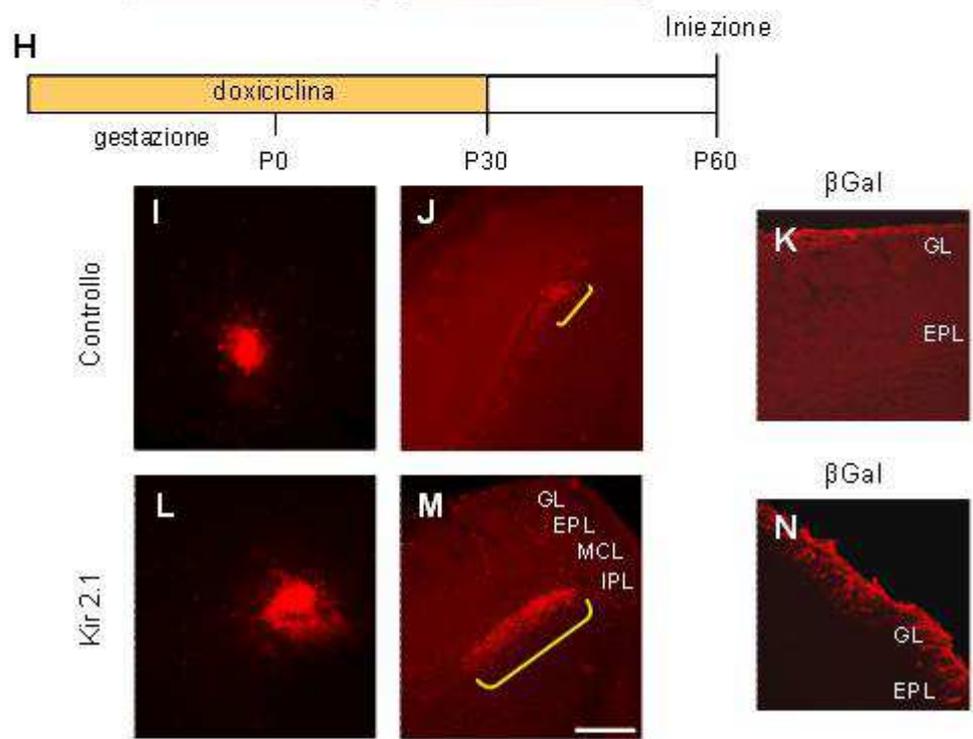
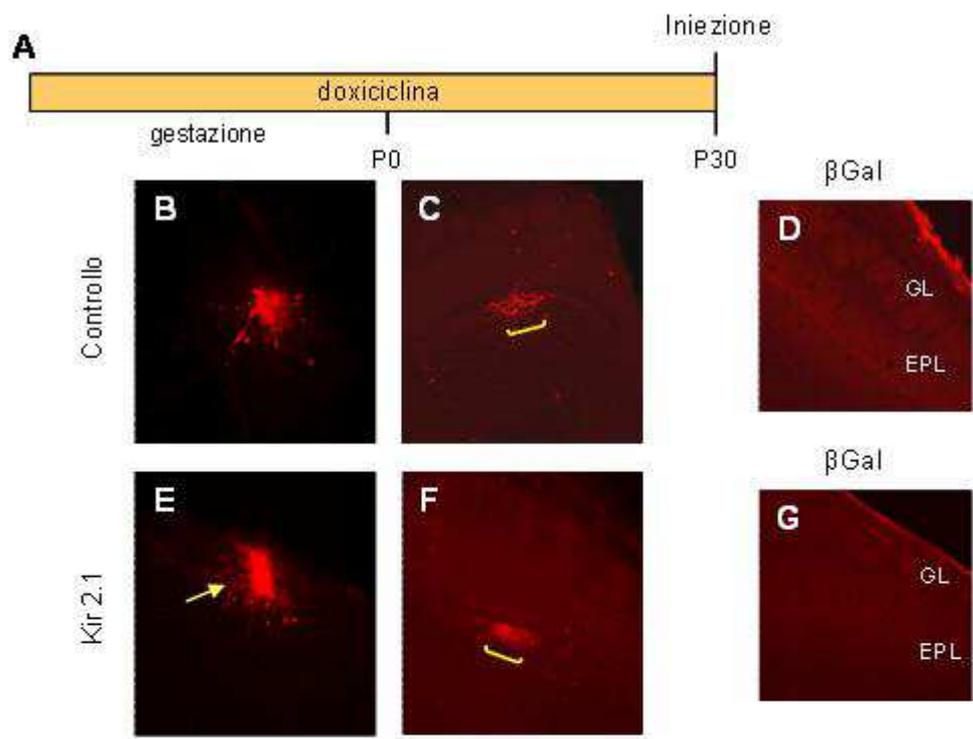


