



Università degli Studi di Cagliari
Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Sezione di Neuroscienze

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche
Dottorato in Neuroscienze
XXVI Ciclo

Anno Accademico 2012/2013

Settore scientifico disciplinare di afferenza:
BIO/11 BIO/14 MED/25

Titolo Tesi:

**Effetto dell'etanolo sullo stato di metilazione
del gene che codifica per la neurotrofina
"Brain-Derived Neurotrophic Factor"**

Dottorando: Gabriele Floris

Tutor: Prof. Paolo Follesa

Coordinatore: Prof. Walter Fratta

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2012/2013 - XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agro-alimentare e dei materiali tradizionali"



Introduzione **1**

Etanolo **1**

- Generalità 1
- Breve storia dell'alcol 2
- Epidemiologia e impatto dell'alcol nella società 4
- Effetti comportamentali dell'etanolo (effetti a breve e lungo termine) 6
- Farmacocinetica dell'etanolo 7
- Neurobiologia dell'alcol e dell'alcolismo 9

Fattori neurotrofici **22**

- Generalità 22
- Ipotesi neurotrofica nella tossicodipendenza 23
- Il BDNF 24
- Il gene del BDNF 25
- Biosintesi e secrezione del BDNF 26
- Vie di segnalazione del BDNF e relativi target 27
- Effetto dell'etanolo nei meccanismi di segnalazione del BDNF e sulla plasticità sinaptica 30

Epigenetica **33**

- Generalità 33
- Panoramica dei meccanismi di regolazione epigenetica 34
- Modificazione della coda degli istoni 35
- Metilazione del DNA 36
- RNA non codificanti 38
- Meccanismi epigenetici nelle tossicodipendenze 38
- Meccanismi epigenetici nell'alcolismo 39
- Regolazione epigenetica del gene BDNF 41

Obiettivi **43**

Materiali e metodi **44**

- Colture primarie di cellule granulari di cervelletto di ratto 44
- Trattamento Farmacologico 45
- Animali e trattamento farmacologico 46
- Quantificazione degli mRNA che codificano per la neurotrofina BDNF 46
- Analisi dello stato di metilazione pel promotore 46
- Analisi dell'etanolemia 47
- Analisi statistica 48

Risultati	49
<hr/>	
• Effetto dell'esposizione acuta all'etanolo e della successiva astinenza nell'espressione genica dell'esone IX della neurotrofina BDNF	49
• Effetto dell'esposizione cronica all'etanolo e successivo periodo di astinenza nell'espressione genica dell'esone IX della neurotrofina BDNF	49
• Analisi dello stato di metilazione del promotore del gene del BDNF e della sua espressione dopo esposizione acuta all'etanolo e a due molecole inibitrici dell'enzima DNMT	50
• Analisi dello stato di metilazione del promotore del gene del BDNF e della sua espressione nell'ippocampo di ratto dopo somministrazione di dosi crescenti di etanolo	50
• Analisi delle concentrazioni di alcol nel sangue	51
Discussione	52
<hr/>	
Conclusioni	58
<hr/>	
Figure	59
<hr/>	
Bibliografia	71
<hr/>	

INTRODUZIONE

Etanolo

Generalità

L'etanolo, conosciuto anche come alcol etilico, spirito di vino o semplicemente alcol, è una sostanza presente in maniera praticamente ubiquitaria nelle antiche e moderne società, dove veniva e viene ampiamente utilizzato sotto forma di bevande alcoliche per ottenere dei benefici sotto il profilo sociale e nutrizionale. La parola "alcol" affonda le sue radici nella parola araba Al-Kuhul o Kohol, la quale significa polvere di antimonio, che consiste in una polvere finissima ottenuta dalla carbonizzazione dell'antimonio (un minerale metallico) di colore che varia dal grigio antracite al nero profondo. Questa polvere sottilissima veniva utilizzata come cosmetico dalle donne mediorientali e orientali per conferire profondità e mistero allo sguardo. La parola alcol è stata poi ripresa dai latini nel medioevo che la utilizzarono per indicare gli spiriti altamente rettificati che richiamaevano in qualche modo la "finezza" di queste polveri. Oggi con la parola alcol si indicano tutta una serie di composti (gli alcoli) tra cui l'etanolo, chiamato per antonomasia, semplicemente alcol essendo alla base di tutte le bevande alcoliche. La formazione dell'alcol avviene con un processo naturale molto comune definito fermentazione alcolica, catalizzato dai lieviti (comunemente *S. Cerevisiae*) che trasformano grazie al calore e all'aria il glucosio e l'acqua in diossido di carbonio (CO₂) e alcol, ottenendo energia. Dal punto di vista chimico l'etanolo è un alcol a catena corta lineare, la cui formula bruta è CH₃CH₂OH; si presenta a temperatura ambiente come liquido incolore e dall'odore etereo caratteristico, è tendenzialmente volatile e risulta essere estremamente infiammabile.

L'alcol è utilizzato per numerosi scopi:

- A scopo ricreativo e come elemento conviviale e aggregativo nelle diverse attività sociali dell'uomo.
- È comunemente utilizzato in soluzione al 70% come disinfettante in ambito casalingo in quanto uccide i microrganismi denaturando le proteine e dissolvendo i lipidi, risulta pertanto efficace contro molti batteri, funghi, e virus, però è totalmente inefficace contro le spore batteriche.
- Prima dello sviluppo di nuovi farmaci, veniva utilizzato come anestetico generale.

- Tra gli altri impieghi dell'alcol annoveriamo il suo utilizzo in cosmetica per la preparazione di deodoranti e profumi; nel settore industriale per la preparazione di vernici e come solvente; in alcuni paesi del mondo viene utilizzato come combustibile al posto della benzina, dato il suo basso costo di produzione.

L'alcol è catalogato dall'organizzazione mondiale della sanità (OMS) come sostanza tossica, ed è inclusa nella tabella delle droghe.

Breve storia dell'alcol

L'alcol possiede una storia davvero singolare, è stato per millenni protagonista nel bene e nel male della vita dell'uomo, il quale è passato da considerarlo come un simbolo sacro ed elemento centrale della società a qualcosa di assolutamente negativo da proibire e da osteggiare a tutti i costi. L'origine dell'alcol è antichissima; si ritiene che bevande alcoliche fermentate venivano consumate nel neolitico, circa 9000 anni fa. Il vino compare nei pittogrammi egizi già nel 4000 a.C., mentre la birra era la principale bevanda alcolica dei sumeri; anche le civiltà precolombiane consumavano il "pulque", una bevanda alcolica ottenuta dall'agave.

Dal 1700 a.C. la produzione e l'utilizzo del vino, iniziarono a diffondersi nella cultura greca, e negli anni a seguire ci fu una larga diffusione di questa bevanda sino a diventare un elemento centrale della vita sociale e in molti rituali sacri; essi adoravano infatti Dioniso, il Dio del vino e dell'ebbrezza. Successivamente anche il Cristianesimo fece del vino un vero e proprio simbolo, rappresentava nientemeno che il sangue del Cristo redentore. Le ragioni di questa diffusione e dell'enorme successo di vino e birra sino al punto da farne delle vere e proprie icone o considerarle come doni divini ha probabilmente delle ragioni pratiche. Infatti come ben spiegato da Bert L. Vallee nel suo lavoro scientifico "Alcohol in human history" fino al 19th secolo le popolazioni occidentali consideravano l'acqua una bevanda inadatta al consumo (probabilmente l'assenza di sistemi di potabilizzazione ne limitava l'utilizzo e l'approvvigionamento); praticamente tutte le grandi società della storia, dagli Egiziani ai Babilonesi, dagli Assiri ai Greci e arrivando ai Romani, tutti all'unanimità evitavano l'acqua come bevanda e alcuni la consideravano causa di numerose malattie acute, croniche e talvolta fatali. All'epoca i processi di purificazione e potabilizzazione dell'acqua erano scon-

sciuti (ad eccezione delle popolazioni orientali che avevano appreso i benefici della bollitura dell'acqua utilizzata per la preparazione del thè) e questo aveva portato le popolazioni a rifiutare l'acqua come bevanda necessaria per mantenere il bilancio dei fluidi nell'organismo e addirittura in alcuni casi a bollarla come inadatta al consumo umano.

Per quasi 10.000 anni nella storia occidentale conosciuta, birra e vino erano le principali bevande consumate dagli individui di tutte le età anche in virtù del fatto che il tasso alcolico era molto basso e gli effetti nocivi a carico dell'organismo erano minori; il loro consumo si rendeva quindi necessario per garantire il giusto apporto di liquidi alle popolazioni. Inoltre prima che la patata si affermasse come alimento di base nel 700, la birra, che veniva prodotta soprattutto nei monasteri era un importante elemento nell'alimentazione quotidiana, in quanto garantiva oltre ai liquidi un buon apporto calorico ed energetico. Nonostante l'importanza e il ruolo centrale riconosciuto alle bevande alcoliche, fin dall'antichità non sono mancate le leggi per regolarne la vendita, il consumo e condannarne l'abuso. Il codice di Hammurabi (circa 1800 a.C.) conteneva delle leggi per regolarne la vendita, la Bibbia e il Corano ne biasimavano invece l'abuso.

La diffusione dei processi di distillazione che prese il via nel 1400 segnò un'importante tappa che cambiò qualitativamente e quantitativamente il consumo di bevande alcoliche da parte dell'uomo. La distillazione che permetteva di ottenere delle bevande ad alto tenore alcolico, favorì il passaggio da un utilizzo di bevande a basso tenore alcolico (vino e birra) a scopo nutrizionale al consumo di distillati ad alto tenore alcolico a uso voluttuario e ricreazionale, mettendo in luce gli effetti nocivi per l'organismo legati all'abuso dell'alcol; tutto ciò accompagnato anche da un miglioramento nelle abitudini alimentari tra cui l'introduzione nella dieta di bevande alternative a quelle alcoliche portò i poteri pubblici e la stessa opinione pubblica a cambiare atteggiamento nei confronti dell'alcol tanto da arrivare a delle severe restrizioni sulla vendita e sul consumo e infine condannare l'ubriachezza come reato. Proprio in questo periodo avvenne quindi una transizione molto importante riguardo l'uso degli alcolici che passarono da elementi centrali nella società per i motivi sopraelencati a sostanze pericolose o semplicemente non più indispensabili, e nel 1647 per la prima volta, un monaco greco di nome Agapios documentò che l'abuso cronico di alcol è associato a tossicità del sistema nervoso centrale (SNC) ed a una vasta gamma di altri disturbi medici come convulsioni, paralisi ed emorragie interne.

Infine dal 1800, grazie ai mutamenti sociali introdotti dall'urbanesimo e dall'industrializzazione, l'alcolismo diventa una vera e propria emergenza sociale, portando alla nascita dei primi movimenti proibizionisti che si diffusero soprattutto nel nord dell'Europa e negli Stati Uniti che nel 1919 con una legge determinarono l'entrata in vigore del proibizionismo. Come sappiamo il proibizionismo durò ben poco, appena quattordici anni e si rivelò un'esperienza fallimentare con conseguenze molto gravi come per esempio la nascita del mercato nero gestito dalle mafie, le feroci e sanguinose guerre dei contrabbandieri e addirittura aggravò il problema dell'alcol che riscuoteva invece un maggior successo tra i consumatori. Il resto è storia dei nostri giorni e sappiamo che oggi piuttosto che proibire la produzione e il consumo la maggior parte dei governi esercita un controllo totale sugli alcolici ottenendo tra l'altro altissimi proventi.

Epidemiologia e impatto dell'alcol nella società

L'utilizzo inconsapevole e smodato di alcol rappresenta un problema di portata mondiale. Ogni anno circa 2.5 milioni di persone muoiono a causa dell'alcol, di questi 320.000 sono giovani di età compresa tra i 15 e i 29 anni (rappresentano il 9% del totale). L'alcol è una delle tre più grandi priorità a livello mondiale per quanto riguarda la salute pubblica e sebbene solo metà della popolazione mondiale beve alcolici rappresenta la terza causa di malattie e morti premature. L'alcol, infatti, è ampiamente noto per essere la causa o la concausa di circa sessanta patologie o stati patologici (Anderson e Baumberg et al., 2006) tra cui:

- Infortuni o danni di diverso genere sia che essi siano intenzionali o meno e possono essere riferiti a persone bevitrice o non (tra questi includiamo violenze interpersonali, suicidi, omicidi, comportamenti sessuali a rischio con conseguenze gravi come il virus HIV e come tutti sappiamo gli incidenti stradali);
- Disordini comportamentali e problemi psichici (sindrome di Korsakoff, sindrome di Wernicke, demenza, FAS, ADHD);
- Problemi gastro-intestinali (nausea, vomito, dolori addominali);
- Disordini immunologici (indebolisce il sistema immunitario);
- Diversi tipi di tumori (al cavo orale, faringe, laringe, esofago, fegato, colon);
- Malattie a carico del sistema cardio circolatorio come disordini ipertensivi e fibril-

lazione atriale;

- Patologie a carico dell'apparato muscolare e scheletrico;
- Malattie polmonari;
- Disordini riproduttivi e danni prenatali tra cui un aumentato rischio di nascita prematura e un basso peso alla nascita.

Inoltre negli ultimi anni evidenze molto ben consolidate, mostrano come la quantità di alcol consumato durante tutta la vita e la combinazione tra la frequenza e la quantità di alcol consumata, aumentano il rischio di danni alcol correlati in maniera dose dipendente (Rehm et al., 2010).

La situazione è particolarmente grave in Europa, dove si registrano, contestualmente ai consumi più elevati, i più alti tassi di morbilità e mortalità alcol correlate. L'Europa è la regione del mondo con la più grande percentuale di bevitori, i più alti livelli di consumo di alcol pro capite e un elevato livello di danni e problemi connessi all'alcol (il 40-60% di tutte le morti traumatiche in Europa sono attribuibili, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, all'alcol) (sito web del ministero della salute). Tutto ciò ovviamente si traduce in un grande dispendio di energie in termini di risorse umane ed economiche, i problemi alcol correlati rappresentano infatti il 9% della spesa sanitaria pubblica nei Paesi europei (In Italia nel 2011 la spesa sanitaria totale è stata di 122 miliardi di euro).

I giovani europei rappresentano una categoria ad alto rischio, un decesso su quattro tra quelli registrati nei giovani tra i quindici e i ventinove anni è dovuto all'alcol che oltre ad essere la sostanza d'abuso più comune è anche il primo fattore di rischio d'invalidità, mortalità prematura e malattia cronica in questa fascia d'età. I giovani sono particolarmente a rischio anche perché generalmente prediligono un consumo di tipo anglosassone (binge drinking) rispetto a un consumo di tipo mediterraneo (il vino durante i pasti). Inoltre L'alcolismo colpisce gli uomini con una frequenza doppia rispetto alle donne; più precoce è l'avvio al consumo alcolico, maggiore è il rischio e la probabilità d'insorgenza di alcolismo in età adulta.

Effetti comportamentali dell'etanolo (effetti a breve e lungo termine)

L'alcol è una sostanza psicotropa, come tale è in grado di interagire con i processi di trasmissione dei segnali e delle informazioni tra le cellule nervose, è quindi in grado di modulare le complesse dinamiche alla base di ogni fenomeno psicologico, dalle emozioni ai ricordi, dall'apprendimento alla percezione, dalle capacità motorie alle abilità intellettive fino ad arrivare ai più intimi pensieri. Perturbando le funzioni delle cellule nervose, così, le sostanze psicoattive possono alterare gli equilibri psicologici e i normali processi mentali.

L'alcol è definito come deprimente del SNC anche se l'assunzione di basse dosi di alcol causa la comparsa di un effetto euforizzante (dovuto alla compromissione dei meccanismi di controllo inibitori sulle strutture cerebrali corticali e sottocorticali) che può portare erroneamente a ritenerlo una sostanza ad azione stimolante.

Come sostanza deprimente il SNC è in grado di produrre degli effetti inibitori in maniera dose dipendente negli esseri umani come sedazione e ipnosi. A basse concentrazioni ematiche (0.01 – 0.05 g/dl = g%) l'alcol produce cambi di personalità, come un aumento della socievolezza e della loquacità; inoltre si registra una leggera sensazione di euforia, un aumento del tono dell'umore e una maggiore sicurezza di sé. A queste concentrazioni si ha anche una riduzione della tensione e disinibizione. Aumentando le concentrazioni (0.08 – 0.15 g%) abbiamo un esacerbarsi degli effetti prima menzionati con un aumento significativo della disinibizione e una compromissione delle abilità cognitive, di giudizio e della coordinazione motoria. Ad alte concentrazioni (0.15 – 0.30 g%) il quadro clinico del soggetto si complica e compaiono sintomi come un eloquio disorganizzato e stentato, una marcata atassia sino a raggiungere stati stuporosi, perdita di coscienza e ipnosi. Infine quando si raggiungono concentrazioni tra (0.40 – 0.50 g%) arriviamo all'anestesia generale, coma e morte che sopraggiunge per depressione respiratoria. Così come nell'uomo anche negli animali abbiamo quasi gli stessi effetti. Essendo una sostanza d'abuso l'alcol induce la tendenza di essere ripetutamente utilizzato e per lunghi periodi, questo porta a numerose alterazioni comportamentali come la tolleranza, che richiede un progressivo aumento delle dosi per ottenere gli effetti desiderati. Il secondo fenomeno che accompagna l'utilizzo cronico di alcol è la dipendenza che può essere sia psichica sia fisica data dal manifestarsi di alcune caratteristiche come la continua ricerca e il forte desiderio della sostanza (craving), perdita del controllo inibitorio che porta all'incapacità di smettere di bere,

anche se si ha la consapevolezza di tutti i danni e le ripercussioni a livello psicofisico e sociale (si ha, infatti, la compromissione di attività lavorative e sociali); è caratterizzata inoltre dalla crisi d'astinenza che ha luogo in seguito a brusca sospensione dell'assunzione cronica.

Tra i disturbi gravi del sistema nervoso associati all'abuso cronico di alcol, ricordiamo l'encefalopatia di Wernicke, causata dalla deficienza di tiamina dovuta alle alterazioni di assorbimento e metabolismo riscontrate nell'etilista; la sindrome di korsakoff, che si riscontra nell' 80% dei soggetti che recuperano dalla sindrome di Wernicke, consiste in gravi deficit della memoria ed apatia. Sono sempre dovute all'abuso continuato di alcol la malattia di Marchiafava-bignami, e tutta una serie di disturbi neurologici gravi che comprendono deficit della memoria e cognitivi che vanno dall'amnesia alla demenza. L'assunzione di alcol durante la gravidanza è causa di alterazioni a carico del feto che variano in rapporto alla dose e al periodo di esposizione; l'alcol è dunque un agente teratogeno che produce quella che è descritta come FAS (Fetal Alcohol Syndrome) caratterizzata da dimorfismi facciali, deficit dell'accrescimento staturo-ponderale, microcefalia, e alterazioni del sistema nervoso centrale che si traducono in: ritardo mentale, ritardo dello sviluppo motorio, disturbi comportamentali, disturbi dell'attenzione e della percezione sensoriale e scarsa adattabilità ambientale. L'alcol inoltre è un agente neurotossico particolarmente deleterio per il cervello in via di sviluppo ed è associato ad'abberranti cambiamenti strutturali nell'ippocampo degli adolescenti e a un ridotto volume cerebrale in età adulta che si ripercuotono in maniera importante nel comportamento del soggetto.

Farmacocinetica dell'etanolo

L'alcol, così come le altre droghe, induce i propri effetti raggiungendo le cellule del cervello. Una volta ingerito, è assorbito (per assorbimento s'intende il passaggio della sostanza in questo caso l'alcol nel torrente sanguigno) dall'apparato digerente e tramite il sangue viene trasportato in tutti gli organi tra cui il cervello. L'alcol, com'è stato ben descritto, è un solvente universale. È, infatti, molto ben miscibile in acqua e possiede anche una bassa solubilità nella componente lipidica ($P_{olio/acqua} = 0.035$) (Leo et al., 1971; McCreery and hunt, 1978). Grazie alla capacità di miscelarsi alla componente acquosa e quanto basta in quella lipidica l'etanolo può essere consi-

derato un farmaco ideale, in quanto può tranquillamente attraversare le membrane biologiche e distribuirsi uniformemente in tutto l'organismo e raggiungere facilmente i probabilmente innumerevoli bersagli su cui espleta la sua azione. Una volta ingerito l'alcol è assorbito dallo stomaco (20%) e dalla prima parte dell'intestino (80%). In un individuo sano e adulto circa il 90% di tutto l'alcol assunto viene assorbito in un lasso di tempo che va tra i 30-60 minuti. Inoltre è stato ben documentato che l'assorbimento dell'alcol è significativamente ridotto se è presente del cibo nello stomaco specie se ricco di grassi (Goldberg, 1943). La concentrazione ematica di alcol (alcolemia), è il parametro preso come standard di riferimento per indicare lo stato d'intossicazione del soggetto. L'alcolemia è espressa in g% (grammi in percentuale) dove $0.05 \text{ g/dl} = 0.05 \text{ g\%} = 10.6 \text{ millimolare (mM)}$ questo valore rappresenta anche il limite legale da non superare se si è alla guida di veicoli per essere considerati in stato di ebbrezza. La quantità di alcol che un soggetto può consumare (in linea teorica) per non superare questo limite imposto dalla legge è di una unità alcolica; tale unità contiene circa 12 g di alcol ed equivale ad un bicchiere di vino (12% circa di gradazione alcolica) di circa 125 ml; una lattina di birra (5%) da 330 ml; un bicchierino di superalcolico (40%) da 40 ml. Tuttavia è bene ricordare che a parità di alcol consumato, diversi individui possono registrare alcolemie molto differenti. Ci sono, infatti, numerosi parametri che sono in grado di influenzare l'etanolemia: il sesso, l'età, la composizione della massa corporea, l'assunzione o meno in concomitanza del cibo, dalla consuetudine con cui si utilizza l'alcol, assunzione di farmaci, presenza di malattie e da particolari stati psico-fisici, differenze genetiche. L'alcol una volta introdotto è assorbito dal nostro organismo viene prontamente "aggredito" e catabolizzato a livello del fegato da tre diversi pathways enzimatici (Riveros-Rosas et al., 1997; Nagy, 2004) che provvedono in larga parte (90-95%) alla sua eliminazione. Il restante 5-10% dell'alcol è escreto in maniera immutata tramite la respirazione a livello polmonare, la sudorazione e le urine. L'alcol una volta arrivato nel fegato è degradato in acetaldeide dall'enzima alcoldeidrogenasi che rappresenta il principale enzima responsabile dell'ossidazione dell'alcol. L'acetaldeide in seguito è degradata in acetato, acqua e CO₂ dall'enzima Acetaldeide deidrogenasi. Variazioni alleliche in questo pathway metabolico sono responsabili delle diversità nell'eliminazione dell'alcol negli esseri umani e delle differenze interindividuali nella sua eliminazione. L'inattivazione dell'acetaldeide deidrogenasi di tipo 2 rappresenta la spiegazione scientifica agli effetti avversi (arrossamento del volto, tachicardia, ipotensione, sudorazione e aumento della temperatura corporea,

nausea e vomito, tremori) visti a seguito di ingestione di alcol nelle popolazioni asiatiche dove molti soggetti presentano dei polimorfismi di questo enzima (Wall et al., 1993). Inoltre l'inibizione farmacologica di questo enzima spiega l'efficacia del farmaco antiabuso Disulfiram (Antabuse) in grado di bloccare questo enzima e scatenare effetti avversi (simili a quelli visti nei portatori del polimorfismo asiatici) che servono come deterrente per il consumo di alcol (Christensen et al., 1991). Il secondo maggior pathway enzimatico per l'eliminazione dell'alcol è rappresentato dal sistema microsomiale epatico che comprende i citocromi P 450 e in particolare l'isoforma P4502E1 (CYP2E1). L'attività di questo sistema è indotta dal consumo di alcol ed è responsabile della cosiddetta tolleranza farmacocinetica e potrebbe inoltre essere responsabile della produzione di metaboliti tossici ritrovati nel fegato degli alcolisti (Lieber, 1997). Infine il terzo pathway di metabolismo dell'alcol è rappresentato da un pathway non ossidativo catalizzato dall'enzima "FAEE" sintasi (FAEE è la sigla inglese degli esteri etilici degli acidi grassi →Fatty acid ethyl esters) che permette la formazione di composti tra l'etanolo e gli acidi grassi liberi, trigliceridi, lipoproteine o fosfolipidi; portando alla formazione di prodotti come: etil stearato, palmilato, oleato, linoleato e arachinodato che secondo alcuni autori potrebbero essere importanti mediatori del danno organico causato dall'assunzione di alcol etilico (M. Laposata, 1988; T. Hamamoto et al., 1990; Best and Laposata, 2003).

Neurobiologia dell'alcol e dell'alcolismo

Nonostante l'alcol sia la più diffusa e forse la più antica sostanza d'abuso e nonostante le ingenti risorse investite ogni anno nella ricerca, la conoscenza dei precisi meccanismi d'azione con cui l'alcol esplica i suoi effetti psicotropi ed i meccanismi con cui l'alcol induce fenomeni come la tolleranza e la dipendenza non sono stati ancora del tutto chiariti.

I primi studi sui meccanismi con i quali l'alcol era in grado di interferire a livello del SNC, furono volti ad investigare sull'effetto prodotto da quest'ultimo sulle membrane neuronali viste le sue caratteristiche lipofile. Pertanto secondo numerosi autori il trattamento acuto con alcol avrebbe un effetto disorganizzante aspecifico sul doppio strato fosfolipidico membranale, in grado quindi di perturbare molti dei meccanismi biochimici di neurotrasmissione che vi hanno luogo. Quest'azione aspecifica dell'alcol

sui lipidi di membrana è sicuramente un dato certo, ma non sufficiente per spiegare gli innumerevoli effetti imputati a questa sostanza e ciò a spinto i ricercatori a individuare azioni più specifiche, soprattutto a livello delle proteine di membrana. La svolta in questo senso inizio a prendere consistenza nel 1984 grazie a due ricercatori Franks e Liebs i quali fecero un'osservazione molto importante. Purificando l'enzima luciferasi (un enzima coinvolto in processi di bioluminescenza) che non è una proteina di membrana e quindi non ha a che fare con i lipidi membranali, osservarono che l'alcol era capace di perturbare l'azione di questo enzima.

Per la prima volta si evidenzia, dunque, che l'alcol può influenzare l'azione di una proteina senza l'ausilio dei lipidi di membrana; pertanto le proteine possono avere un sito d'azione diretto per l'alcol. Studi successivi hanno validato questa ipotesi e oggi è opinione comune che innumerevoli target proteici interagiscono con l'alcol.

L'utilizzo di modelli animali, accompagnato da un appropriato utilizzo di farmaci selettivi per diversi sistemi neurochimici, supportano l'ipotesi che l'alcol a dosi farmacologiche rilevanti, possiede un ampio, ma selettivo spettro d'azione in diversi substrati neuronali tra cui il recettore GABAergico (Liljequist and Engel, 1982; Allan and Harris, 1986; Ticku et al., 1986; Nie et al., 1994; Ming et al., 2001), il recettore glutammatergico (Lovinger et al., 1989), il recettore Serotoninergico 5-HT₃ (McBride et al., 2004), Canali al calcio (Leslie et al., 1983), Canali al potassio (Moore et al., 1990; Madamba et al., 2005), proteine G (Diehl et al., 1992); e proteine Kinasi (Olive et al., 2000; Walter et al., 2000). Visto i molteplici effetti e gli altrettanti meccanismi molecolari non è facile capire come l'alcol sia in grado di perturbare la normale omeostasi del SNC, pertanto la sua azione è definita "pleiotropica".

È importante ricordare che per un corretto funzionamento, il cervello deve mantenere un corretto equilibrio tra i vari neurotrasmettitori e in particolare tra quelli che hanno carattere inibitorio (che consentono di ritardare o interrompere i segnali nervosi), e quelli che hanno invece un carattere eccitatorio (che lavorano in direzione opposta generando o aumentando questi segnali).

L'alcol come tante altre sostanze è in grado di perturbare questo fine equilibrio potenziando la componente inibitoria (modulando positivamente la funzione del recettore GABA_A), e riducendo quella eccitatoria (modulando negativamente la funzione del recettore NMDA). Questo spiega alcuni effetti associati all'utilizzo acuto di etanolo come l'effetto ansiolitico, l'ipnosi e la sedazione. L'utilizzo di etanolo specie se protratto per lunghi periodi, costringe il cervello a delle modificazioni, volte a recupe-

rare la corretta omeostasi tra le due componenti; grazie al suo carattere “plastico” e “dinamico” è in grado quindi di incrementare la componente eccitatoria e di ridurre quella inibitoria. Questo fenomeno è facilmente osservabile rimuovendo bruscamente l'alcol e smascherando questo disequilibrio che porta a spiacevoli sensazioni come quelle osservate durante l'astinenza alcolica caratterizzate da ansia, tremori e nei casi peggiori da allucinazioni e convulsioni; che si concludono una volta che il cervello ha regolato nuovamente il suo funzionamento in assenza di alcol. L'esposizione cronica all'alcol induce dei cambiamenti profondi in particolari aree cerebrali soprattutto nelle aree del sistema limbico (deputate al controllo delle sensazioni di piacere e gratificazione e che costituiscono il sistema delle emozioni e della ricompensa) e a livello dei circuiti intercalati nel sistema dello stress. Questi cambiamenti influenzano profondamente la neurochimica di queste aree rappresentata principalmente dal sistema dopaminergico, dal sistema dei peptidi oppioidi, dal sistema GABAergico, dal sistema glutamatergico, dal sistema serotoninergico (nelle aree della gratificazione e del piacere), dal sistema Noradrenergico, dal sistema del fattore di rilascio della corticotropina (CRF) e dal neuropeptide Y (NPY) (nei circuiti che modulano le risposte allo stress) (Gilpin and Koob, 2008). Questi fenomeni omeostatici di neuroplasticità si pensa siano alla base di fenomeni che caratterizzano la transizione da un fenotipo normale a un fenotipo patologico dipendente con la comparsa di sintomi indicativi come la sensibilizzazione, la tolleranza e a seguito di una interruzione nel consumo della sindrome di astinenza. La plasticità neuronale è una caratteristica che si riferisce all'abilità del cervello di cambiare continuamente e di adattarsi al meglio nei confronti dell'ambiente circostante. La plasticità sinaptica è alla base di fenomeni fondamentali per la sopravvivenza come la memoria e l'apprendimento grazie alle quali possiamo ricordare esperienze (positive e negative), abilità, luoghi e persone. Inoltre i fenomeni di plasticità sinaptica hanno luogo anche nelle aree della gratificazione e del piacere e nei circuiti che mediano le risposte emozionali negative come i circuiti dello stress; questo ci dà l'opportunità di ricordare e ripetere esperienze positive (mangiare, riprodurci, condurre una vita sociale) utili per la nostra vita ma ci permette anche di ricordare esperienze negative che invece tendiamo ad evitare per lo stesso motivo. Le sostanze psicotrope tra cui l'alcol, sono in grado di “imbrogliare” questi sistemi inducendo una forte sollecitazione delle aree della ricompensa e inducendo una sorta di memoria patologica che porta alla continua ricerca della sostanza e con il tempo alla tossicodipendenza.

Possiamo quindi dire che la plasticità sinaptica rappresenta una caratteristica fondamentale e vantaggiosa per la vita, tuttavia a fronte di stili di vita errati come per esempio l'abuso di sostanze stupefacenti diventa una sorta di arma a doppio taglio. Che inizialmente è vantaggiosa perché ci protegge e ci permette di superare la forte sollecitazione data dall'intossicazione, ma col tempo inizia tutta una serie di cambiamenti strutturali in funzione di questa condizione persistente che portano il soggetto a una condizione di schiavitù nei confronti della sostanza stessa. Numerosi studi scientifici provenienti da diversi campi della biologia suggeriscono comuni meccanismi cellulari e molecolari che sottendono a tutti i tipi di plasticità sinaptica, e inoltre supportano l'idea che la plasticità neuronale a lungo termine richiede dei cambi nei pattern di espressione genica (McClung and Nestler, 2008). Ci sono numerosi meccanismi con cui le droghe d'abuso sono in grado di regolare l'espressione genica tra cui l'attivazione o la soppressione dei fattori di trascrizione (generalmente per opera delle proteine kinasi e sistemi dei secondi messaggeri) e di più recente concezione i meccanismi epigenetici (per un sommario vedere Eric J. Nestler, 2011).

Ruolo del sistema dopaminergico

La dopamina è un neurotrasmettitore catecolaminergico utilizzato da gruppi di neuroni localizzati nel mesencefalo in particolare nell'area ventrale del tegmento (VTA), questo ristretto gruppo di neuroni proietta in diverse aree come la corteccia prefrontale e il nucleo accumbens ed è coinvolta oltre che in alcune funzioni superiori (problem solving, organizzazione delle azioni in sequenze gerarchiche di mete e obiettivi, attivazione di strategie appropriate e l'inibizione di risposte non adeguate) nei meccanismi di motivazione e di rinforzo (Di Chiara G., 1997). I meccanismi di rinforzo sono dei processi per cui le risposte comportamentali messe in atto, sono strettamente basate sulle esperienze precedenti. Rinforzi positivi, descrivono situazioni (presumibilmente gratificanti) in cui stimoli o esperienze (come per esempio lo stato euforico generato dal consumo di alcol) aumentano le probabilità che un soggetto tenda ad esibire un certo comportamento che riconduce lo stesso a ripetere quell'esperienza (ricerca dell'alcol o di una situazione dove ci sia una forte probabilità di assumerlo). Il rinforzo negativo, avviene invece quando la probabilità di una peculiare risposta comportamentale (ricerca dell'alcol) aumenta se questa risposta permette all'individuo di

evitare o alleviare uno stimolo avverso. Nella dipendenza alcolica lo stimolo avverso è rappresentato da sintomi motivazionali ed emozionali come l'ansia, la disforia, l'irritabilità e la sofferenza emotiva che si manifestano durante l'astinenza e risultano da precedenti interruzioni. I rinforzi positivi sono particolarmente importanti nella fase precoce dell'uso e dell'abuso di alcol mentre quelli negativi ricoprono un ruolo importante in seguito, quando gli effetti negativi dell'astinenza diventano un problema oggettivo. Tuttavia i rinforzi negativi potrebbero giocare un ruolo precoce aumentando da subito la propensione al bere in soggetti con un quadro psichiatrico precario che porta i soggetti ad abusare di alcol per alleviare la sintomatologia negativa del disagio psichico, infatti, la comorbidità tra abuso di alcol e patologia psichica (soprattutto ansia, depressione e disturbo bipolare) è alta (44-50%) (Kushner et al., 1990; Weissman et al., 1980). La "spinta" a consumare e abusare di alcol potrebbe essere quindi mediata da entrambi i tipi di rinforzo sebbene il loro contributo potrebbe variare durante le diverse fasi della dipendenza e variare anche a seconda del soggetto. La dopamina come suffragato da numerosi studi è il principale attore di questi meccanismi, per esempio il consumo di alcol può essere bloccato dalla somministrazione di farmaci che interferiscono con la normale attività di questa sostanza (antagonisti) diretti nel nucleo accumbens (centro della gratificazione e del piacere) (Hodge et al., 1997; Rassnick et al., 1992). Inoltre l'ingestione di alcol e la sua anticipazione aumentano i livelli di dopamina in quest'area (Weiss et al., 1993). Tuttavia lesioni a carico del sistema dopaminergico non aboliscono totalmente le proprietà di rinforzo dell'alcol suggerendo che la dopamina nonostante la somma importanza non sia del tutto essenziale per le proprietà di rinforzo dell'alcol. Infine l'astinenza dell'alcol produce una diminuzione delle funzioni dopaminergiche che potrebbe contribuire ai sintomi della crisi d'astinenza e favorire le recidive (Melis et al., 2005).