Figura 34. L'attività spontanea è necessaria per il mantenimento delle corrette connessioni nel bulbo olfattivo adulto. **A**, rappresentazione schematica della strategia sperimentale. La doxiciclina è somministrata con il cibo per tutta la durata della gestazione fino a 30 giorni post-natali. **D** e **G** sezioni orizzontali di bulbo olfattivo marcate con anticorpi contro beta-galattosidasi (Bgal) in animali di controllo (**D**) e in animali Kir 2.1 (**G**), entrambi trattati con doxiciclina. Nel Kir 2.1 l'espressione del transgene è abolita. **B** e **C**, esempi di iniezioni di tracciante fluorescente nello strato dei glomeruli nel controllo (**B**) e nel Kir 2.1 (**C**), ed in **E** e **F** la corrispondente proiezione (parentesi gialle) nel lato opposto dello stesso bulbo olfattivo. La freccia indica le cellule tufted esterne marcate. **H**, rappresentazione schematica della strategia sperimentale. La somministrazione di doxiciclina è sospesa a P30 e l'iniezioni vengono effettuate a P60, per permettere la ri-espressione del Kir 2.1 tra P30 e P60. **K** e **N** esempi di sezioni orizzontali di bulbo olfattivo marcate con anticorpi contro Bgal in animali di controllo (**K**) e Kir 2.1 (**N**). Nel Kir 2.1 (**N**) il transgene è fortemente ri-espresso, come evidenziato dalla reazione immunohistochimica. **I** e **J** esempi di iniezioni di tracciante fluorescente nello strato dei glomeruli in animali di controllo (**I**) e Kir 2.1 (**J**) e le corrispondenti proiezioni, in animali di controllo (**L**) e Kir 2.1 (**M**). Barra = 200 μ m. GL = strato dei glomeruli; EPL = strato plessiforme esterno; MCL = strato delle cellule mitrali; IPL = strato plessiforme interno.

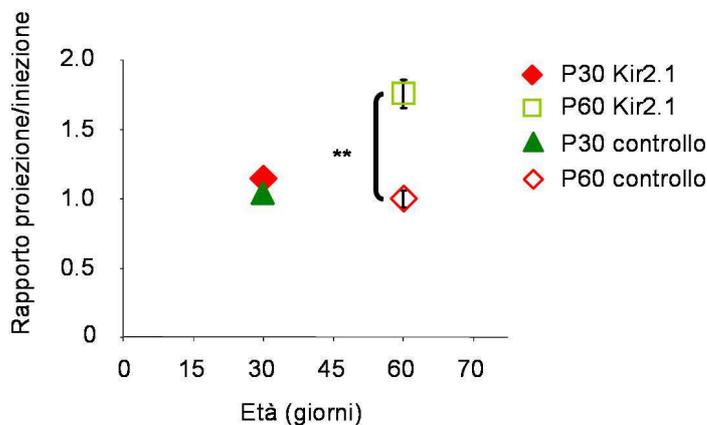


Figura 35. Grafico riassuntivo. La proiezione intrabulbare tra glomeruli omologhi in animali adulti trattati con doxiciclina secondo i due paradigmi sperimentali, spiegati nel testo. I dati vengono presentati come media aritmetica \pm deviazione standard.

4. Discussione

4.1 Ruolo dell'attività spontanea nella formazione della topografia del bulbo olfattivo

In questo lavoro di tesi abbiamo studiato il ruolo dell'attività spontanea nella formazione e nel mantenimento della topografia del bulbo olfattivo, analizzando in specifico la connessione intrabulbare tra glomeruli omologhi. Per poter investigare il ruolo dell'attività spontanea abbiamo sfruttato un modello animale in cui grazie all'over-espressione di uno specifico canale potassio inward-rectifier, Kir 2.1, sotto il promotore di OMP (olfactory marker protein), tutti i neuroni sensoriali olfattivi sono iperpolarizzati e l'attività spontanea fortemente ridotta (Yu et al., 2004).

I risultati ottenuti nel nostro studio sullo sviluppo della connessione intrabulbare dimostrano che la attività afferente spontanea non istruisce la formazione di questo circuito, ma permette il suo refinement. In assenza di attività spontanea la connessione tra glomeruli omologhi si forma ma non è circoscritta a un unico glomerulo, bensì più grande. Manca il processo di ri-arrangiamento della connessione che nei controlli abbiamo dimostrato verificarsi tra P15 e P30. La connessione mantiene pertanto una morfologia immatura, propria di stadi precoci di sviluppo.

Le proiezioni assionali delle cellule tufted esterne risultano non circoscritte a un singolo glomerulo anche in caso di manipolazione della attività evocata (Marks et al., 2006). In questo caso non sembra esserci un mancato refinement, ma piuttosto un vero e proprio ingrandimento delle proiezioni delle cellule tufted esterne che risultano molto più estese di quelle osservate da noi a seguito di manipolazione della attività spontanea.

Sebbene i meccanismi molecolari che sottostanno al refinement dei circuiti neurali non siano ancora completamente compresi, possiamo avanzare varie ipotesi che possono contribuire a chiarire tale processo.

1) l'abolita attività spontanea dei neuroni sensoriali olfattivi implica una ridotta comunicazione con le cellule post sinaptiche, tra cui le cellule tufted esterne. I ridotti livelli di attività elettrica possono avere ripercussioni sui livelli dei secondi messaggeri, Ca^{2+} e nucleotidi ciclici, sia nei neuroni sensoriali che nelle cellule tufted esterne. Il Ca^{2+} e i nucleotidi ciclici sono noti svolgere un ruolo chiave nel processo di axon targeting in

molti tipi neuronali (Gomez e Spitzer, 1998; Huber et al., 2003; Gomez e Zheng, 2006). Per tanto il persistere di proiezioni errate delle cellule tufted esterne potrebbe ricondursi a questo processo. E' da ricordare che il Ca^{2+} e i nucleotidi ciclici esplicano la loro funzione sull'allungamento e targeting assonale non solo a livello del cono di crescita degli assoni ma anche a livello nucleare, modulando l'espressione di geni (Wang e Reed, 1993) coinvolti nella axon guidance.

2) l'attività spontanea potrebbe modulare il rilascio di fattori neurotrofici, nella competizione attività dipendente che si instaura tra terminazioni assonali coinvolte nella formazione di contatti sinaptici (Bonhoeffer, 1996; Thoenen, 1995).

4.2 Ripercussioni sull'elaborazione dell'informazione sensoriale e sul comportamento olfattivo, in animali privi di attività afferente spontanea

La specificità delle connessioni sinaptiche nelle mappe sensoriali è essenziale per tradurre l'esperienza sensoriale in un codice neurale, che in ultima istanza guida il comportamento dell'animale.

Analizzando il comportamento olfattivo dei topi Kir2.1 e controlli, abbiamo mostrato che i Kir2.1 non riescono a discriminare odori che danno luogo a mappe funzionali simili per la distribuzione spaziale dei glomeruli attivati, quali gli enantiomeri. Mentre mantengono la capacità di discriminare odori che danno luogo a mappe funzionali ben distinte, in cui i glomeruli attivati sono spazialmente lontani e in posizioni molto differenti nell'una e nell'altra mappa, l'acido 2-metilbutirrico e l'acido ciclobutancarbossilico (2-MB e cB).

I risultati che abbiamo ottenuto con gli esperimenti di comportamento sembrano riflettere con notevole precisione le alterazioni anatomiche rilevate a carico della organizzazione topografica, in particolare la connessione intrabulbare. Abbiamo mostrato come la connessione tra glomeruli omologhi, per quanto sussista in assenza di attività afferente spontanea, non è circoscritta ad un singolo glomerulo, ma si estende a due/tre glomeruli vicini. Il difetto anatomico è pertanto circoscritto a un piccolo numero di glomeruli contigui.