Ruolo del sistema GABAergico

L'acido γ -aminobutirrico meglio conosciuto come "GABA" è il principale neurotrasmettitore inibitorio del SNC. La sua funzione è mediata da due classi di recettori specifici il recettore ionotropico GABAA e il recettore metabotropico GABAB. L'alcol può aumentare l'attività Gabaergica nel cervello mediante due meccanismi generali: aumentando la probabilità di rilascio presinaptico di GABA (Roberto et al., 2003; Nie

et al., 2004), e a livello postsinaptico facilitando l'attività del ligando endogeno GABA con il proprio recettore. Inoltre l'alcol è in grado di interferire indirettamente sul recettore GABAA interagendo con una classe di neuromodulatori molto importanti, gli steroidi neuroattivi (potenti modulatori endogeni di questo recettore) (Morrow et al., 2001; Lambert et al., 2001). L'alcol, infatti, come evidenziato da numerose evidenze sperimentali è in grado di aumentare i livelli degli steroidi neuroattivi (VanDoren et al., 2000) sia promuovendo la sintesi a livello periferico (Morrow et al., 1998) sia promuovendo la sintesi a livello cerebrale (Sanna et al., 2004).

Composti in grado di interferire con l'attività del recettore GABAA (antagonisti e agonisti inversi) sono in grado di diminuire le quantità di alcol consumate in modelli sperimentali animali (Rassnick et al., 2006) mentre le benzodiazepine modulatori positivi del recettore GABAA sono utilizzate per trattare la sindrome d'astinenza acuta e non sembrano sostituire l'alcol nelle proprietà di rinforzo (Rassnick et al., 2006). Allo stesso modo composti che interferiscono con il recettore GABAB (agonisti) veicolati a livello del nucleo accumbens, bed nucleus della stria terminalis e nell'amigdala riducono il consumo di alcol (per una rassegna vedere Koob G., 2004). L'amigdala è una regione del SNC molto importante per il controllo degli stati emozionali e ricopre un ruolo importante per l'effetto delle molecole gabaergiche sulla soppressione del consumo di alcol (hyytia and Koob, 1995), infatti l'esposizione acuta e cronica di alcol produce un aumento della trasmissione gabaergica in quest'area (Roberto et al., 2003; Roberto et al., 2004). Inoltre l'esposizione cronica di alcol influenza enormemente l'espressione genica delle subunità che compongono il recettore GABAA con importanti conseguenze sulla farmacologia e sulla fisiologia di questo recettore (Follesa et al., 2003, 2004, 2005, 2006; Biggio et al., 2007) che influisce in maniera determinata sul comportamento dell'uomo e dell'animale.

Ruolo del sistema Glutamatergico

Il glutamato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del SNC; esercita i suoi effetti interagendo con diversi sottotipi recettoriali metabotropici e ionotropici tra cui il recettore N-methyl-D- aspartato (NMDA) che ricopre dei compiti molto importanti in quanto garantisce l'accesso all'interno della cellula allo ione Calcio considerato un importante "grilletto" molecolare in grado di innescare numerose reazioni all'interno

della cellula riguardanti il metabolismo e la sintesi proteica. Il sistema glutamatergico è stato già da molto tempo implicato sia nei meccanismi di rinforzo esercitati dall'alcol sia negli effetti acuti prodotti dallo stesso al punto che alcuni di essi possono essere in qualche modo mimati dall'utilizzo specifico di antagonisti selettivi del recettore NMDA (Colombo and Grant, 1992).

Come ho detto in precedenza l'alcol è in grado di modulare negativamente la componente glutamatergica in tutto il SNC portando a una depressione generalizzata dell'attività cerebrale. Per esempio l'esposizione acuta all'alcol riduce i livelli extracellulari di glutamato nello striato, sede tra l'altro del nucleo accumbens (Carboni et al., 1993); allo stesso modo il trattamento acuto inibisce l'attività eccitatoria a livello dell'amigdala e questo effetto curiosamente aumenta dopo un trattamento cronico (Roberto et al., 2004). Oltre al recettore NMDA (principale attore dell'effetto dell'alcol su questo sistema) anche il recettore metabotropico GluR5 sembra sia implicato negli effetti dell'alcol (Blednow and Harris, 2008). Tuttavia il recettore che desta più attenzioni è il recettore NMDA per via del fatto che svolge un importante ruolo nei fenomeni di plasticità sinaptica che verosimilmente portano a dei fenomeni di neuroadattamento patologici che caratterizzano il fenotipo di un alcol dipendente come l'ipereccitabilità e il craving durante l'astinenza. Inoltre composti farmacologici che hanno come target il sistema glutamatergico possono essere utilizzati per il trattamento della alcol dipendenza come per esempio l'acamprosato che attenua l'eccessivo consumo di alcol modulando il recettore NMDA e il recettore glutamatergico metabotropico (Littelton, 2007).

Ruolo del sistema oppioidergico

Gli oppioidi endogeni sono piccole molecole prodotte naturalmente dal nostro organismo che mimano, anche se sarebbe meglio dire il contrario gli effetti della morfina e sono state implicate nell'azione sia degli oppiacei esogeni sia dell'alcol.

Ci sono tre classi di peptidi oppioidi: encefaline, endorfine e dinorfine. Questi composti agiscono su tre sottotipi recettoriali denominati recettori per gli oppiacei essi sono il recettore μ , δ , e κ . Evidenze sperimentali supportano l'ipotesi che i rinforzi positivi dell'alcol siano mediati in parte da queste piccole molecole; questa ipotesi è suffragata anche dal fatto che antagonisti oppioidergici (naloxone-naltrexone) portano alla

soppressione del consumo di alcol in diversi modelli sperimentali (per una rassegna vedere Ulm et al., 1995) e dall'utilizzo di topi KO per il recettore μ che perdono completamente l'attitudine a bere (Roberts et al., 2000) suggerendo l'importanza di questi recettori nel regolare il consumo di alcol gli antagonisti oppioidi interferiscono con le proprietà di ricompensa dell'alcol a livello della VTA, del nucleo accumbens e dell'amigdala (Koob G., 2003). Inoltre il naltrexone, un antagonista aspecifico per i recettori oppioidi è utilizzato come medicinale nell'alcolismo, dove agisce con un meccanismo definito di "estinzione", è stato osservato, infatti, che alcuni effetti gratificanti dell'alcol sono mediati dai recettori oppioidi per cui un soggetto in cura con naltrexone percepisce meno gli effetti gratificanti dell'alcol. Il sistema oppioidergico influenza l'assunzione di alcol interagendo sia con il sistema dopaminergico interferendo a livello della VTA sia in maniera indipendente aumentando il contenuto di peptidi oppioidi direttamente nel nucleo accumbens (Olive et al., 2001).

Ruolo del sistema Serotoninergico

La serotonina conosciuta anche come 5-idrossitriptamina (5HT) è un neurotrasmettitore monoaminergico molto importante in diverse funzioni fisiologiche quali: regolazione del ciclo sonno-veglia, regolazione del tono dell'umore, controllo della temperatura corporea, controllo della pressione sanguigna, controllo del vomito e svolge funzioni importanti come neuromodulatore di numerosi sistemi neurotrasmettitoriali andando a regolare numerose funzioni.

L'alcol è in grado di interagire con il sistema serotoninergico, in particolare un trattamento acuto è in grado di aumentare i livelli di questo NT, mentre un trattamento cronico è in grado di ridurne i livelli agendo probabilmente sui sistemi di ricaptazione del NT o alterando i meccanismi di rilascio a livello dei nuclei del raphe (Mukherjee et al., 2008). L'alcol, come ho scritto in precedenza, interagisce con diversi substrati proteici, alcuni di questi appartengono al sistema serotoninergico e sono i recettori 5HT₃, 5HT_{1B} e il 5HT_{1A} e il neurotrasportatore per la serotonina (5HTT).

Le proiezioni serotoninergiche che dai nuclei del raphe proiettano nelle aree del sistema della ricompensa come la VTA sembra siano coinvolte nei meccanismi di rinforzo indotti dall'alcol e da altre droghe (Johnson BA, 2004). Il sistema serotoninergico oltre ad avere un ruolo importante nel consumo, nei meccanismi di rinforzo, nella

preferenza e nella dipendenza alcolica (LeMarquand et al., 1994; Uzbay et al., 1998) è importante per l'ormai assodato legame tra la deplezione di questo neurotrasmettitore e lo sviluppo di un comportamento impulsivo che conduce a un aumento del consumo di alcol (Myers and Veale, 1968; Virkkunen and Linnoila, 1990) e ad un aumento della vulnerabilità alla alcol-dipendenza (LeMarquand et al., 1994). Per questi motivi il sistema serotoninergico è stato per tanto tempo oggetto d'interesse per sviluppare nuove farmacoterapie per l'alcolismo, Infatti farmaci in grado di aumentare la disponibilità di serotonina nella sinapsi come i bloccanti del meccanismo di ricaptazione della serotonina (SSRIs) sono risultati efficaci nel diminuire il consumo di alcol in modelli sperimentali attenuando la capacità dell'alcol di produrre effetti di rinforzo anche se, come ben discusso da B.A. Johnson (Johnson BA, 2008) questi farmaci sono in grado di influenzare fortemente l'assunzione di cibo e fluidi in generale. Allo stesso tempo manipolando farmacologicamente il sistema e inducendo una deplezione della serotonina si è vista una diminuzione della preferenza nei confronti dell'alcol negli animali da laboratorio (Myers and Veale, 1968). L'antagonista selettivo per il recettore ionotropico 5HT₃ ondasetron, è un farmaco in fase di studio per la terapia dell'alcolismo, dove si è rivelato efficace nel ridurre il consumo di alcol, in particolare se combinato con altri farmaci (Naltrexone) (Sellers EM et al., 2006; Ait-Daoud et al., 2001).

Importanza dei circuiti che mediano lo stress, ruolo del CRF e del neuropeptide NPY
Il rapporto tra stress e uso/abuso di alcol ha già da qualche tempo ricevuto numerose attenzioni. L'idea di base è che l'esposizione a fattori stressanti che accadono nella vita quotidiana possano causare, nelle persone suscettibili, l'avvio o la ricaduta nell'abuso di alcol; in questi soggetti l'alcol è utilizzato per attenuare le sofferenze indotte da cause stressanti. Da una parte abbiamo che il consumo di alcol attenua gli effetti emozionali dello stress e il suo consumo aumenta nei periodi stressanti, dall'altra parte l'alcol contribuisce ad aumentare i livelli di stress creando una sorta di corto circuito che porta poi a un incremento nelle bevute. Recenti evidenze sperimentali supportano l'ipotesi che la transizione verso un fenotipo alcol dipendente coinvolga una disregolazione non solo del sistema della ricompensa ma anche dei circuiti che mediano le risposte comportamentali e neuroendocrine allo stress. L'alcol è in grado di perturbare l'omeostasi delle regioni deputate al controllo delle risposte allo stress contribuendo al manifestarsi degli stati emozionali negativi che caratterizzano il periodo di astinenza. Una delle molecole importanti nei meccanismi di segnalazione nei

circuiti dello stress è il CRF.

Il CRF è prodotto e secreto dall'ipotalamo, e il suo ruolo principale è quello di attivare l'asse ipotalamo ipofisi surrene (IIS), il principale sistema di risposta allo stress. Tuttavia l'attivazione del sistema indipendente dall'asse sempre mediato dal CRF induce un marcato aumento dello stato ansioso nell'animale. Alcune osservazioni sperimentali supportano l'ipotesi che sia proprio il sistema extra-ipotalamico di risposta allo stress a contribuire in maniera importante allo sviluppo dell'alcolismo, per esempio: ratti alcol-dipendenti mostrano un aumento di CRF nel nucleo centrale dell'amigdala (Merlo-Pich et al., 1995); antagonisti per i recettori del CRF veicolati in questa stessa area sono in grado di sopprimere un comportamento ansioso (Rassnick et al., 1993) e un aumento del consumo di alcol (Funk et al., 2006) fenomeni strettamente associati con l'alcol dipendenza.

Un'altra molecola coinvolta nella risposta allo stress dell'organismo è il neuropeptide Y (NPY). L'NPY possiede un profilo fisiologico praticamente opposto per diversi aspetti rispetto al CRF, infatti NPY ha la marcata capacità di ridurre lo stato ansioso; e il suo contenuto diminuisce significativamente nel nucleo centrale dell'amigdala durante l'astinenza (Roy and Pandey, 2002); in aggiunta, ratti selezionati per la preferenza alle bevande alcoliche presentano una minore espressione di questo peptide rispetto ai ratti non preferenti suggerendo l'importanza di questo neuropeptide nel regolare lo stato d'ansia associato a una maggiore propensione al bere (Pandey et al., 2005; Suzuki et al., 2004). Inoltre la distribuzione di questi due fattori nel SNC è altamente sovrapponibile, e la regolazione di queste aree potrebbe essere diversamente modulata a seconda del bilanciamento che si viene a creare tra queste due molecole.

Fattori di trascrizione e loro ruolo nell'alcolismo

I fattori di trascrizione sono delle particolari proteine in grado di legarsi a specifiche sequenze del DNA e regolare la trascrizione dei geni interagendo con il complesso della RNA polimerasi di tipo II (Mitchell and Tjian, 1989). I fattori di trascrizione possono incrementare o diminuire la sintesi genica in risposta a stimoli ambientali con la conseguenza di cambiare la sintesi proteica e quindi la funzionalità neuronale. Numerosi fattori di trascrizione sono stati identificati come potenziali candidati nello sviluppo delle dipendenze poiché la loro funzionalità è alterata soprattutto nelle aree

mesolimbiche a seguito dell'esposizione alle droghe d'abuso (Madsen et al., 2012). Uno dei fattori di trascrizione che ha suscitato notevole interesse è il Δ fosB grazie soprattutto alla sua inusuale stabilità. Δ fosB è una variante tronca data da splicing alternativo del gene FosB che condivide numerose omologie con gli altri membri della famiglia Fos inclusi c-Fos, FosB, Fra1, and Fra2 i quali sono in grado di formare eterodimeri insieme alla famiglia di proteine jun (c-Jun, JunB, or JunD) costituendo così il fattore di trascrizione AP-1 (Morgan and Curran, 1995). Mentre le altre forme della famiglia Fos sono rapidamente indotte e altrettanto rapidamente degradate dopo una stimolazione con farmaci d'abuso la forma del Δ fosB permane addirittura settimane dopo la stimolazione da parte delle droghe d'abuso, per questo motivo è stata indicata come "switch" molecolare che facilita la transizione verso un fenotipo dipendente (per un sommario vedere E.J. Nestler, 2008). I geni target del Δ fosB considerati importanti nella risposta alle droghe sono la subunità A2 del recettore glutammatergico AMPA, il neuropeptide oppioidico Dinorfina e la ciclina dipendente dalla kinasi 5 (CDK-5) la cui attività è associata ad un incremento delle spine dendritiche fenomeno che probabilmente determina una sensibilizzazione del sistema (E.J. Nestler, 2008). Altri target del Δ fosB sono proteine per i canali ionici, proteine di segnalazione intracellulare, proteine del citoscheletro, proteine che regolano la crescita cellulare e proteine importanti nella regolazione della cromatina (McClung and Nestler, 2003).

Il fattore di trascrizione CREB acronimo delle parole inglesi "Cyclic-AMP responsive element binding proteins" è uno dei fattori di trascrizione più studiati nel campo delle neuroscienze per via dei suoi importanti e molteplici ruoli. È importante nel promuovere molte forme di plasticità sinaptica e le memorie a lungo termine (Mayr and Montminy, 2001), promuove la sopravvivenza cellulare e protegge i neuroni dall'eccitotossicità a dall'apoptosi mediante la regolazione di fattori pro-sopravvivenza, e inoltre numerose ricerche supportano l'ipotesi di un ruolo primario svolto da CREB nella neuroplasticità indotta dalle droghe (McPherson and Lawrence, 2007; Pandey et al., 2005). CREB è espresso in maniera ubiquitaria in tutto il SNC e può essere attivato da diversi fattori come gli ormoni, i fattori trofici, l'attività sinaptica e altri stimoli cellulari che mediante una serie di vie convergenti rappresentate da diversi pathways intracellulari che regolati da altrettante proteine kinasi (CaMKII, CaMKIV, PKA e MAP Kinasi) (Pandey et al., 2005) determinano la fosforilazione a livello del residuo aminoacidico Serina 133 che compone la proteina CREB (Mayr and Montminy, 2001); la fosforilazione di CREB induce l'attivazione di questo fattore di trascrizione e il reclu-

tamento di una importante proteina la “CREB binding protein” (CBP) che insieme ad altri cofattori facilita la trascrizione di numerosi geni target di CREB.

I geni target di CREB sono numerosissimi, tra questi vi sono alcuni geni che rappresentano un target importante per gli effetti dell’etanolo nel breve e nel lungo termine come il CRF, l’NPY, la proteina Arc e la neurotrofina “brain derived neurotrophic factor” meglio conosciuto come BDNF. Come detto pocanzi numerosi studi attribuiscono numerosissime funzioni a CREB, la sua induzione è talvolta positiva mentre in alcuni casi è potenzialmente svantaggiosa, dipende dall’area in questione. Per esempio l’induzione di CREB a livello ippocampale da parte dei farmaci antidepressivi potrebbe influire positivamente sugli effetti terapeutici di questi farmaci, mentre una diminuzione dell’attività data da un utilizzo cronico di alcol potrebbe essere responsabile della perdita di neurotrofismo, della neurogenesi, della sopravvivenza cellulare e infine dei deficit cognitivi riscontrati negli alcolisti (Carlezon et al., 2005). Deficit di funzionamento di CREB soprattutto a livello del nucleo centrale dell’amigdala sono coinvolti nei meccanismi di preferenza e dipendenza dall’alcol (Moonat et al., 2010), infatti studi condotti su ratti selezionati in base o meno alla preferenza alle bevande alcoliche mostrano che l’attività di CREB era diminuita nella linea di ratti alcol preferenti rispetto ai ratti non preferenti. Inoltre il blocco farmacologico della PKA (principale attivatore di CREB) induce una diminuzione della forma attiva fosforilata di CREB ed è associata a un aumento dei comportamenti ansiosi accompagnata da un aumento delle bevute anche nei ratti selezionati per la loro scarsa attitudine alle bevande alcoliche (Pandey et al., 2006). Oltre che nell’amigdala la funzione di CREB è importante nelle aree limbiche dove un aumento della sua attività è associato a modifiche neuroplastiche che sottendono allo sviluppo di un comportamento tipico da tossicodipendente.

l’NF- κ B è un fattore di trascrizione che può essere rapidamente indotto da numerosi stimoli, inizialmente gli studi su questo fattore di trascrizione si sono focalizzati sul suo ruolo nel mediare le risposte infiammatorie e del sistema immunitario, di recente invece l’attenzione su questo fattore di trascrizione è stata catalizzata sul suo ruolo nel regolare la plasticità sinaptica e la formazione della memoria (Meffert et al., 2003). Inoltre da evidenze sperimentali si è visto come questo fattore può essere indotto nelle aree limbiche dopo l’esposizione ripetuta alle droghe d’abuso e come il suo incremento determini un aumento della densità delle spine dendritiche che come risultato porti ad un aumento della sensibilità nei confronti delle sostanze d’abuso

(Russo et al., 2009); infatti numerose ricerche si stanno focalizzando per individuare i geni target di questo fattore di trascrizione maggiormente coinvolti in questi fenomeni di neuroplasticità; inoltre il ruolo di NF- κ B nel regolare la genesi delle spine dendritiche in alcune aree cerebrali è stato di recente esteso in modelli sperimentali di stress e depressione per cui potrebbe esserci un importante ruolo svolto dall' NF- κ B nella genesi di questi disturbi che risultano strettamente associati all'abuso di sostanze stupefacenti.