I risultati da noi ottenuti confermano che le mappe funzionali dovute a uno specifico gruppo di glomeruli attivati contengono informazioni sufficienti a permettere la discriminazione degli odori. L'alterazione di queste mappe, che può risultare, come nel caso da noi studiato, da un'alterazione della topografia del bulbo, inficia le capacità discriminative degli animali.

Come abbiamo esposto nella introduzione, la colonna odorosa costituisce una unità funzionale per la elaborazione della informazione sensoriale. La perdita della fine geometria della mappa topografica, osservata nei topi Kir 2.1 sia a livello di mappa sensoriale (Nelly Redolfi, laboratorio Lodovichi) sia dai miei dati sulla connessione intrabulbare, risulta avere ripercussioni sulle capacità discriminative olfattiva dell'animale.

4.3 Ruolo dell'attività afferente spontanea nel mantenimento della topografia del bulbo olfattivo

L'esperienza sensoriale regola la formazione dei circuiti nervosi soprattutto in un periodo dello sviluppo, detto periodo critico, in cui il cervello è particolarmente plastico (Hensch, 2004). Oltre questo "periodo critico" la capacità del circuito di rispondere a modificazioni della esperienza sensoriale con corrispondenti modificazioni nella connettività si attenua significativamente. Il sistema olfattivo rappresenta un'eccezione a questa regola, in quanto modulazioni dell'attività evocata effettuate anche in età adulta possono modificare le fini geometrie dell'organizzazione topografica del bulbo olfattivo, in particolare la connessione intrabulbare (Cummings e Belluscio, 2010).

Se e come l'attività afferente spontanea sia in grado di modificare la circuiteria neuronale in età adulta rimane ancora da essere capito. Studi precedenti, svolti per lo più nel sistema visivo, hanno mostrato come l'attività spontanea giochi un ruolo prominente in fasi molto precoci dello sviluppo. Una volta che il sistema sensoriale è maturo, la attività sensoriale evocata regola il processo di stabilizzazione e ri-arrangiamento delle connessioni sinaptiche. Il sistema olfattivo sembra differire da questo paradigma per molteplici aspetti. Studi precedenti hanno mostrato come il sistema olfattivo non presenti un periodo critico (Cummings e Belluscio, 2010).

I dati da noi ottenuti dimostrano che manipolazioni della sola attività afferente spontanea in età adulta possono alterare le connessioni neurali già mature e indurre una regressione verso una morfologia propria di stadi precoci dello sviluppo. Questi dati indicano che la attività afferente spontanea è necessaria per mantenere la morfologia dei circuiti neuronali in età adulta.

Questi risultati interessanti per capire la fisiologia del sistema olfattivo in sé, aprono molti quesiti su un possibile ruolo simile della attività spontanea in altri sistemi sensoriali. Possono inoltre contribuire a comprendere i meccanismi sottesi a patologie in cui l'attività afferente spontanea è compromessa.

Bibliografia

- Adrian, E. D. (1941). "Afferent discharges to the cerebral cortex from peripheral sense organs." J Physiol **100**(2): 159-191.
- Antal, M., et al. (2006). "External tufted cells in the main olfactory bulb form two distinct subpopulations." Eur J Neurosci **24**(4): 1124-1136.
- Araneda, R. C., et al. (2000). "The molecular receptive range of an odorant receptor." Nat Neurosci **3**(12): 1248-1255.
- Barnea, G., et al. (2004). "Odorant receptors on axon termini in the brain." Science **304**(5676): 1468.
- Belluscio, L., et al. (1998). "Mice deficient in G(olf) are anosmic." Neuron **20**(1): 69-81.
- Belluscio, L. and L. C. Katz (2001). "Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs." J Neurosci **21**(6): 2113-2122.
- Belluscio, L., et al. (2002). "Odorant receptors instruct functional circuitry in the mouse olfactory bulb." Nature **419**(6904): 296-300.
- Bonhoeffer, T. (1996). "Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex." Curr Opin Neurobiol **6**(1): 119-126.
- Bonhoeffer, T. and A. Grinvald (1993). "The layout of iso-orientation domains in area 18 of cat visual cortex: optical imaging reveals a pinwheel-like organization." J Neurosci **13**(10): 4157-4180.
- Bonhoeffer, T. and A. Grinvald (1993). "Optical imaging of the functional architecture in cat visual cortex: the layout of direction and orientation domains." Adv Exp Med Biol **333**: 57-69.
- Borisy, F. F., et al. (1992). "Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons." J Neurosci **12**(3): 915-923.
- Boyd, J. G., et al. (2005). "Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord." FASEB J **19**(7): 694-703.
- Bozza, T., et al. (2002). "Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system." J Neurosci **22**(8): 3033-3043.
- Bozza, T., et al. (2004). "In vivo imaging of neuronal activity by targeted expression of a genetically encoded probe in the mouse." Neuron **42**(1): 9-21.
- Breipohl, W., et al. (1974). "Topological relations between the dendrites of olfactory sensory cells and sustentacular cells in different vertebrates. An ultrastructural study." J Anat **117**(Pt 1): 89-94.

- Brunet, L. J., et al. (1996). "General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel." Neuron **17**(4): 681-693.
- Buck, L. and R. Axel (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition." Cell **65**(1): 175-187.
- Buck, L. B. (1992). "The olfactory multigene family." Curr Opin Neurobiol **2**(3): 282-288.
- Buck, L. B. (1992). "The olfactory multigene family." Curr Opin Genet Dev **2**(3): 467-473.
- Caggiano, M., et al. (1994). "Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus." Neuron **13**(2): 339-352.
- Calof, A. L. and D. M. Chikaraishi (1989). "Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro." Neuron **3**(1): 115-127.
- Carr, V. M. and A. I. Farbman (1992). "Ablation of the olfactory bulb up-regulates the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in olfactory epithelium." Exp Neurol **115**(1): 55-59.
- Chesler, A. T., et al. (2007). "A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 1039-1044.
- Chess, A., et al. (1994). "Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression." Cell **78**(5): 823-834.
- Clarín, T., et al. (2010). "Odor detection and odor discrimination in subadult and adult rats for two enantiomeric odorants supported by c-fos data." Behav Brain Res **206**(2): 229-235.
- Col, J. A., et al. (2007). "Adenylyl cyclase-dependent axonal targeting in the olfactory system." Development **134**(13): 2481-2489.
- Coopersmith, R. and M. Leon (1984). "Enhanced neural response to familiar olfactory cues." Science **225**(4664): 849-851.
- Cummings, D. M. and L. Belluscio (2010). "Continuous neural plasticity in the olfactory intrabulbar circuitry." J Neurosci **30**(27): 9172-9180.
- Ding, X., and Dahl, A. R. (2003) *Olfactory mucosa: composition, enzymatic localization, and metabolism*. In Handbook of Olfaction and Gustation, 2nd edition (R. L. Doty, ed.), pp. 51–73. Marcel Dekker, Inc., New York
- Feinstein, P., et al. (2004). "Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta2 adrenergic receptor." Cell **117**(6): 833-846.
- Feinstein, P. and P. Mombaerts (2004). "A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system." Cell **117**(6): 817-831.

- Frazier-Cierpial, L. and P. C. Brunjes (1989). "Early postnatal cellular proliferation and survival in the olfactory bulb and rostral migratory stream of normal and unilaterally odor-deprived rats." J Comp Neurol **289**(3): 481-492.
- Galli, L. and L. Maffei (1988). "Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life." Science **242**(4875): 90-91.
- Garibotti, M., et al. (1997). "Three odorant-binding proteins from rabbit nasal mucosa." Chem Senses **22**(4): 383-390.
- Godfrey, P. A., et al. (2004). "The mouse olfactory receptor gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2156-2161.
- Gogos, J. A., et al. (2000). "Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map." Cell **103**(4): 609-620.
- Gomez, T. M. and N. C. Spitzer (1999). "In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients." Nature **397**(6717): 350-355.
- Gomez, T. M. and J. Q. Zheng (2006). "The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding." Nat Rev Neurosci **7**(2): 115-125.
- Goodman, C. S. and C. J. Shatz (1993). "Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity." Cell **72** **Suppl**: 77-98.
- Graziadei, P. P., et al. (1979). "Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse." Neuroscience **4**(6): 713-727.
- Hansel, D. E., et al. (2001). "Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor." Nature **410**(6831): 940-944.
- Hayar, A., et al. (2004). "External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity." J Neurosci **24**(30): 6676-6685.
- Hensch, T. K. (2004). "Critical period regulation." Annu Rev Neurosci **27**: 549-579.
- Huard, J. M., et al. (1998). "Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells." J Comp Neurol **400**(4): 469-486.
- Huber, A. B., et al. (2003). "Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance." Annu Rev Neurosci **26**: 509-563.
- Huberman, A. D., et al. (2008). "Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields." Annu Rev Neurosci **31**: 479-509.
- Imai, T., et al. (2006). "Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting." Science **314**(5799): 657-661.
- Iwema, C. L., et al. (2004). "Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium." J Neurosci **24**(2): 356-369.