Fattori Neurotrofici

Generalità

I fattori neurotrofici (FN) il cui nome prende origine dalla parola greca trofein (concernente il nutrimento), sono una classe di molecole solubili di origine proteica scoperte nella prima metà del 1900 e sono state isolate e purificate per la prima volta dalla ricercatrice italiana Rita Levi Montalcini e dal biochimico americano Stanley Cohen nel 1960 (Levi-Montalcini and Cohen, 1960). I FN possono essere secrete da diversi sottotipi cellulari (neuroni, glia, cellule amopoietiche, cellule muscolari, ecc.) e favoriscano la sopravvivenza dei neuroni che rappresentano le cellule bersaglio di queste molecole.

Essi agiscono su specifici recettori di membrana ad attività tirosin-kinasica posti sulle cellule bersaglio generando segnali intracellulari in grado di regolare i processi di sopravvivenza e di morte cellulare. In realtà i FN svolgono un ruolo ben più ampio, infatti, è oggi noto che essi sono in grado di influenzare innumerevoli processi dei neuroni come la proliferazione, il differenziamento, la neurogenesi, la neurotrasmissione e molto importante la plasticità sinaptica. Inoltre anche importanti funzioni comportamentali, quali l'apprendimento, la memoria, il tono dell'umore e l'ansia sono influenzate pesantemente dai FN; infatti, numerose patologie a carico del sistema nervoso centrale che riguardano la sfera emozionale e cognitiva sono date da una alterazione nel funzionamento di queste molecole che risultano quindi coinvolte nell'eziopatogenesi di malattie come il morbo di parkinson, l'epilessia, le demenze e di più recente concezione nelle tossicodipendenze. Dalla scoperta del primo fattore trofico l'NGF ad oggi sono state ad oggi isolate diverse molecole che possono essere annoverate tra i FN.

I fattori neurotrofici per il sistema nervoso sono classicamente raggruppati in quattro famiglie principali i cui membri sono accomunati da omologia di sequenza propria e dai loro recettori mediante i quali attivano una comune, ma non identica, trasduzione del segnale. Tra queste famiglie, quella delle neurotrofine è sicuramente la più conosciuta e ne fanno parte l'NGF, il BDNF, l' NT-3 e l'NT-4 accomunate dal fatto che si legano ad alta affinità al recettore TRK di cui abbiamo tre sottotipi (A-B-C), i quali presentano diversa affinità a seconda della neurotrofina presa in questione, per esempio il BDNF possiede un'alta affinità per il recettore TRKB, inoltre è presente un altro

recettore a bassa affinità il p75 che tra l'altro lega anche la forma immatura del BDNF (pro-BDNF).

Ipotesi neurotrofica nella tossicodipendenza

Una caratteristica comune alle droghe d'abuso è rappresentata dal fatto che gli individui che ne abusano (specie per lunghi periodi), perdono la capacità di smettere e addirittura di controllarsi nonostante sono coscienti delle severe ripercussioni sia sul piano fisico sia sul piano psicosociale che questo comportamento gli causa. Cosa esattamente succede nel cervello quando si ha la transizione da un comportamento normale a un comportamento compulsivo e incontrollato, non si sa; tuttavia è ormai evidente che cambi a lungo termine nella plasticità sinaptica (spazi comunicativi tra i neuroni) in diverse aree cerebrali (VTA, Accumbens, corteccia frontale, amigdala, ipocampo ecc.) potrebbero guidare questi cambi nei pattern comportamentali dei soggetti tossicodipendenti. È da diversi anni che si discute di una possibile relazione tra fattori neurotrofici e tossicodipendenza. Questa relazione è stata concepita in base a numerose evidenze sperimentali che mostrano come l'esposizione cronica a diverse droghe d'abuso, tra cui morfina, cocaina ed etanolo producono una serie adattamenti biochimici comuni nel sistema dopaminergico mesolimbico (Bolanos and Nestler, 2003). Come corollario di questa ipotesi abbiamo che le variazioni nel contenuto di FN sono in grado di indurre importanti modificazioni cellulari e molecolari che riflettono cambi morfologici, funzionali, ed infine comportamentali. A supporto di questa ipotesi abbiamo per esempio che la somministrazione di psicostimolanti induce nell'animale da laboratorio un aumento dell'arborizzazione dendritica (aumenta la capacità comunicativa tra i neuroni) e che il numero delle spine dendritiche (ognuna rappresenta un contatto con un altro neurone) era proporzionale ad un aumento dei livelli della neurotrofina BDNF (Robinson and Kolb, 2004); mentre un trattamento cronico con oppiacei diminuiva la dimensione di questi stessi neuroni, effetto tra l'altro revertito dalla somministrazione di BDNF (Russo et al., 2007). Questi esempi uniti ad altre numerose evidenze sperimentali (per un sommario vedere Russo et al., 2009) mostrano come le aree target delle droghe d'abuso si modificano profondamente dopo essere venute in contatto con diversi tipi di sostanze e dato il ruolo svolto dai fattori neurotrofici in questo senso si rafforza l'idea che siano proprio quest'ultimi

a mediare gli effetti a lungo termine della plasticità sinaptica indotti dall'utilizzo di droghe.

Il BDNF

L'identificazione del fattore neurotrofico di derivazione cerebrale noto con l'acronimo BDNF, una piccola proteina basica secreta naturalmente dal cervello in grado di supportare la sopravvivenza neuronale sia in vitro sia in vivo (Lindsay et al., 1985; Hofer and Barde, 1988), è stata una vera e propria "svolta" nel campo delle neuroscienze il cui impatto è in continua espansione. Da quando è stato isolato e purificato dal cervello di maiale per opera di Yves Alan Barde nel 1982, il BDNF è stato al centro di numerosissime attenzioni tanto che ha accumulato oltre 13000 pubblicazioni ed è tuttora uno degli oggetti principali di studio in numerosi campi delle neuroscienze con numerosissime funzioni e ruoli che continuamente gli vengono attribuiti. Il BDNF è la neurotrofina più abbondante del SNC dei mammiferi sia adulti sia in fase di sviluppo, inoltre la si può ritrovare anche in periferia dove risulta essere abbondante nel plasma (soprattutto nelle piastrine).

Come ben documentato, alti livelli della neurotrofina BDNF sono presenti in numerose aree cerebrali tra cui la VTA che rappresenta la principale area studiata nel campo dell'abuso e delle dipendenze, nell'amigdala e nell'ippocampo e in maniera decisamente meno marcata nello striato ventrale (la sede che ospita il nucleo accumbens) e in altre regioni cerebrali (Bolanos and Nestler 2003). Il BDNF condivide con le altre neurotrofine circa il 50 % della sequenza aminoacidica, infatti, così come le altre neurotrofine fornisce il "nutrimento" e quindi promuove il mantenimento del neurone in uno stato "trofico". Le neurotrofine sono importanti per la protezione dei neuroni del SNC e del SNP dagli insulti eccitotossici, ipossici ed ipoglicemici, suggerendo un importante ruolo svolto come promotori della sopravvivenza a seguito di una lesione (Nakao et al., 1995). Inoltre le neurotrofine sono molto importanti durante lo sviluppo del SNC dove assicurano una corretta formazione dei complessi circuiti cerebrali.

A queste caratteristiche importanti se ne aggiungono delle altre, infatti, il BDNF è in grado di favorire la crescita assonale, regola i processi di sinaptogenesi; favorisce lo "sprouting" dendritico, un effetto dipendente dall'attività sinaptica (McAllister et al., 1996); causa una locale instabilità dendritica e determina un aumento della densità

e della dimensione delle spine dendritiche (Baj et al., 2011); è uno dei maggiori regolatori della plasticità sinaptica ed è importante nei fenomeni di memoria e apprendimento (Bramham and Messaoudi, 2005), rappresenta, infatti, un fattore critico in fenomeni di plasticità come il potenziamento a lungo termine (LTP) (rappresenta un modello elettrofisiologico di plasticità neuronale che è accettato come modello cellulare di memoria e apprendimento a lungo termine) (Bliss and Collingridge, 1993); a supporto di questa tesi abbiamo che topi ko per il BDNF mostrano dei difetti nella formazione dell'LTP (Korte M. et al., 1995). Inoltre il BDNF è in grado di regolare in maniera molto rapida l'eccitabilità neuronale favorendo il rilascio del neurotrasmettitore eccitatorio glutamato e inibendo il rilascio del neurotrasmettitore inibitorio GABA (Carmignoto et al., 1997; Levine et al., 1995; Tanaka et al., 1997).

Esistono diversi livelli di regolazione del BDNF che possono portare a diversi significati funzionali come per esempio il diverso processamento proteolitico che conferisce la possibilità a questa proteina di agire su due sistemi recettoriali differenti dando origine a distinte vie di segnalazione intracellulare, o caratteristica unica tra i geni la formazione di tanti trascritti differenti (controllati da meccanismi epigenetici) con significati fisiologici e funzionali differenti (inclusa la diversa sensibilità proteolitica e la differente disposizione spaziale all'interno della cellula) che tuttavia codificano però solo per un unico prodotto proteico finale suggerendo che proprio grazie a questi innumerevoli meccanismi di controllo il BDNF è in grado di assolvere ai numerosi ruoli che gli vengono attribuiti. Inoltre più di recente sono stati scoperti dei piccoli RNA "antisense" che potrebbero esercitare un ulteriore controllo della fase post trascrizionale (Pruunsild et al., 2007).

Il gene del BDNF

L'organizzazione strutturale del gene del BDNF è stata recentemente rivista per i roditori (ratto e topo) (Liu et al., 2006; Aid et al., 2007) e per l'uomo (Liu et al., 2005; Koppel et al., 2010) portando alla scoperta di nuovi esoni che inizialmente erano cinque. Il gene del BDNF possiede una complessità strutturale e regolazionale che non trova paragoni tra gli altri geni. È, infatti, caratterizzato dalla presenza di nove diversi promotori, ciascuno posto a monte del relativo esone che possono dare origine secondo alcuni autori includendo le varianti "short" e "long" fino a 24 trascritti differenti, cia-

scuno dei quali verrà tradotto in una identica forma della proteina matura (Cunha et al., 2010). Inoltre questa grande complessità data dalla presenza dei diversi promotori aumenta considerevolmente grazie alla presenza di diversi siti di poliadenilazione ed alla presenza di differenti siti accettori e siti donatori che producono numerosi pattern di “splicing” alternativo sia tra gli esoni che all’interno di questi ultimi. Andando a vedere in dettaglio il gene troviamo che possiede otto esoni non codificanti indicati dai numeri romani (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII) i quali possono essere differenzialmente espressi grazie a fenomeni di “splicing” alternativo assieme a l’unico esone che al suo interno possiede la sequenza codificante per proteina (l’esone IX) da cui deriva la pre-pro-proteina. La trascrizione dei diversi esoni è controllata da diversi fattori, tra cui importanti fattori di trascrizione (CREB, NF- κ B, CaMKII, ecc.), dallo ione calcio (Ca^{2+}), dalla proteina methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) implicata nella sindrome di Rett e più di recente nell’addiction (Feng and Nestler, 2010), dagli ormoni, e da tutta un’altra serie di stimoli ambientali di diversa natura come l’esercizio fisico, accessi epilettici, numerosi farmaci (antidepressivi, antipsicotici) e dalle droghe d’abuso che con meccanismi attualmente sconosciuti regolano in maniera differente l’espressione delle diverse isoforme.

La presenza di un promotore specifico per ciascun esone garantisce una precisa regolazione dell’espressione delle diverse isoforme che variano a seconda del sottotipo cellulare preso in analisi ed a seconda dei differenti stimoli ricevuti. Il significato funzionale di questa complessità di espressione è stato studiato in maniera estensiva dal gruppo di ricerca guidato da Enrico Tongiorgi che ha postulato l’esistenza di un codice spazio-temporale secondo il quale le diverse isoforme che possiedono caratteristiche biologiche differenti sono trascritte e localizzate in maniera spaziale e temporale differente a seconda degli stimoli ricevuti (Chiaruttini et al., 2008; Tongiorgi E., 2008). Questa ipotesi è rafforzata anche dal fatto che alcune forme di mRNA sono implicate in funzioni di sopravvivenza mentre altri sono implicate nella regolazione dell’arborizzazione dendritica e nella formazione delle spine dendritiche e che quindi partecipano alla regolazione della plasticità sinaptica.

Biosintesi e secrezione del BDNF

Un importante step di regolazione è rappresentato a livello della biosintesi del BDNF

e a livello della maturazione e secrezione. La proteina BDNF è sintetizzata come pre-pro-BDNF; Il pre-dominio di diciotto aminoacidi è immediatamente tagliato dopo la traslocazione della proteina nascente nel reticolo endoplasmatico dando origine al pro-BDNF (32Kda). Il Pro-BDNF è trasportato nell'apparato del Golgi, dove in parte può essere clivato dando origine alla forma matura (14Kda) e parte rimane pro-BDNF, successivamente dal Golgi tramite un trasporto mediato da vescicole si diramano due vie di secrezione del BDNF, una costitutiva ed una regolata; in particolare le vescicole che fanno parte della via costitutiva possiedono un diametro più piccolo, mentre quelle regolate che vengono secrete in seguito a stimoli specifici possiedono un diametro più grande, entrambe possiedono al loro interno una miscela contenente entrambe le forme (pro-BDNF e BDNF maturo). Il pro-BDNF può quindi subire diversi destini, può essere clivato a livello del golgi durante l'organizzazione in vescicole di secrezione, può essere clivato durante il trasporto vescicolare verso la sinapsi, può essere clivato a livello dello spazio extracellulare dopo la sua secrezione o può rimanere come tale, infatti, il pro-BDNF è in grado di attivare dei pathways intracellulari specifici grazie all'attivazione del recettore p75 che può attivare due cascate: quell'apoptotica, o quella che porta all'attivazione di un importante fattore di trascrizione l'NF- κ B e promuovere fenomeni come LTD, diminuzione delle spine dendritiche, pruning. Gli enzimi deputati al clivaggio del pro-BDNF sono diversi e possiedono diversa localizzazione per esempio enzimi come la Furina e le pro-convertasi le ritroviamo all'interno della cellula e danno origine al BDNF maturo a questo livello (Mowla et al., 2001); mentre enzimi come le metallo-proteasi extracellulari e la plasmina danno origine al BDNF maturo nello spazio extracellulare (Lee et al., 2001); esiste inoltre una particolare proteasi calcio dipendente, la SK-1 che da origine alla cosiddetta forma tronca del BDNF il cui ruolo biologico non è ancora stato definito (Carlino et al., 2012). Il bilancio tra pro-BDNF e la forma matura che è controllata a livello dello spazio sinaptico si pensa sia essenziale per la regolazione della plasticità sinaptica (Pang et al., 2004).

Vie di segnalazione del BDNF e relativi target

Il BDNF è in grado di legare e attivare, sia a livello presinaptico sia post sinaptico, due differenti proteine recettoriali trans-membranali: il "tropomyosin related kinase B receptor" (TrkB) il cui legame è un legame ad alta affinità, e il "Pan neurotrophin recep-

tor 75" (p75) il cui legame risulta essere a bassa affinità. Attualmente tutti gli effetti mediati dal BDNF maturo sono attribuiti all'attivazione del recettore TrkB mentre gli effetti indotti dal pro-BDNF sono attribuiti al recettore p75 al quale si lega preferenzialmente (Teng et al., 2005), e media effetti paradossalmente opposti. Inoltre il BDNF può legarsi a una particolare forma tronca del recettore TrkB sprovvista del dominio tirosina-kinasi e quindi priva di attività intrinseca che si trova anche se in maniera non esclusiva soprattutto nelle cellule gliali (Klein et al., 1990). Questa variante tronca del recettore TrkB rappresenta un fattore che modula negativamente i meccanismi di segnalazione del BDNF poiché può formare degli eterodimeri con la variante intera del recettore che portano a internalizzazione del complesso privo di attività intrinseca (Haapasalo et al., 2002). Perciò soffermandoci su questi aspetti, potremo dire che il pro-BDNF, l'isoforma tronca del recettore TrkB e il recettore p75 rappresentano dei meccanismi regolatori negativi rispetto all'esito prodotto dal più classico legame tra forma matura del BDNF e il recettore TrkB con conseguenze importanti sulla plasticità sinaptica.

Il legame tra il BDNF e il recettore TrkB porta all'attivazione di una cascata enzimatica intracellulare che può seguire tre diversi pathways differenti: la via della fosfolipasi C γ (PLC γ), la via della fosfoinositide 3-kinasi (PI3K) e la ben caratterizzata via delle kinasi regolate dai segnali extracellulari (ERK) membro della famiglia delle "mitogen-activated protein kinasi" (MAPK) (Segal et al., 2003). Il legame del BDNF con il recettore TrkB risulta in una dimerizzazione del recettore a cui conseguono a livello del dominio citosolico catalico delle trans-fosforilazioni in residui tirosinici (Y) ben precisi. Per esempio la fosforilazione del residuo Y785 permette l'attivazione della via della PLC γ il cui pathway è implicato in un aumento del calcio intracellulare e comporta l'attivazione delle kinasi calcio-calmodulina dipendenti e della CaMKII. l'aumento del calcio intracellulare rappresenta uno dei maggiori "outcomes" di segnalazione intracellulare attivati dal BDNF a livello post sinaptico, ed eleganti studi mostrano come questo aumento di calcio agisce localmente permettendo la traduzione in situ degli mRNA che codificano per proteine necessarie per il rafforzamento della sinapsi (Wu et al., 1988; Aakalu et al., 2001), fornendo un interessante modello che spiega la rapida e accurata espressione di prodotti genici (tra cui diverse isoforme del BDNF) necessaria per il mantenimento di una sinapsi attiva direttamente a livello della sinapsi stessa. Inoltre la CaMKII è in grado di favorire la trascrizione genica del BDNF mediante fosforilazione di CREB che una volta attivata riconosce dei siti a livello del

promotore del gene e ne attiva la trascrizione (West et al., 2002). Per cui potremo dire che il BDNF regola positivamente la sua trascrizione attivando il segnale della CaMKII, in particolare questa proprietà potrebbe formare un “feedback” positivo in grado di rafforzare e stabilizzare la connessione sinaptica. La fosforilazione del residuo Y490 permette il reclutamento di particolari proteine linker (SHc, IRS1, IRS2, Grb2, SOS, Gab1) che portano poi all’attivazione dei pathways di PI3K ed ERK. La fosforilazione di ERK è promossa dalla successione nell’attivazione delle proteine Grb2, SOS, Ras, Raf e MEK che comportano la sua attivazione e successiva traslocazione nel nucleo dove è in grado di mediare l’attivazione di diversi fattori di trascrizione tra cui CREB; l’attivazione di questo pathway risulta essere principalmente implicata nella differenziazione neuronale e nella crescita assonale (Boulle et al., 2011). La successione nell’attivazione delle proteine Grb2 e Gab1 attiva la via della PI3K che porta all’attivazione della kinasi “Akt” conosciuta anche come proteina kinasi B. L’attivazione del pathway della PI3K è stato visto essere importante nel mediare effetti citoprotettivi in diversi sistemi cellulari in vitro, inclusi i neuroni ippocampali (Zheng and Quirion, 2004), tuttavia anche la via dipendente dall’attivazione di ERK è in grado di mediare effetti pro sopravvivenza. Inoltre l’attivazione di PI3K è in grado di mediare la capacità del BDNF di favorire la traduzione delle proteine nei dendriti mediante l’interazione con la proteina mTOR (mammalian target of rapamycin) (Schratt et al., 2004). L’attivazione del recettore p75 da parte del BDNF induce due cascate di segnali differenti, una mediata dalla Jun kinasi, in grado di attivare gli eventi che conducono alla morte cellulare programmata e un’altra che attiva invece i programmi di sopravvivenza grazie all’attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B. L’attivazione di questo recettore quindi non induce solo l’apoptosi, ma svolge dei ruoli importanti in fenomeni di neuroplasticità come il “pruning sinaptico”, la depressione a lungo termine (LTD), determina una riduzione delle arborizzazioni dendritiche e del numero di spine. Come ho accennato in precedenza il BDNF è in grado di modulare rapidamente l’eccitabilità neuronale agendo sui pathways intracellulari che ho qui descritto agendo sia a livello postsinaptico che a livello presinaptico; risulta infatti in grado di aumentare il rilascio del glutamato e anche del GABA dall’elemento presinaptico attraverso la fosforilazione della sinapsina (Jovanovic et al., 2000); in particolare nella sinapsi glutammatergica è in grado di aumentare il numero di vescicole disponibile nella zona attiva della sinapsi (Tyler and Pozzo-Miller, 2001). A livello post sinaptico il BDNF modula rapidamente la neurotrasmissione eccitatoria e inibitoria alterando le cinetiche di attivazione dei

recettori glutamatergici NMDA e dei recettori GABAergici di tipo A (Rose et al., 2004). La modulazione dell'eccitabilità neuronale da parte del BDNF avviene per mezzo di numerosi meccanismi come la fosforilazione dei recettori mediante l'attivazione delle kinasi, e inoltre potrebbe esserci il coinvolgimento di un importante "immediate early gene" Arc noto anche come Arg3.1 che risulta essere regolato dal BDNF (Yin et al., 2002); anche se l'esatta funzione di questo gene non è completamente chiara, è noto che Arc/Arg3.1 stabilizza il citoscheletro neuronale e regola il "trafficking" vescicolare che risulta particolarmente importante per l'esposizione dei recettori per il glutamato AMPA nella sinapsi eccitatoria (Braham et al., 2008).

Un altro aspetto curioso è che il BDNF mostra delle proprietà comuni ai neurotrasmettitori classici come la sintesi presinaptica e il successivo immagazzinamento in vescicole, un rilascio attività dipendente, il legame e l'attivazione di recettori post sinaptici con conseguente e rapida modulazione dei canali ionici (Altar and DiStefano, 1998). Un'altra funzione del BDNF è quella di regolare positivamente la neurogenesi ippocampale, la neurogenesi è considerata un importante meccanismo di plasticità neuronale (Sairanen et al., 2005).

Effetto dell'etanolo nei meccanismi di segnalazione del BDNF e sulla plasticità sinaptica

Nel capitolo precedente ho mostrato come il BDNF può essere rapidamente indotto dall'attività neuronale. La sua induzione gli permette di svolgere attivamente numerosi ruoli che riguardano la plasticità sinaptica come la crescita assonale, la regolazione della morfologia dendritica e la regolazione del numero e della morfologia delle spine dendritiche. L'alcol come ben discusso da Margaret Davis (M Davis, 2008) è in grado di interagire con tanti meccanismi di segnalazione del BDNF, ne consegue che molti dei processi che ho elencato potrebbero essere disregolati. Infatti, già da studi condotti tanti anni fa risulta chiaro come il trattamento cronico con etanolo porta a una diminuzione nella densità delle spine dendritiche (DSD) in diverse aree cerebrali (per un sommario vedere Moonat et al., 2010).

I meccanismi molecolari con cui l'etanolo induce queste modifiche sono in gran parte incomprendibili, anche se numerosi studi suggeriscono diversi spunti. L'alcol è, infatti, in grado di modulare l'attività della PLC e della PKC due kinasi associate sia ai fenomeni

di neuroplasticità sia al recettore TrkB, in particolare il trattamento cronico con alcol così come l'esposizione prenatale all'alcol diminuiscono l'attività di queste kinasi sia nell'ippocampo che nella corteccia (Alling et al., 1993; Pandey, 1996; Allan et al., 1997) inoltre la stimolazione della PLC γ da parte del fattore di crescita epidermico è inibita dall'etanolo (Thurston and Shukla, 1992). L'etanolo interagisce anche con il sistema di segnalazione di ERK; diversi studi hanno evidenziato come ci sia una attivazione di ERK (fosforilazione) dopo un trattamento acuto con etanolo mentre un trattamento cronico riporta i livelli di ERK fosforilata a valori controllo, questi studi come suggerito da Pandey mostrano anche come ci sia una correlazione tra la modulazione di ERK da parte da parte dell'etanolo e l'attività di CREB suggerendo che ERK sia un modulatore chiave con cui l'etanolo modifica l'attività di CREB a livello dell'amigdala (Moonat and Pandey, 2010). Inoltre recenti studi mostrano come l'attivazione di ERK nell'amigdala e nella VTA dopo l'infusione di bdnf e GDNF diminuisce il consumo volontario di etanolo sottolineando l'importanza dei meccanismi di segnalazione di ERK nel regolare il consumo di alcol (Carnicella et al., 2008; Pandey et al., 2006). Una serie di studi condotti dal gruppo di Pandey (Pandey et al., 2008) esplorano la possibile relazione tra etanolo, BDNF, Arc e DSD a livello dell'amigdala. Nel loro insieme questi studi mostrano come un trattamento acuto con etanolo induce un aumento di Arc e della DSD, aumenti correlati sia con l'aumento di BDNF sia con l'attivazione di CREB; viceversa, durante il periodo di astinenza dopo un trattamento cronico si assisteva ad una diminuzione del BDNF seguita da una diminuzione di creb, di Arc e della DSD, tutto ciò veniva accompagnato da un aumento del comportamento ansioso nell'animale. Inoltre l'infusione di oligodeossinucleotidi antisenso per Arc nell'amigdala di ratti naive diminuivano sia Arc che la DSD mentre aumentavano il consumo volontario di etanolo e un comportamento ansioso. Nel loro insieme questi dati suggeriscono il coinvolgimento del sistema BDNF-Arc nel regolare la plasticità sinaptica con importanti conseguenze sul comportamento di propensione all'alcol. un altro possibile meccanismo con cui l'alcol è in grado di modificare la plasticità sinaptica è suggerito da Zouh e collaboratori (Zouh et al., 2007) i quali mostrano come la diminuzione delle DSD ed una anormale morfologia dendritica a seguito di un trattamento cronico con etanolo era associata ad una up regulation a livello delle spine delle forma tronca della subunità R1 del recettore NMDA che risulta implicata nella regolazione di quest'ultime. Ancora l'etanolo diminuisce la fosforilazione della kinasi Akt nel cervello in via di sviluppo ma non nel cervello adulto (Chandler and Sutton, 2005) suggerendo che

l'Akt potrebbe essere coinvolta selettivamente nella vulnerabilità del cervello in via di sviluppo all'alcol. Inoltre l'attivazione dei pathways della Jun chinasi da parte dell'alcol suggerisce un possibile coinvolgimento di questo sistema nei fenomeni apoptotici indotti dall'alcol (Han et al., 2006).

Epigenetica

Generalità

Il DNA è stato a lungo considerato come l'unico custode dei caratteri ereditari. Oggi, però, s'inizia a decifrare un repertorio d'informazioni diverso, e più flessibile, nascosto all'interno dei cromosomi. Negli ultimi decenni, le ricerche nel campo della biologia hanno mostrato quanto siano importanti per la vita di un organismo non solo i geni, in cui sono codificate le informazioni per la sintesi delle proteine, ma anche i meccanismi che regolano l'espressione dei geni, attivandoli o silenziandoli. Esiste infatti un codice separato, scritto con caratteri chimici che si trovano al di fuori della sequenza del DNA, e che ha, a sua volta, effetti molto importanti sullo stato di salute e in generale sul fenotipo di un individuo. Questo codice è stato soprannominato "codice epigenetico" e potrebbe spiegare non solo come mai alcune malattie ereditarie possano colpire solo uno di due gemelli identici e come le esperienze dalla nascita all'adolescenza, sono in grado di plasmare in modo sostanziale conoscenze e comportamento dell'individuo ma anche come due cellule che possiedono le medesime informazioni genetiche vadano a differenziarsi in maniera completamente diversa seguendo appunto differenti "schemi" di regolazione epigenetici. La struttura del DNA è molto più complessa rispetto a una "semplice" sequenza nucleotidica, infatti, posto al di sopra della sequenza del DNA c'è un secondo livello di informazioni (l'epigenoma) che regola numerose funzioni genomiche come per esempio dove e quando i geni devono essere attivati o silenziati. Il primo a coniare il termine epigenetica che letteralmente significa al "di sopra del genoma" è stato il biologo britannico Conrad Waddington che introdusse il concetto di "panorama epigenetico" per descrivere la via con cui le cellule stabilivano il loro destino durante lo sviluppo di un organismo complesso a partire da una massa di cellule indifferenziate. Attualmente con il termine epigenetica si intende una serie di meccanismi biochimici mediante i quali si è in grado di modificare l'espressione genica durante tutto il ciclo vitale di un organismo senza alterare la sequenza genica contenuta nel DNA. Innumerevoli studi condotti negli ultimi anni mostrano come le modifiche epigenetiche sono dei fattori critici nel regolare l'espressione genica e rappresentano inoltre il meccanismo chiave con cui i fattori ambientali sono in grado di influenzare l'attività dei geni e in ultima istanza il comportamento.

I meccanismi epigenetici includono le modifiche a livello della coda degli istoni, che regolano la struttura della cromatina; il fenomeno della metilazione del DNA a livello della base citosina e la produzione di piccoli RNA non codificanti per proteina i cosiddetti MicroRNAs (miRNAs) in grado di legarsi in maniera complementare agli mRNA impedendo la loro traduzione. Per quanto riguarda il SNC i meccanismi epigenetici rappresentano un importante meccanismo per la regolazione di numerosi eventi fisiologici come per esempio i meccanismi di memoria e apprendimento e la regolazione dei ritmi circadiani, inoltre i meccanismi epigenetici sono stati implicati anche in numerosi disordini psichiatrici come la sindrome dell’X fragile, il disturbo bipolare, la schizofrenia e la tossicodipendenza (Yan Jiang et al., 2008).

Panoramica dei meccanismi di regolazione epigenetica

Nell'uomo il codice genetico è formato da circa tre miliardi di nucleotidi; poiché la distanza media tra due nucleotidi successivi in un filamento è dell'ordine di circa 0.2 nanometri (nm; 1 m = 1 miliardo di nm), il DNA contenuto in ogni cellula ha una lunghezza di circa 1 m ed è spesso 2 nm. Per essere contenuto in una cellula grande dieci micron (1m = 1 milione di micron) questo lunghissimo filamento deve necessariamente ripiegarsi su se stesso e formare strutture di complessità crescente che siano adatte a mantenerlo in forma compatta. L'interazione tra il filamento di DNA le proteine istoniche e le proteine non istoniche danno origine alla cromatina (Jaenisch and Bird, 2003). L'unità fondamentale della cromatina è il nucleosoma che consiste in ~147 paia di basi avvolte attorno a un “core” rappresentato da un ottamero istonico. Ogni ottamero istonico contiene due copie di ciascuno dei seguenti istoni che sono denominati nel seguente modo H2A, H2B, H3, H4. i meccanismi epigenetici controllano lo spazio tra i nucleosomi e il loro grado di condensazione determinando di riflesso la possibilità che avvenga o meno la trascrizione genica.

Per essere trascritto un gene deve essere “raggiunto” dai complessi proteici che ne determinano la trascrizione; se la sua sequenza è “impacchettata” la sua trascrizione non può avere luogo, al contrario se il tratto di DNA che contiene la sequenza del gene è in uno stato rilasciato la sua trascrizione può avere luogo. Per cui la cromatina può trovarsi in due stati differenti: uno stato attivato (eucromatina) dove la trascrizione genica è permessa e in uno stato inattivo (eterocromatina) dove invece la trascrizione

non può avere luogo.

La regolazione dello stato della cromatina è controllata da complessi meccanismi biochimici che coinvolgono diversi tipi di modificazione post-traduzionali degli istoni tra cui l'acetilazione e la metilazione. La metilazione in particolare rappresenta anche un altro "marks" epigenetico che avviene anche a livello del DNA che rappresenta quindi un ulteriore step di controllo epigenetico che avviene tipicamente nei cosiddetti siti CpG, in cui una citosina si trova immediatamente adiacente alla guanina (citosina e guanina sono due delle quattro basi azotate, insieme con adenina e timina, che costituiscono gli elementi fondamentali di cui sono costituite le molecole di DNA). Un altro step di controllo epigenetico è rappresentato come ho già detto in precedenza dai miRNAs.

Modificazione della coda degli istoni

Il meccanismo che determina il rimodellamento della cromatina più conosciuto e ben caratterizzato è la modifica post-trascrizionale della coda degli istoni che ha luogo in particolari residui aminoacidici che la compongono. Queste modificazioni coinvolgono l'acetilazione, l'ubiquitinazione, la SUMOilazione per quanto riguarda i residui lisinici (K); la metilazione che può avvenire oltre che nei residui lisinici anche in quelli arginici (R); la fosforilazione che ha luogo a livello della serina (S) o della treonina (T); e l'ADP-ribosilazione che invece interessa l'aminoacido glutamato (E). L'acetilazione generalmente è associata a un cambio conformazionale della coda che determina il rilascio della cromatina e favorisce la transizione del DNA nella fase attiva. Al contrario la metilazione degli istoni favorisce generalmente l'impacchettamento del DNA e la transizione nella fase inattiva. La fosforilazione ha invece un duplice significato, talvolta favorisce l'attivazione del DNA e talvolta la sfavorisce, dipende dal sito critico in cui avviene (lo stesso discorso può valere in alcuni casi anche per l'acetilazione e la metilazione). L'ubiquitinazione, la SUMOilazione e l'ADP-ribosilazione svolgono dei processi che sono ancora scarsamente compresi (E.J. Nestler, 2013).

Le molteplici e diverse modifiche a carico degli istoni supportano l'ipotesi del cosiddetto "codice degli istoni" che postula che la somma delle modifiche che avvengono nella coda degli istoni determina lo stato di attivazione del gene che può andare da uno stato altamente permissivo a uno stato di totale repressione (Jenuwein and Allis,

2001). In questi complessi meccanismi di regolazione ovviamente troviamo tanti enzimi che mediano in maniera ben orchestrata gli innumerevoli processi che portano alle modifiche covalenti della coda degli istoni. In questo quadro complesso abbiamo da una parte delle categorie di enzimi che si occupano di aggiungere questi “marks” e dall’altra un’altra categoria di enzimi che invece si occupano della rimozione degli stessi; per esempio l’enzima istone acetiltransferasi (HATs) catalizza l’aggiunta del gruppo acetilico mentre l’enzima istone deacetilasi (HDACs) catalizza la sua rimozione. La specificità dei molti enzimi che fanno parte di queste due categorie per i residui aminoacidici K sono ad oggi completamente incomprese (E.J. Nestler, 2013). Al contrario gli enzimi che catalizzano la metilazione degli istoni le istone metiltransferasi (HMTs) e quelle che catalizzano la rimozione le istone demetilasi (HDMs) sono meglio conosciute e diversi sottotipi di questi enzimi stabiliscono il grado di metilazione a livello residui R e K possiamo avere infatti sullo stesso residuo una singola metilazione ma anche una doppia e addirittura tripla metilazione complicando ulteriormente il significato funzionale di questo importante marks epigenetico.