Johnson, B. A. and M. Leon (2000). "Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration." J Comp Neurol **422**(4): 496-509.

Kaas, J. H. (1997). "Topographic maps are fundamental to sensory processing." Brain Res Bull **44**(2): 107-112.

Katz, L. C. and C. J. Shatz (1996). "Synaptic activity and the construction of cortical circuits." Science **274**(5290): 1133-1138.

Kelsch, W., et al. (2010). "Watching synaptogenesis in the adult brain." Annu Rev Neurosci **33**: 131-149.

Kishi, K. (1987). "Golgi studies on the development of granule cells of the rat olfactory bulb with reference to migration in the subependymal layer." J Comp Neurol **258**(1): 112-124.

Kleene, S. J. and R. C. Gesteland (1991). "Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia." J Neurosci **11**(11): 3624-3629.

Kobayakawa, K., et al. (2007). "Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb." Nature **450**(7169): 503-508.

Lewcock, J. W. and R. R. Reed (2004). "A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(4): 1069-1074.

Lin, D. M., et al. (2000). "Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity." Neuron **26**(1): 69-80.

Linster, C., et al. (2001). "Perceptual correlates of neural representations evoked by odorant enantiomers." J Neurosci **21**(24): 9837-9843.

Liu, C. J., et al. (1989). "Glutamate-like immunoreactivity revealed in rat olfactory bulb, hippocampus and cerebellum by monoclonal antibody and sensitive staining method." Histochemistry **90**(6): 427-445.

Lodovichi, C. and L. Belluscio (2012). "Odorant receptors in the formation of the olfactory bulb circuitry." Physiology (Bethesda) **27**(4): 200-212.

Lodovichi, C., et al. (2003). "Functional topography of connections linking mirror-symmetric maps in the mouse olfactory bulb." Neuron **38**(2): 265-276.

Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." Science **264**(5162): 1145-1148.

Lowe, G. and G. H. Gold (1993). "Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander." J Physiol **462**: 175-196.

Lowe, G., et al. (1989). "Adenylate cyclase mediates olfactory transduction for a wide variety of odorants." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5641-5645.

Macrides, F. and S. P. Schneider (1982). "Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster." J Comp Neurol **208**(4): 419-430.