In questa breve descrizione che ho fatto mancano all’appello centinaia di proteine che in un modo o nell’altro entrano a fare parte di questa complessa regolazione che porta alla fine regolazione dei geni, ciò enfatizza ancora di più la straordinaria complessità dei meccanismi epigenetici.

Metilazione del DNA

Come ho accennato prima il fenomeno della metilazione del DNA che consiste nella metilazione della base citosina in posizione 5 dell’anello pirimidinico dando origine alla 5-metil-citosina (5-mC) rappresenta un evento cruciale nella regolazione dell’espressione genica. La metilazione del DNA gioca un ruolo chiave in molti processi come la differenziazione cellulare, l’imprinting, la inattivazione del cromosoma X e altri. È stato osservato che questo tipo di metilazione è estremamente diffusa nel genoma degli esseri umani adulti e riguarda addirittura l’80-90 per cento dei siti CpG. Tenuto conto che i meccanismi epigenetici sono influenzati dall’interazione con l’ambiente, prende corpo l’ipotesi che proprio i processi di metilazione siano il tramite grazie al quale l’esperienza rimane fissata in modo permanente nel funzionamento del sistema nervoso, anche nei casi patologici (Lister et al., 2009).

La metilazione del DNA soprattutto nei casi dove si ha un'ipermetilazione è generalmente associata a una repressione della trascrizione genica, infatti la presenza del gruppo metilico è in grado di interferire creando un ingombro sterico con i macrocomplessi proteici che rappresentano l'apparato trascrizionale prevenendo il loro legame con le sequenze bersaglio nel DNA; inoltre può favorire il legame di particolari proteine come la MeCP2 che stabilizzano il DNA in questa conformazione di repressione.

La metilazione del DNA è catalizzata da una famiglia di proteine le DNA metiltransferasi (Dnmts) che catalizzano il trasferimento del gruppo metilico dalla S-adenosil metionina (SAM) alla citosina. Esistono diverse isoforme di queste proteine le quali svolgono funzioni differenti, per esempio le Dnmts di tipo 1 sono deputate al mantenimento dei pattern di metilazione e sono importanti per copiare i pattern di metilazione della cellula madre alle cellule figlie durante la duplicazione cellulare. Le Dnmts di tipo 3 che esistono in due isoforme (a & b) sono deputate invece alla metilazione ex novo del DNA e quindi partecipano attivamente alla riprogrammazione degli schemi epigenetici (per una rassegna su questo argomento vedere Moore et al., 2013).

La metilazione del DNA comparata con le modifiche a livello degli istoni sembra essere un meccanismo più stabile, tuttavia alcuni recenti lavori mostrano come esso sia un fenomeno dinamico soprattutto a livello del SNC e in particolare nell'ippocampo (Roth et al., 2009; Lubin et al., 2008); anche i dati presenti nella mia tesi che successivamente commenterò forniscono un'ulteriore supporto a queste evidenze. Malgrado diverse prove che descrivono una sorprendente dinamicità nel fenomeno della metilazione nel cervello i meccanismi con cui ciò avviene e i sistemi enzimatici implicati sono praticamente sconosciuti. Tuttavia a supporto di questa ipotesi ci sono nuove evidenze sperimentali che dimostrano come oltre alla classica metilazione delle citosine esistono altre modificazioni epigenetiche come per esempio l'idrometilazione delle citosine (5-HmC) che com'è stato dimostrato sono molto ben rappresentate nelle cellule staminali che come sappiamo hanno un'elevatissima capacità plastica (G. Fitz et al., 2011). Recenti studi mostrano come alcuni membri della famiglia di proteine "ten-eleven translocation" (TET) sono in grado di ossidare le 5-mC a 5-hmC e successivamente attraverso due diverse reazioni ossidative in 5-formil-citosine e 5-carbossil-citosine che sono state proposte come intermedi importanti nei pathways attivi di demetilazione delle citosine (Kellinger et al., 2012; Wu et al., 2011) e curiosamente alti livelli dei derivati dell'ossidazione delle 5-mC sono ritrovati nei neuroni (E.J.

Nestler 2013). Inoltre in contrasto con l'effetto repressivo correlato con la presenza della 5-mC abbiamo che la presenza della 5-HmC è correlata con una transattivazione (Szulwach et al., 2011).

I meccanismi classici di esplorazione che permettono di valutare la metilazione del DNA non distinguono le 5-mC dalle 5-hmC; un lavoro recente condotto da Wolf Reik che guida un gruppo di ricerca dell'Università di Cambridge uscito recentemente sulla rivista "Science" mostra il protocollo messo a punto da questo gruppo per discriminare tra queste due forme di metilazione aprendo una finestra importante in questo interessante campo di ricerca (MJ Booth et al., 2012).

RNA non codificanti

Il completo sequenziamento dell'intero genoma dei mammiferi assieme allo screening dei prodotti genici nella loro interezza ha rivelato un sorprendente numero di piccoli RNA che non erano traslati in proteine. Questi RNA non codificanti, è stato osservato, che svolgono numerosi ruoli per la corretta funzionalità cellulare (Dunham et al., 2012; Rinn and Chang, 2012). Sono solitamente composti da 20-25 nucleotidi (nt) e possono andare a ibridizzarsi in maniera complementare ai corrispettivi mRNA inibendo la loro traduzione. Più di recente sono stati scoperti una nuova classe di RNA non codificanti che sono decisamente più lunghi (>200 nt) che sembrano svolgere un ruolo chiave nella trascrizione genica. Sono in grado, infatti, di modulare le modificazioni della cromatina attraverso un'interazione con i macro-complessi trascrizionali.

Meccanismi epigenetici nelle tossicodipendenze

Sebbene la ricerca sul coinvolgimento dei meccanismi epigenetici per quanto riguarda il capitolo tossicodipendenza sia in una fase iniziale, diversi lavori mostrano come diversi meccanismi epigenetici sono alterati in diverse regioni cerebrali a seguito dell'esposizione a diverse sostanze d'abuso quali cocaina, oppiacei, alcol ecc. e a loro volta gli stessi meccanismi epigenetici regolano diversi effetti delle diverse droghe d'abuso. Alcuni dei meccanismi epigenetici sono molto stabili, il che li rende dei mediatori ideali sia per quanto riguarda la vulnerabilità verso la dipendenza, sia per quan-

to riguarda lo sviluppo di cambiamenti maladattivi nella plasticità sinaptica a lungo termine che sottendono alla tossicodipendenza. In questo contesto ci sono tre ruoli generali che i meccanismi epigenetici potrebbero giocare nello sviluppo della tossicodipendenza (Tsankova et al., 2007; Robison and Nestler, 2011).

Primo, l'esposizione alle droghe d'abuso sia durante l'adolescenza che durante la vita adulta causa dipendenza in individui vulnerabili inducendo dei cambiamenti stabili nell'espressione genica di geni specifici mediante meccanismi epigenetici. Queste modifiche possono interessare sia geni che presentano una espressione stabile sia geni inducibili. Inoltre le modifiche epigenetiche potrebbero portare all'espressione di particolari isoforme del gene che sono difficili da individuare con i classici sistemi di microarrays.

Secondo, le modifiche epigenetiche a carico dei geni, si verificano durante tutta la vita di un individuo in risposta a una serie di stimoli ambientali, questi contribuiscono sia positivamente che negativamente a determinare differenze individuali per quanto riguarda la vulnerabilità alla droghe in età adulta (Hiroi and Agatsuma, 2005).

Terzo, c'è la possibilità che le droghe così come altri stimoli ambientali inducano cambi epigenetici a livello delle cellule germinali, le quali possono passare alle nuove generazioni delle alterazioni nell'epigenoma e indurre nei nascituri la vulnerabilità o la resistenza alle droghe d'abuso, tuttavia il passaggio trans generazionale di queste modifiche nell'epigenoma rimane controverso.

Meccanismi epigenetici nell'alcolismo

In questi ultimi anni c'è un crescente interesse sul ruolo dei meccanismi epigenetici nel mediare molti dei cambiamenti strutturali e comportamentali indotti dall'alcol. Diversi studi mostrano per esempio come l'esposizione cronica all'alcol produce cambiamenti sia a livello della metilazione e acetilazione degli istoni che a livello della metilazione del DNA; questi cambiamenti modificano l'attività di numerosi geni in diverse regioni cerebrali che potrebbero contribuire allo sviluppo della patologica plasticità cerebrale associata con l'abuso e l'alcol dipendenza.

Per quanto riguarda il fenomeno della modifica della coda degli istoni diversi lavori hanno considerato questo aspetto. Uno studio condotto alcuni anni fa dal gruppo di Pandey (Pandey et al., 2008) mostra come l'esposizione acuta di alcol suscita nel

ratto un effetto ansiolico associato ad una diminuita attività dell'enzima HDAC e ad un aumento dell'acetilazione degli istoni a livello dell'amigdala. Nello stesso lavoro è mostrato anche come l'astinenza dopo un trattamento cronico suscita degli esiti esattamente opposti sia a livello comportamentale sia a livello molecolare. Inoltre i cambiamenti osservati nell'acetilazione degli istoni erano correlati anche a cambiamenti nei livelli della proteina CBP che come ho detto in precedenza ha funzione deacetilasica.

A sottolineare l'importanza di questo meccanismo diversi studi condotti con gli inibitori dell'enzima HDAC (HDACi) mostrano come queste molecole sono in grado di modificare diversi aspetti comportamentali legati all'alcol come: i comportamenti ansiosi legati all'astinenza (Pandey et al., 2008), il consumo di alcol (Wostenholme et al., 2011), la rapida instaurazione della tolleranza (Sakharkar et al., 2012), la sensibilizzazione locomotoria indotta da etanolo (Sanchis-Segura et al., 2009), infine l'iniezione quotidiana di tricostatina A (un HDACi) in topi con libero accesso a due soluzioni una contenente acqua e l'altra contenente alcol (10%) aumentava il consumo volontario della soluzione alcolica (Wolstenholme et al., 2011).

Presi nel loro insieme questi risultati suggeriscono non solo l'importanza della modificazione degli istoni nel regolare svariati aspetti comportamentali dati dall'assunzione di alcol ma anche come gli HDACi possono essere dei farmaci utili per trattare l'alcolismo.

Un altro aspetto curioso emerso da uno studio condotto su un gruppo di ratti testati in età adolescenziale e un altro gruppo di ratti testati in età adulta sottoposti a esposizione intermittente all'alcol mostravano aumenti significativi nell'acetilazione degli istoni H3 e H4 in regioni cerebrali associate al sistema della ricompensa (nucleo accumbens e corteccia frontale) sono nel gruppo di ratti adolescenti suggerendo che l'esposizione durante l'adolescenza all'alcol potrebbe contribuire ad un aumento della vulnerabilità all'alcolismo in età adulta a seguito di cambiamenti nella struttura della cromatina (Pasqual et al., 2009).

In riferimento al meccanismo della metilazione del DNA si è visto che l'alcol induce un generalizzato effetto di demetilazione del DNA in diversi tessuti periferici in diversi modelli sperimentali di alcolismo che potrebbero giocare un ruolo importante nelle patologie epatiche associate all'alcol, nello sviluppo del cancro al colon e nella sindrome alcolica fetale, tuttavia questo effetto potrebbe essere tessuto specifico perché altri studi riportano un aumento della metilazione a livello di alcune cellule del sangue (I. Poronomarev, 2013). L'alcol potrebbe indurre questo effetto periferico di

demetilazione del DNA secondo due meccanismi: il primo, inibendo mediante il suo metabolita acetaldeide l'attività dell'enzima DNMT1 (Garro et al., 1991); il secondo deriva dal fatto che l'alcol è in grado di indurre dei danni al DNA per cui i meccanismi di riparazione potrebbero portare a una demetilazione (Chen et al., 2011). A livello cerebrale la situazione risulta essere molto più complessa.

Studi epigenetici effettuati a livello di singoli geni nel cervello mostrano che gli effetti dell'alcol a livello della metilazione sono influenzati da diversi fattori come dal tipo di gene che è preso in analisi, dal periodo del ciclo vitale in cui sono condotte le analisi e dall'area cerebrale presa in esame. Alcuni di questi lavori hanno preso in considerazione l'effetto dell'alcol durante l'esposizione prenatale o in sistemi di colture cellulari da cui si evince che l'esposizione prenatale all'alcol risulta in una ipermetilazione del DNA che riduce l'espressione genica di BDNF nel bulbo olfattivo dei cuccioli associato con una perdita dei neuroni in questa area (Maier et al., 1999). I risultati relativi alle colture neuronali mostrano come l'alcol induce una down regulation di diversi geni implicati nella regolazione del ciclo cellulare determinando una ipermetilazione nei relativi promotori; questo effetto era associato a un aumento dell'attività dell'enzima DNMT (Hicks et al., 2010). Al contrario una sovraregolazione del gene che codifica per una particolare subunità del recettore per il glutamato NMDA (NR2B) è stato visto essere associata a una demetilazione delle isole CpG associate a questo promotore dopo trattamento cronico con alcol (Marutha Ravindran and Ticku, 2005).

Studi sugli umani mostrano come l'assunzione acuta di alcol induce un'ipermetilazione del gene della α sinucleina negli alcolisti; questa ipermetilazione secondo gli autori potrebbe essere responsabile del senso di sazietà in risposta all'esposizione all'alcol in questa categoria di persone (Bönsch et al., 2005).

Regolazione epigenetica del gene BDNF

Come ho detto prima il gene del BDNF possiede una struttura molto complessa e la presenza di diversi promotori posti a monte di ciascun esone fanno del BDNF un esempio di gene controllato dai meccanismi epigenetici. Il BDNF rappresenta, infatti, un affascinante esempio di come le modifiche epigenetiche controllano l'espressione genica con cambi misurabili dal punto di vista elettrofisiologico e comportamentale (Yan Jiang et al., 2008). Come discusso da Boulle e collaboratori (Boulle et al., 2011)

diversi meccanismi epigenetici sono stati associati sia a una repressione sia un'attivazione del gene del BDNF.

Un esempio è rappresentato dalla proteina MeCP2 in grado di legarsi al DNA nello stato metilato e inibire la trascrizione genica dell'esone IV del BDNF grazie anche all'ausilio di due co-repressori tra cui l'enzima istone deacetilasi di tipo 1. È stato visto che un aumento della trascrizione del BDNF dopo la depolarizzazione della membrana in colture cellulari neuronali è correlato con la fosforilazione e la dissociazione della MeCP2 dal promotore IV (Chen et al., 2003). Altri studi indicano che l'attivazione della proteina Gadd45b è necessaria per avere la demetilazione a livello dell'esone IX che risulta essere associata a un aumento della neurogenesi ippocampale nel topo.

La maggior parte degli studi volti a chiarire i meccanismi epigenetici di regolazione del gene del BDNF sono stati condotti per chiarire il loro ruolo nei meccanismi di memoria e apprendimento. In un interessante studio condotto da Lubin e collaboratori (Lubin et al., 2008) si è visto come l'incremento dei livelli del trascritto del BDNF contenente l'esone IV è correlato con la diminuzione della metilazione del DNA nel promotore corrispondente, il quale risulta essere direttamente correlato ad una sovraespressione dell' mRNA totale (esone IX) nell'ippocampo di ratto durante il consolidamento del ricordo di una situazione che nell'animale suscita paura. Inoltre c'è una consistente possibilità che la metilazione del DNA a livello del gene del BDNF rappresenti un cruciale meccanismo che regola i cambiamenti associati alla plasticità sinaptica ippocampale (Lubin et al., 2008). Dagli esempi che ho citato, risulta chiaro come l'esone IV rappresenta un target preferenziale per le modifiche epigenetiche infatti il suo promotore è ricco di elementi di regolazione che rispondono a una moltitudine di fattori tra cui: 3 diversi elementi responsivi allo ione calcio, elementi di riconoscimento per CREB e per NF- κ B ed è controllato ulteriormente dalla proteina MeCP2 (Zheng et al., 2011). Inoltre anche farmaci d'abuso come lo psicostimolante cocaina induce modifiche a questo livello, per esempio in un modello sperimentale di autosomministrazione di cocaina, c'è un'acetilazione dell'istone H3 (in corrispondenza di questo esone) associata a una ridotta occupazione del DNA da parte della MeCP2 che producono nel loro insieme un aumento della sua trascrizione (Sadri-Vaikili et al., 2010). Per quanto riguarda il capitolo dipendenze pochi lavori sono stati condotti per chiarire il ruolo svolto da queste modifiche epigenetiche a livello del gene del BDNF, questo è anche uno dei motivi per cui lo studio contenuto nella mia tesi è stato svolto.

OBIETTIVI

L'alcolismo rappresenta una patologia cronica, recidivante e multifattoriale data da una complessa interazione tra fattori di vulnerabilità genetica, fattori ambientali e sociali.

Gli individui che ne sono affetti perdono il controllo dei meccanismi inibitori con conseguente ricaduta nell'abuso della sostanza. Questo li porta ad andare incontro a numerosi fenomeni d'intossicazione, con gravi ripercussioni sia a livello fisico sia a livello psico-sociale. Il passaggio da un utilizzo moderato a un utilizzo compulsivo e persistente si pensa sia sostenuto da fenomeni di plasticità neuronale a lungo termine in diverse aree cerebrali.

Queste modifiche nella plasticità cerebrale coinvolgono dei cambiamenti nei pattern di espressione di diversi geni e un appetibile candidato nel mediare molti di questi processi omeostatici è la neurotrofina BDNF.

Dagli studi condotti negli ultimi dieci anni, risulta chiaro come i fenomeni epigenetici siano in grado di guidare cambiamenti a lungo termine dell'espressione genica che potrebbero essere alla base dell'alcol dipendenza.

Per questo motivo, lo scopo del mio lavoro è stato quello di valutare come cambia l'espressione genica del BDNF in diverse condizioni sperimentali: acuto, cronico e relativi periodi di astinenza nel modello sperimentale delle colture cellulari neuronali. Inoltre, data l'importanza attribuita da una parte ai fenomeni epigenetici e dall'altra al BDNF nell'eziopatogenesi dell'alcolismo e più in generale nelle tossicodipendenze, pochi studi si sono focalizzati sulla regolazione epigenetica del BDNF. È stato quindi un mio compito valutare l'effetto dell'etanolo sullo stato di metilazione del promotore dell'esone IX del gene del BDNF (questo esone è l'unico con la sequenza codificante per la proteina e ci da indicazioni sulla quantità di trascritto totale) sia "in vitro" sia "in vivo".

La conoscenza dello stato del promotore che può essere diversamente regolato dall'esposizione all'etanolo, può offrire informazioni utili e importanti spunti per lo sviluppo di farmaci o terapie mirate a questo livello, le quali potrebbero risultare utili a fini terapeutici.

MATERIALI E METODI

Culture primarie di cellule granulari di cervelletto di ratto

Per la preparazione delle colture primarie di cellule granulari di cervelletto (CGC) sono stati utilizzati animali Sprague-Dawley; all'ottavo giorno di vita sono stati sacrificati mediante decapitazione, è stato prelevato loro il cervelletto e trasferito in una soluzione contenente (valori espressi in g/100mL di soluzione) 0,3 di albumina; 0,0306 di magnesio; 0,707 di cloruro di sodio; 0,036 di cloruro di potassio; 0,214 di bicarbonato di sodio; 0,0166 di fosfato di potassio. Per poter ottenere una resa elevata è importante che siano trascorsi precisamente 8 giorni, poichè è il momento nel quale lo strato granulare raggiunge il suo massimo spessore. I cervelletti vengono puliti accuratamente dalle meningi e sminuzzati con un bisturi sterile, per poi essere centrifugati a 1000 rpm per un minuto e mezzo. Al termine della centrifugazione si ha la formazione di un pellet che viene sospeso in una soluzione costituita da tripsina estratta da pancreas bovino (12,5 mg in 50 mL; Sigma) e incubato nel bagnetto termostatico alla temperatura di 37°C per 10 minuti; la tripsina ha il compito di digerire il tessuto di connessione tra le cellule per poter rendere più semplice la separazione meccanica. L'aggiunta di una soluzione costituita da siero bovino fetale blocca questo passaggio, e l'enzima DNasi degrada il DNA fuoriuscito dalle cellule lisate. Il tessuto è stato centrifugato a 1000 rpm per un minuto e mezzo; ottenuto il pellet viene sminuzzato mediante pipetta Pasteur precedentemente lavorata con la fiamma in modo da ridurre ulteriormente il suo diametro. La sospensione delle cellule viene lasciata decantare per 10 minuti allo scopo di far precipitare i frammenti di maggiori dimensioni e recuperare le cellule rimaste in sospensione. Questa procedura viene ripetuta altre due volte, e al termine della terza decantazione, la frazione in sospensione contenente le cellule viene trasferita in un nuovo tubo e centrifugata a 1000 rpm per 5 minuti. Al termine della centrifugazione si forma un pellet che viene risospeso nel medium di crescita, preparato a partire dal Basal Eagle's Medium contenente siero bovino fetale al 10% inattivato al calore (56°C per 30 minuti), glutammina 2 mM, gentamicina (100 µg/mL Sigma), streptomicina/fungizone 10 µL/L (penicillina 100 U/mL, streptomicina 0,1 mg/mL e anfotericina 0,25 µg/mL; Sigma). Inoltre è stato aggiunto KCl 25mM, una concentrazione elevata affinché le cellule crescano in condizioni depolarizzanti.

Le cellule vengono infine seminate in capsule Petri (10 ml per piastra con diametro di 100 mm), per ottenere una densità di $12,5 \times 10^6$ cellule in 10 mL di medium per piastra. L'adesione cellulare è garantita dallo strato di Poly-L-Lysina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma) che forma un sottile film carico positivamente. Le colture cellulari vengono mantenute in crescita in un incubatore alla temperatura di 37°C , con un'atmosfera umidificata e con una tensione controllata di CO_2 al 6%. Successivamente, tra le 18 e le 24 ore, viene aggiunta una soluzione di citosina arabinofuranoside alla concentrazione finale di 10 μM per inibire la crescita di cellule non neuronali soprattutto di cellule gliali. Una volta eseguito questo step le cellule sono pronte per il trattamento farmacologico. All'ottavo giorno di coltura le cellule, raggiunta la maturazione, vengono raccolte in 3 ml di una soluzione denaturante (SOL-D), costituita da guanidio isotiocianato 4M, Sarcosyl 0,5% e sodio citrato 25 M a pH 7 per l'estrazione dell'RNA totale; o in un tampone fosfato salino (PBS) composto da NaCl all'8%, da KCl allo 0,2%, da Na_2HPO_4 all'1,44%, e da KH_2PO_4 allo 0,24% per l'estrazione del DNA genomico.

Trattamento Farmacologico

Le CGC sono state divise in diversi gruppi sperimentali a seconda del tipo di trattamento che si intendeva effettuare. Per quanto riguarda il trattamento acuto, il nostro trattamento prevede una esposizione della durata di tre ore che viene effettuata l'ottavo giorno prima della raccolta in questo caso la concentrazione saggiata è stata 100mM. Per quanto riguarda il trattamento cronico, il nostro modello prevede l'esposizione consecutiva all'etanolo per cinque giorni dove abbiamo preso in analisi due concentrazioni 50mM e 100mM. Per valutare successivamente gli effetti indotti dall'astinenza abbiamo ritirato l'etanolo rimpiazzandolo con il medium di coltura "drug free" sia nel gruppo trattato in acuto che nel gruppo trattato in cronico. Il periodo di astinenza è stato di 3 ore per quanto riguarda l'acuto e di 3 e 6 ore per quanto riguarda il cronico. In due ulteriori gruppi abbiamo testato due farmaci inibitori delle DNMT Zebularina ed RG-108 a diverse concentrazioni (25-50 μM) (20-40 μM) rispettivamente. Le cellule di controllo invece hanno ricevuto sempre il medium di coltura "drug free".

Animali e trattamento farmacologico

Gli animali utilizzati per l'esperimento sono ratti maschi adulti del ceppo Sprague Dawley di due mesi e mezzo d'età dal peso di ~ 300-340 g. Abbiamo veicolato in peritoneo mediante iniezione dosi crescenti di etanolo 0.8; 1.6; or 3 g/kg disciolti in un volume di ~1,3 ml di soluzione salina, mentre gli animali di controllo hanno ricevuto uno stesso quantitativo di salina. Gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione a 1,3 e 5 ore dopo il trattamento. Il cervello è stato prontamente rimosso dalla scatola cranica, dissezionato e gli ippocampi sono stati rimossi e rapidamente congelati a -80° in ghiaccio secco e mantenuti in questa condizione sino al giorno delle analisi. Dei campioni di sangue sono stati raccolti per l'analisi dell'etanolemia.

Quantificazione degli mRNA che codificano per la neurotrofina BDNF

L'RNA totale è stato estratto sia dal lisato cellulare che dall'ippocampo di ratto mediante il TRI REAGENT® (Sigma) seguendo le indicazioni contenute nel libretto delle istruzioni allegato. Successivamente un'aliquota di questo RNA totale è stata retrotrascritta in cDNA (mediante il Kit iScript™ cDNA Synthesis della BIORAD) utilizzato come stampo per la PCR. La RT-PCR semiquantitativa è stata effettuata per misurare l'abbondanza degli mRNA che codificano per l'esone IX del BDNF. Il gene "house Keeping" β -tubulina è stato utilizzato come standard interno. I primers specifici, le condizioni dei cicli di polimerizzazione sono state reperite in letteratura dove sono esaurientemente descritte dal gruppo di neurobiologia dell'università dell'Alabama (Lubin FD et al., 2008; Roth et al., 2009). Il termociclatore utilizzato è il CFX96™ Real Time System della Biorad.

Analisi dello stato di metilazione del promotore

Per valutare lo stato di metilazione del promotore ci siamo serviti di una particolare applicazione della PCR chiamata "methylation specific PCR" (MSP) descritta per la prima volta da Herman e collaboratori Nel 1996 (Herman et al., 1996). La tecnica che ci permette di effettuare questo saggio è data da tre passaggi fondamentali. Primo,

estrazione e normalizzazione del DNA genomico dal lisato cellulare o da tessuto mediante un kit commerciale (Wizard® Genomic Dna Purification Kit). Secondo, prelievo di una aliquota del DNA genomico che verrà poi processato mediante il kit CpGenome™ Turbo Bisulfite Modification Kit (Millipore) in grado di convertire le citosine non metilate nella base uracile, lasciando le citosine metilate come tali (in questo modo si può discriminare la citosina metilata da una non metilata). Terzo, amplificazione con la PCR della sequenza bersaglio del DNA modificato (nel nostro caso il promotore dell'esone IX del BDNF) mediante dei set primer progettati in maniera specifica per amplificare il DNA nella forma demetilata e un altro set di primers specifici che amplificato selettivamente il DNA nella forma metilata. Come per la RT-PCR I primers specifici, le condizioni dei cicli di polimerizzazione sono state reperite in letteratura nei medesimi lavori utilizzati per la quantificazione degli mRNA (Lubin FD et al., 2008; Roth et al., 2009). Il termociclatore utilizzato è il CFX96™ Real Time System della Biorad.

Analisi dell'etanolemia

Da ciascun animale sono stati prelevati circa 150 µl di sangue e trasferiti in un tubo da 1,5 ml contenente 10 µl di eparina, e dopo averli miscelati sono stati prelevati 100 µl e trasferiti in vials per gas cromatografia chiusi ermeticamente. Tutti i campioni di sangue sono stati analizzati per valutare la concentrazione di etanolo mediante gas cromatografia. La concentrazione del campione è stata determinata mediante interpolazione sulla curva standard, il limite di sensibilità di questo sistema è 0.05 mM di etanolo. Gli standard sono stati preparati facendo una serie di diluizioni di etanolo in ACSF e diluendo ulteriormente ogni standard con 0.75 M di acido perclorico per mimare la raccolta del campione. In aggiunta, 2 µl di ogni soluzione standard sono stati messi in vials. Prima del saggio i campioni e gli standard sono stati riscaldati per almeno 45 minuti in un bagnetto a 65°C. Dopo il riscaldamento, 1 ml proveniente da ogni vial è stato iniettato sulla colonna gas cromatografica e l'altezza del picco è stata registrata dal cromatogramma. I valori di concentrazione sono stati espressi in mg di etanolo per decilitro di sangue (mg/dl). Le analisi ci sono state gentilmente offerte dal Dipartimento di Sanita Pubblica di Medicina Clinica e Molecolare (Università Degli Studi di Cagliari) in particolare dal Dott. Antonio Ibba.

Analisi statistica

I dati sono presentati come media \pm SEM e comparati con un'analisi della varianza a una o due vie (ANOVA) e con i t tests (and nonparametric tests) con l'uso del software Prism (versione 5, GraphPad). Un valore p inferiore di 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Effetto dell'esposizione acuta all'etanolo e della successiva astinenza nell'espressione genica dell'esone IX della neurotrofina BDNF

Servendoci del modello sperimentale delle colture cellulari neuronali, in particolare cellule granulari cerebellari di ratto, abbiamo testato l'effetto di un'alta concentrazione di etanolo (100mM). I dati ottenuti (Figura 1) mostrano come 3 ore (h) di esposizione all'etanolo inducono un significativo aumento dell'espressione genica dell'esone IX del BDNF rispetto al gruppo di controllo. In un altro gruppo sperimentale abbiamo trattato le cellule alla stessa concentrazione e dopo le 3 h abbiamo sospeso il trattamento ritirando il medium con etanolo e sostituendolo con il medium "drug free" per valutare se una fase astinenziale dopo trattamento acuto potrebbe portare a cambiamenti nell'espressione genica. L'analisi degli mRNA ha rivelato come un ritiro di 3 h dell'etanolo è in grado di revertire gli effetti visti in precedenza.

Effetto dell'esposizione cronica all'etanolo e successivo periodo di astinenza nell'espressione genica dell'esone IX della neurotrofina BDNF

Abbiamo misurato i livelli di espressione genica dell'esone IX del BDNF anche dopo un trattamento cronico (5 giorni consecutivi) prendendo in considerazione due concentrazioni di etanolo 50 e 100 mM. L'analisi della PCR (Figura 2) ha rivelato un aumento significativo nella quantità di mRNA in seguito al trattamento con la dose di 100mM rispetto al controllo mentre non sono stati osservati aumenti significativi per la concentrazione di 50mM dove si nota una certa tendenza all'aumento del trascritto. In altri 2 gruppi sperimentali abbiamo valutato la fase di astinenza dopo trattamento cronico soffermandoci in due tempi differenti 3 e 6 h. i dati ottenuti relativi a questi due tempi mostrano al contrario di ciò che abbiamo osservato nel trattamento acuto un mantenimento della up-regulation degli mRNA per l'esone IX a 3h che diventano più consistenti dopo 6h (Figura 3).

Analisi dello stato di metilazione del promotore del gene del BDNF e della sua espressione dopo esposizione acuta all'etanolo e a due molecole inibitrici dell'enzima DNMT

Dato che la metilazione del DNA a livello del promotore del gene rappresenta un potenziale meccanismo che contribuisce alla regolazione dell'espressione genica, abbiamo deciso di valutare lo stato di metilazione del gene del BDNF (esone IX) dopo esposizione acuta all'etanolo nelle colture cellulari neuronali. Inoltre per valutare la veridicità di questo modello sperimentale ci siamo serviti di due molecole inibitrici dell'enzima DNMT la Zebularina e l'RG-108 usate come controllo positivo. I risultati ottenuti con la PCR "MSP" (Figura 4) mostrano come entrambe le molecole inducono un marcato e significativo aumento delle quantità di DNA demetilato rispetto al controllo. Gli effetti ottenuti da entrambe le molecole sono dose-dipendente e sono più marcati nel gruppo trattato con RG-108 rispetto a quelli ottenuti nel gruppo trattato con la Zebularina. Inoltre dall'analisi degli mRNA relativi al trattamento con Zebularina (Figura 5) emerge una correlazione positiva tra demetilazione del promotore e incremento dell'espressione genica (Figura 6). I dati relativi al trattamento con etanolo ottenuti utilizzando il set di primer specifici per il DNA demetilato mostrano come il trattamento acuto induce un aumento significativo della quantità di DNA demetilato rispetto al controllo ed anche in questo caso è associato ad un aumento dell'espressione genica (Figura 7). Le analisi effettuate sui campioni del gruppo trattato con etanolo acuto valutato però con il set di primer specifici per il DNA che si trova nello stato metilato rivelano al contrario come ci sia una diminuzione del DNA metilato rispetto al controllo. Il grafico (Figura 8) mostra le differenze ottenute nello stesso gruppo sperimentale utilizzando i due set di primer differenti.

Analisi dello stato di metilazione del promotore del gene del BDNF e della sua espressione nell'ippocampo di ratto dopo somministrazione di dosi crescenti di etanolo

Visti i risultati ottenuti nel modello "in vitro" abbiamo effettuato lo stesso tipo di analisi sull'animale adulto e in particolare su ratti del ceppo Sprague-Dawley dove abbiamo preso in considerazione l'ippocampo in quanto precedenti studi mostrano come

il promotore è regolato in maniera dinamica durante l'apprendimento. Per questo esperimento abbiamo veicolato dosi crescenti di etanolo (0.8; 1.6; or 3 g/kg) nel peritoneo di ratto e abbiamo sacrificato gli animali in tempi diversi (1, 3 e 5h) per avere una descrizione temporale di questo fenomeno. I risultati ottenuti al primo punto (1h) della sequenza temporale mostrano come per tutte e tre le dosi prese in esame ci sia un aumento significativo delle quantità di DNA demetilato rispetto ai controlli (Figura 8); inoltre non abbiamo riscontrato differenze all'interno dei gruppi di animali trattati con le diverse dosi di etanolo. Le differenze iniziano a delinarsi invece nel secondo punto della "time course" dove non vediamo più aumenti significativi di DNA demetilato per la dose più bassa mentre continuiamo ad osservarli per le altre dosi (Figura 9); in questo grafico si delinea un effetto dose dipendente che come possiamo vedere nel grafico seguente (Figura 10) è associato ad un incremento dell'espressione genica. Allo stesso modo non vediamo più aumenti sia per la dose più bassa che per quella intermedia dopo 5 h mentre aumenti significativi nelle quantità di DNA demetilato sono mantenuti per la dose più alta presa in analisi (Figura 11), suggerendo che lo stato di metilazione del gene è un fenomeno rapidamente reversibile e che potrebbe essere influenzato da quelle che sono le concentrazioni di alcol nel sangue.

Analisi delle concentrazioni di alcol nel sangue

Le analisi sulle concentrazioni ematiche di etanolo sono state effettuate negli animali trattati con 1,6 e 3 g/kg sacrificati nei tre diversi tempi dopo l'iniezione. Come si può vedere in questo grafico (Figura 12), i valori relativi all'etanolemia erano di: 87.51mg/dl, 35.43 mg/dl and 1.21 mg/dl rispettivamente dopo 1, 3 e 5h per la dose di 1,6 g/kg; mentre erano di 304.79 mg/dl, 156.51mg/dl and 69.98 mg/dl rispettivamente dopo 1, 3 e 5h per la dose 3 g/kg.

DISCUSSIONE

Uno degli scopi della mia tesi è stato quello di valutare come cambia l'espressione genica del BDNF a seguito dell'esposizione all'alcol in diverse condizioni sperimentali: acuto, cronico e relativi periodi di astinenza. A questo scopo mi sono servito del modello sperimentale delle colture cellulari neuronali, in particolare le cellule granulari cerebellari. Questo modello sperimentale è stato ampiamente utilizzato per valutare gli effetti tossici dell'alcol a livello del cervelletto il quale rappresenta un'area molto sensibile agli effetti dell'etanolo soprattutto durante il periodo dello sviluppo (Jia Luo, 2012). Inoltre questo modello rappresenta un eccellente sistema per studiare i meccanismi cellulari e molecolari con cui l'etanolo esplica i suoi effetti a livello neuronale consentendo eventualmente di valutare diverse strategie terapeutiche. I risultati che ho ottenuto riguardano l'esone IX del BDNF, ho deciso di valutare in maniera specifica questo esone in quanto è l'unico che al suo interno possiede la sequenza codificante per la proteina e pertanto ci consente di avere una valutazione del trascritto totale. I risultati ottenuti mostrano come una alta concentrazione di etanolo (100mM) induce sia in un trattamento acuto che in un trattamento cronico un aumento significativo dell'espressione genica del BDNF, mentre non abbiamo osservato aumenti significativi in cronico per una dose più bassa (50mM). Per quanto riguarda poi il successivo periodo di astinenza, abbiamo trovato sempre un aumento del BDNF ma solo nel trattamento cronico, l'aumento significativo era osservabile già dopo 3 h dalla sospensione del trattamento e dopo 6 h era addirittura più consistente, mentre abbiamo trovato un ritorno ai livelli basali dopo 3 h dalla sospensione nel trattamento acuto.