- Malnic, B., et al. (2004). "The human olfactory receptor gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2584-2589.
- Malnic, B., et al. (1999). "Combinatorial receptor codes for odors." Cell **96**(5): 713-723.
- Malun, D. and P. C. Brunjes (1996). "Development of olfactory glomeruli: temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats." J Comp Neurol **368**(1): 1-16.
- Maritan, M., et al. (2009). "Odorant receptors at the growth cone are coupled to localized cAMP and Ca²⁺ increases." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3537-3542.
- Marks, C. A., et al. (2006). "Activity-dependent plasticity in the olfactory intrabulbar map." J Neurosci **26**(44): 11257-11266.
- Talbot, S.A., and Marshall, W.H. (1941). Physiological studies on neural mechanisms of visual localization and discrimination. Am. J. Ophthalmol. **24**, 1255–1263.
- Matthews, H. R. and J. Reisert (2003). "Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation." Curr Opin Neurobiol **13**(4): 469-475.
- McLaughlin, T. and D. D. O'Leary (2005). "Molecular gradients and development of retinotopic maps." Annu Rev Neurosci **28**: 327-355.
- McQuiston, A. R. and L. C. Katz (2001). "Electrophysiology of interneurons in the glomerular layer of the rat olfactory bulb." J Neurophysiol **86**(4): 1899-1907.
- Meister, M. and T. Bonhoeffer (2001). "Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb." J Neurosci **21**(4): 1351-1360.
- Meister, M., et al. (1991). "Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina." Science **252**(5008): 939-943.
- Menco, B. P., et al. (1997). "Putative odour receptors localize in cilia of olfactory receptor cells in rat and mouse: a freeze-substitution ultrastructural study." J Neurocytol **26**(5): 297-312.
- Michaloski, J. S., et al. (2006). "Identification of potential regulatory motifs in odorant receptor genes by analysis of promoter sequences." Genome Res **16**(9): 1091-1098.
- Minn, A., et al. (2002). "Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier." J Drug Target **10**(4): 285-296.
- Miyamichi, K., et al. (2005). "Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb." J Neurosci **25**(14): 3586-3592.
- Mombaerts, P. (2001). "How smell develops." Nat Neurosci **4 Suppl**: 1192-1198.
- Mombaerts, P. (2004). "Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors." Nat Rev Neurosci **5**(4): 263-278.

- Mombaerts, P., et al. (1996). "Visualizing an olfactory sensory map." Cell **87**(4): 675-686.
- Mori, K., et al. (2005). "Peripheral lipopolysaccharide induces apoptosis in the murine olfactory bulb." Brain Res **1039**(1-2): 116-129.
- Mori, K., et al. (1999). "The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information." Science **286**(5440): 711-715.
- Mori, K. and H. Sakano (2011). "How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain?" Annu Rev Neurosci **34**: 467-499.
- Murthy, V. N. (2011). "Olfactory maps in the brain." Annu Rev Neurosci **34**: 233-258.
- Nef, P., et al. (1992). "Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 8948-8952.
- Niimura, Y. and M. Nei (2005). "Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(17): 6039-6044.
- Ojima, H., et al. (1984). "The trajectory of mitral cell axons in the rabbit olfactory cortex revealed by intracellular HRP injection." J Comp Neurol **230**(1): 77-87.
- Orona, E., et al. (1983). "Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb." J Comp Neurol **217**(2): 227-237.
- Pelosi, P. (1998). "Odorant-binding proteins: structural aspects." Ann N Y Acad Sci **855**: 281-293.
- Pietrobon, M., et al. (2011). "Interplay among cGMP, cAMP, and Ca²⁺ in living olfactory sensory neurons in vitro and in vivo." J Neurosci **31**(23): 8395-8405.
- Pilpel, Y. and D. Lancet (1999). "The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins." Protein Sci **8**(5): 969-977.
- Pinching, A. J. and T. P. Powell (1971). "The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb." J Cell Sci **9**(2): 379-409.
- Pro-Sistiaga, P., et al. (2007). "Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon." J Comp Neurol **504**(4): 346-362.
- Pun, R. Y. and S. J. Kleene (2003). "Contribution of cyclic-nucleotide-gated channels to the resting conductance of olfactory receptor neurons." Biophys J **84**(5): 3425-3435.
- Ramon y Cajal, S. (1955) *Studies on the cerebral cortex*, London, Lloyd-Luke.
- Ressler, K. J., et al. (1993). "A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium." Cell **73**(3): 597-609.
- Ressler, K. J., et al. (1994). "Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb." Cell **79**(7): 1245-1255.

- Rouquier, S., et al. (1998). "A gene recently inactivated in human defines a new olfactory receptor family in mammals." Hum Mol Genet **7**(9): 1337-1345.
- Rouquier, S., et al. (1998). "Distribution of olfactory receptor genes in the human genome." Nat Genet **18**(3): 243-250.
- Royal, S. J. and B. Key (1999). "Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice." J Neurosci **19**(22): 9856-9864.
- Royet, J. P., et al. (1998). "A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit." Brain Res **788**(1-2): 35-42.
- Rubin, B. D. and L. C. Katz (1999). "Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb." Neuron **23**(3): 499-511.
- Rubin, B. D. and L. C. Katz (2001). "Spatial coding of enantiomers in the rat olfactory bulb." Nat Neurosci **4**(4): 355-356.
- Saito, H., et al. (2004). "RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors." Cell **119**(5): 679-691.
- Sakano, H. (2010). "Neural map formation in the mouse olfactory system." Neuron **67**(4): 530-542.
- Schellinck, H. M., et al. (2001). "A simple and reliable test of olfactory learning and memory in mice." Chem Senses **26**(6): 663-672.
- Schoenfeld, T. A., et al. (1985). "Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system." J Comp Neurol **235**(4): 503-518.
- Schoppa, N. E., et al. (1998). "Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors." J Neurosci **18**(17): 6790-6802.
- Schwarzenbacher, K., et al. (2005). "Formation and maturation of olfactory cilia monitored by odorant receptor-specific antibodies." Histochem Cell Biol **123**(4-5): 419-428.
- Serizawa, S., et al. (2000). "Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes." Nat Neurosci **3**(7): 687-693.
- Serizawa, S., et al. (2003). "Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse." Science **302**(5653): 2088-2094.
- Seroogy, K. B., et al. (1985). "Distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the rat main olfactory bulb." J Comp Neurol **239**(4): 373-383.
- Shafa, F. and E. Meisami (1977). "A horseradish peroxidase study of the origin of central projections to the rat olfaction bulb." Brain Res **136**(2): 355-359.
- Shepherd, G. M. (1994). "Discrimination of molecular signals by the olfactory receptor neuron." Neuron **13**(4): 771-790.

Shepherd, G. M. (2004) *The Synaptic Organization of the Brain. Fifth Edition*. Oxford Univ Press.

Sherrington, C. S. (1917). "Reflexes elicitable in the cat from pinna vibrissae and jaws." J Physiol **51**(6): 404-431.

Shykind, B. M., et al. (2004). "Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice." Cell **117**(6): 801-815.

Spehr, M. and S. D. Munger (2009). "Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond." J Neurochem **109**(6): 1570-1583.

Stephan, A. B., et al. (2009). "ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(28): 11776-11781.

Strotmann, J., et al. (2004). "Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons." J Neurosci **24**(35): 7754-7761.

Strotmann, J., et al. (1994). "Olfactory neurones expressing distinct odorant receptor subtypes are spatially segregated in the nasal neuroepithelium." Cell Tissue Res **276**(3): 429-438.

Tegoni, M., et al. (2000). "Mammalian odorant binding proteins." Biochim Biophys Acta **1482**(1-2): 229-240.

Thoenen, H. (1995). "Neurotrophins and neuronal plasticity." Science **270**(5236): 593-598.

Treloar, H. B., et al. (1999). "Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb." J Comp Neurol **413**(2): 289-304.

Trinh, K. and D. R. Storm (2003). "Vomeroneasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium." Nat Neurosci **6**(5): 519-525.

Uchida, N., et al. (2000). "Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features." Nat Neurosci **3**(10): 1035-1043.

Vassar, R., et al. (1994). "Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb." Cell **79**(6): 981-991.

Vassar, R., et al. (1993). "Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium." Cell **74**(2): 309-318.

Wang, F., et al. (1998). "Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map." Cell **93**(1): 47-60.

Wang, M. M. and R. R. Reed (1993). "Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast." Nature **364**(6433): 121-126.

Young, J. M., et al. (2002). "Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families." Hum Mol Genet **11**(5): 535-546.

Young, J. M. and B. J. Trask (2002). "The sense of smell: genomics of vertebrate odorant receptors." Hum Mol Genet **11**(10): 1153-1160.

Yu, C. R., et al. (2004). "Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map." Neuron **42**(4): 553-566.

Zhang, X. and S. Firestein (2002). "The olfactory receptor gene superfamily of the mouse." Nat Neurosci **5**(2): 124-133.

Zhuang, H. and H. Matsunami (2007). "Synergism of accessory factors in functional expression of mammalian odorant receptors." J Biol Chem **282**(20): 15284-15293.

Zou, D. J., et al. (2009). "How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story?" Nat Rev Neurosci **10**(8): 611-618.

Zou, D. J., et al. (2007). "Absence of adenylyl cyclase 3 perturbs peripheral olfactory projections in mice." J Neurosci **27**(25): 6675-6683.