Data l'entità della concentrazione utilizzata, l'aumento del BDNF che abbiamo osservato sia in acuto che in cronico per la dose più alta, potrebbe essere ricondotto al ruolo svolto dal BDNF come fattore citoprotettivo e mediatore della sopravvivenza neuronale volto a proteggere i neuroni durante la forte sollecitazione indotta dall'alcol o dai suoi metaboliti (Stahl et al., 2011; Harper and Matsumoto, 2005). Questa ipotesi è coerente con precedenti studi che mostrano come le neurotrofine in generale e in particolare il BDNF svolgono un ruolo citoprotettivo in grado di limitare i danni causati dall'etanolo nello stesso sistema sperimentale (Bhave et al., 1999; Bonthius et al., 2003; Heaton et al., 2000). Inoltre la somministrazione di BDNF endogeno previene la morte neuronale in colture cellulari (Stahl et al., 2011; Harper and Matsumoto, 2005)

per cui un aumento della sua espressione in questo contesto è ampiamente motivata da queste evidenze.

Al contrario uno studio condotto da Heaton e collaboratori (Heaton et al., 2004) mostra come ci sia una diminuzione nella secrezione del BDNF (analizzato nel medium di coltura) dopo 24h di trattamento con alte dosi di etanolo; questa differenza potrebbe essere data da diversi fattori tra cui: il diverso ceppo di ratti utilizzato; le differenze nel medium di coltura; le differenti concentrazioni prese in analisi; i diversi tempi in cui è stata condotta l'analisi. In aggiunta come osservato da McAlhany e collaboratori la diminuzione della secrezione delle neurotrofine indotta dall'alcol non è accompagnata dalla diminuzione dell'espressione genica (McAlhany et al., 1999).

La differenza nell'espressione genica del BDNF, relativa alle due concentrazioni analizzate nel trattamento cronico, potrebbe essere spiegata analizzando diversi lavori presenti in letteratura e dalla nostra osservazione (che non ho incluso nei risultati) che un trattamento acuto con etanolo 50mM porta ad un aumento dell'espressione genica. Miller (Miller MW 2004), mostra nel suo lavoro un iniziale incremento nell'espressione genica del BDNF a cui segue, col tempo, una progressiva diminuzione. Pertanto potrebbe esserci un iniziale aumento volto al recupero della omeostasi che in seguito viene meno con una esposizione cronica (McGouch et al., 2004; Miller and Mooney, 2004). Questo è coerente con quello da noi osservato nel trattamento cronico con la dose di 50mM e con l'evidenza che la stessa concentrazione usata in acuto porta ad un aumento dell'espressione genica. Questo fatto non si verifica per la concentrazione di 100mM (tale concentrazione rappresenta una condizione "estrema" ai limiti dei range fisiologici) che potrebbe richiedere dei tempi di adattamento maggiori.

Presi nel loro insieme questi risultati supportano l'ipotesi che il BDNF svolga differenti ruoli nelle diverse fasi acuto cronico e astinenza. In particolare, nella fase iniziale, durante l'esposizione acuta un suo aumento potrebbe rappresentare un meccanismo omeostatico messo in atto per contrastare le alterazioni neurochimiche e per quanto riguarda gli studi in vivo le alterazioni comportamentali indotte dall'alcol (McGouch et al., 2004). Questo è supportato dall'evidenza che l'etanolo da una parte induce una depressione del SNC facilitando la trasmissione inibitoria Gabaergica e inibendo quella eccitatoria glutamatergica (Lovinger et al., 1989; Carta et al., 2004; Valenzuela CF, 1997) mentre il BDNF è in grado di modulare rapidamente l'eccitabilità neuronale agendo in maniera opposta (Cheng and Yeh, 2003; Levine et al., 1995; Levine et al.,

1996; kim et al., 1994; Knipper et al., 1994; Tanaka et al., 1997), attenuando di fatto le alterazioni neurochimiche e come discusso McGouch e collaboratori mitigando quelle comportamentali incluso il consumo (McGouch et al., 2004). Questo meccanismo durante il trattamento cronico potrebbe venire meno o subire addirittura una down-regulation (Miller and Mooney, 2004). Questo aspetto potrebbe essere ricondotto in funzione del ruolo svolto dal BDNF nella plasticità sinaptica che potrebbe portare a delle modifiche strutturali in abitudine ad una condizione persistente che infine, porterebbero ad un abitudine del segnale mediato dal BDNF (M. Davis, 2008). Infine dopo la brusca interruzione che si verifica nella fase di astinenza dopo trattamento cronico potrebbe esserci una up-regulation del BDNF dovuta ad una sua continua inibizione (Tapia-Arancibia et al., 2001); che si renderebbe necessaria per operare un altro cambio di plasticità sinaptica in funzione della nuova situazione rappresentata in questo caso dall'assenza di alcol.

In questo senso è interessante notare come abbiamo osservato un mantenimento di alti livelli di BDNF dopo 3h di astinenza dopo trattamento cronico che aumentano dopo 6h, mentre non abbiamo osservato aumenti dopo la sospensione del trattamento acuto. Ulteriori studi che prendano in considerazione concentrazioni più basse di etanolo e la valutazione di un periodo di astinenza dopo trattamento cronico con l'alcol 50mM sono necessari per chiarire meglio questi aspetti.

Ci sono numerosi studi, condotti da altrettanto numerosi gruppi di ricerca che hanno abbondantemente esplorato gli effetti dell'alcol sull'espressione genica del BDNF. Ad oggi però (per quanto riguarda le mie conoscenze) non ci sono degli studi che hanno valutato gli effetti dell'alcol sulla metilazione del DNA a livello del promotore del gene del BDNF durante l'esposizione all'alcol. L'unico studio che prende in considerazione questo aspetto è stato condotto da Maier e collaboratori (Maier et al., 1999) in un modello di esposizione prenatale all'alcol che riguarda però l'effetto dell'alcol durante lo sviluppo del cervello. Vista quindi la mancanza di risultati in questo senso e per capire se questo meccanismo rappresenta un importante fenomeno in grado di mediare gli effetti dell'alcol sull'espressione genica del BDNF; abbiamo deciso di esplorare questa ipotesi, dapprima in un modello "in vitro" (colture cellulari neuronali) e successivamente "in vivo" nel ratto adulto.

A tale scopo mi sono servito della PCR "MSP" che rappresenta un rapido e sensibile strumento per valutare lo stato di metilazione del DNA a livello della sequenza di interesse. I dati ottenuti con la PCR mostrano come il trattamento acuto con etanolo

100mM eseguito sulle colture CGC è in grado di promuovere la rimozione dei gruppi metilici posti a livello del promotore dell'esone IX e come questa demetilazione indotta dall'alcol aumentava in maniera significativa l'espressione genica dello stesso esone. Inoltre l'effetto ottenuto dopo la somministrazione di alcol era simile a quello ottenuto trattando un altro gruppo di cellule con due molecole inibitrici dell'enzima DNMT (Zebularina ed RG-108) suggerendo l'importanza di questi enzimi nel controllare in maniera dinamica lo stato di metilazione del promotore del gene e di conseguenza la sua espressione. Infatti anche l'analisi degli mRNA effettuata sul gruppo di cellule trattate con Zebularina ha rivelato un robusto e significativo aumento degli mRNA che codificano per il corrispondente esone. Diversi studi hanno di recente evidenziato l'importante ruolo svolto da questi enzimi e in particolare dall'isoforma 3a nel modulare alcuni effetti della cocaina (Anier et al., 2010; LaPlant et al., 2010). In particolare in questi studi è stata valutata come cambia l'espressione dell'enzima DNMT3a nel nucleo accumbens durante l'esposizione acuta, cronica e successiva astinenza alla cocaina. Inoltre nello studio condotto da LaPlant e collaboratori l'infusione locale di Zebularina ed RG-108 aumentava le risposte comportamentali alla cocaina, mentre una over-espressione locale (indotta geneticamente) dello stesso enzima attenuava le stesse risposte comportamentali. Nonostante queste evidenze che sottolineano l'importanza del ruolo svolto da questi enzimi i meccanismi precisi con cui l'etanolo induce questi effetti sono sconosciuti. Tuttavia ci sono delle evidenze sperimentali recenti che mostrano come l'alcol è in grado di inibire l'attività dell'enzima DNMT e di limitare in un secondo momento la sua espressione a livello genico (Zhang et al., 2014). Inoltre una precedente osservazione fatta da Garro e collaboratori evidenzia come anche l'acetaldeide (metabolita dell'alcol) è in grado di inibire le DNMTs (Garro et al., 1991). Di recente uno studio condotto dal gruppo di E. J. Nestler (E. J. Nestler 2013) (osservazioni non pubblicate) ha focalizzato l'attenzione sull'espressione della proteina TET1 (è stata di recente implicata nei meccanismi di demetilazione attivi del DNA) nel nucleo accumbens dopo esposizione cronica alla cocaina. Come riportato da questo autore l'esposizione cronica alla cocaina diminuisce l'espressione genica di questa proteina che potrebbe essere quindi inserita al centro di studi futuri per quanto riguarda l'esposizione all'alcol.

Ottenuti questi risultati nelle colture cellulari ho deciso di estendere questo tipo di analisi sul ratto adulto, per valutare se l'effetto dell'alcol indotto dall'alcol in un sistema in vitro fosse riproducibile in vivo. In particolare ho valutato questo effetto

nell'ippocampo di ratto maschio adulto per diverse ragioni: l'ippocampo rappresenta un'area molto dinamica, soggetta a continui cambiamenti in relazione agli stimoli ambientali dove tra l'altro c'è un'altissima espressione del BDNF; è un'area del sistema limbico molto sensibile agli effetti dell'etanolo; risulta essere di cruciale interesse per quanto riguarda i fenomeni di memoria e apprendimento e questi fenomeni sono strettamente associati al concetto di tossicodipendenza, pertanto numerosi autori considerano i fenomeni di "addiction" come una forma patologica di memoria e apprendimento. Inoltre precedenti studi effettuati in un modello di apprendimento e consolidamento della memoria evidenziano come il gene del BDNF in quest'area sia regolato dal punto di vista epigenetico in maniera molto dinamica (per un sommario vedere Lubin FD 2011). Questi studi effettuati nel modello di apprendimento che ho appena citato rappresentano uno degli spunti che hanno dato il via a questo lavoro.

Per raggiungere tale obiettivo, ho trattato i ratti con dosi crescenti di etanolo (0,8;1,6;3 g/kg) veicolate in peritoneo ed ho deciso di sacrificare gli animali in momenti differenti per avere una descrizione temporale di questo fenomeno.

I risultati ottenuti mostrano come già dopo 1h dall'iniezione si ha una robusta demetilazione del gene; inoltre non abbiamo riscontrato differenze tra i gruppi sperimentali trattati con le tre dosi diverse.

Queste differenze sono state osservate a 3h dove gli aumenti significativi di DNA demetilato non erano presenti nel gruppo di animali trattati con la dose più bassa mentre erano mantenuti nei gruppi trattati con dosi maggiori. In aggiunta, a questo punto della sequenza temporale ho valutato l'espressione genica del BDNF. I risultati ottenuti relativi agli mRNA erano in accordo con quelli osservati per il fenomeno della metilazione.

Infine dopo 5h dal trattamento ho potuto osservare nei vari gruppi un ritorno dello stato di metilazione del gene a valori di controllo ad eccezione del gruppo trattato con la dose più alta, questo suggerisce che lo stato di metilazione del gene del BDNF possa dipendere dalle quantità di alcol nel sangue. Infatti dall'analisi della etanolemia si evince come la presenza di alcol nel sangue è accompagnata da aumenti significativi nella quantità di DNA che si trova nello stato demetilato. Presi nel loro insieme questi risultati mostrano come l'etanolo, induce un aumento della demetilazione del promotore del gene e come questo aumento sia associato ad un incremento dell'espressione genica.

Dato che l'esone preso in analisi (IX) è quello che contiene al suo interno la sequenza

della proteina potrebbe essere associato ad un incremento dell'espressione della proteina. Tuttavia ulteriori studi volti a valutare le proteine sono necessari per valutare questo aspetto.

I risultati da me ottenuti per quanto riguarda il fenomeno della metilazione del gene del BDNF sono in accordo con i risultati ottenuti da Maier e coll. (Maier et al., 1999) che al contrario di quello da noi osservato mostrano una diminuzione nell'espressione genica del BDNF accompagnata da un aumento della metilazione del DNA. Nonostante le differenze nei modelli utilizzati, è importante sottolineare come un aumento sullo stato di metilazione induce una diminuzione dell'espressione genica (Maier et al., 1999) mentre un aumento della demetilazione del gene induce un aumento dell'espressione genica (il mio lavoro).

Infine, i risultati ottenuti, relativi all'aumento dell'espressione genica del BDNF dopo trattamento acuto con etanolo nell'ippocampo, sono in accordo con precedenti studi condotti sulla stessa area in condizioni sperimentali simili (Kulkarny et al., 2011; McGough et al., 2004). Al contrario Raivio e collaboratori osservano una diminuzione dose dipendente dopo trattamento acuto (Raivio et al., 2012). La discrepanza tra questi lavori come descritto da Raivio e collaboratori potrebbe essere dovuta a delle differenze nei protocolli sperimentali utilizzati e per quanto concerne il mio lavoro anche il ceppo di ratti utilizzato e la differenza nella manipolazione degli animali prima dell'esperimento.

CONCLUSIONI

I risultati da me ottenuti e illustrati in questa tesi mostrano come l'etanolo modifica lo stato di metilazione del gene del BDNF sia in un modello in vitro che in un modello in vivo suggerendo una importante e alternativa via con cui l'etanolo modifica l'espressione genica.

L'inibizione farmacologica degli enzimi DNMTs e il trattamento con etanolo causano una demetilazione del gene del BDNF, tale fenomeno è associato ad un incremento dell'espressione genica.

Questi dati supportano l'idea che il fenomeno della metilazione del DNA sia un evento dinamico nel cervello adulto che potrebbe regolare i cambi nell'espressione genica che si verificano durante l'esposizione all'etanolo nell'ippocampo di ratto adulto. Inoltre gli aumenti significativi della demetilazione del promotore del gene del BDNF osservati sembrerebbero dipendere dai livelli di etanolo nel sangue.

Le variazioni nell'espressione genica osservate in diverse condizioni sperimentali di esposizione all'etanolo rafforzano l'idea che il BDNF gioca un ruolo preponderante nei fenomeni omeostatici e citoprotettivi messi in atto per contrastare le alterazioni neurochimiche indotte dall'etanolo.

Queste evidenze suggeriscono l'importanza del ruolo svolto dal BDNF nel mediare effetti a breve termine volti a ripristinare l'omeostasi, ed effetti a lungo termine in grado di determinare cambiamenti persistenti nella plasticità sinaptica che potrebbero essere alla base dell'instaurarsi della dipendenza da alcol.

FIGURE

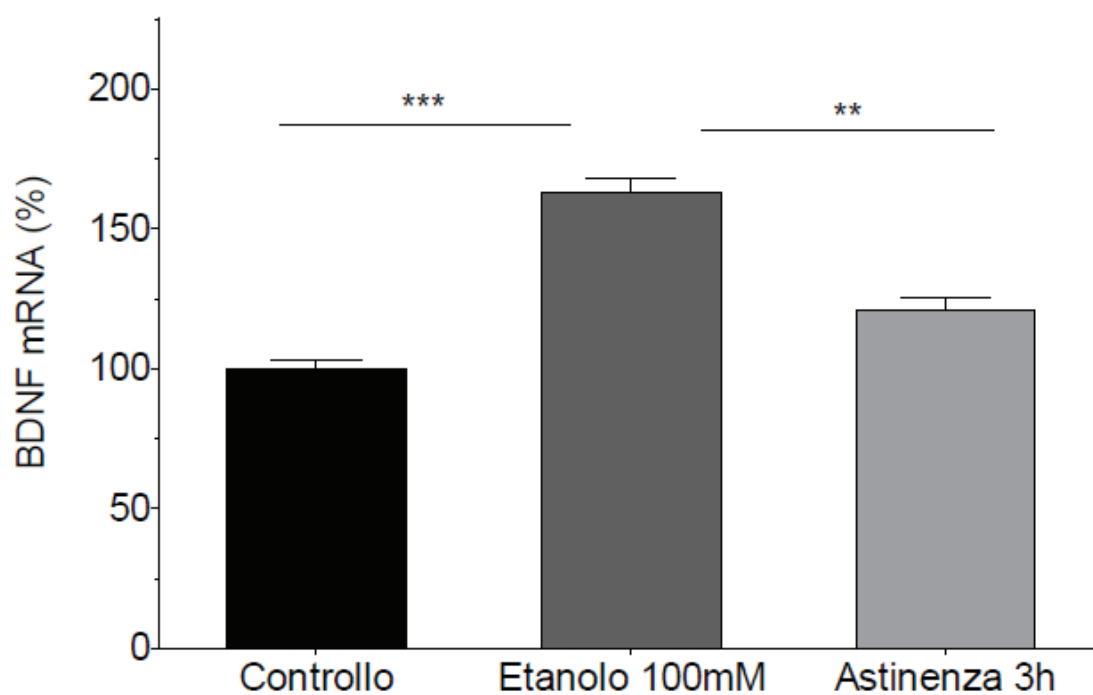


Figura 1: *Effetto dell'esposizione acuta all'etanolo e successiva astinenza nell'espressione genica del BDNF in colture neuronali. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM (n=6-7 per ogni gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ verso il gruppo di controllo.*

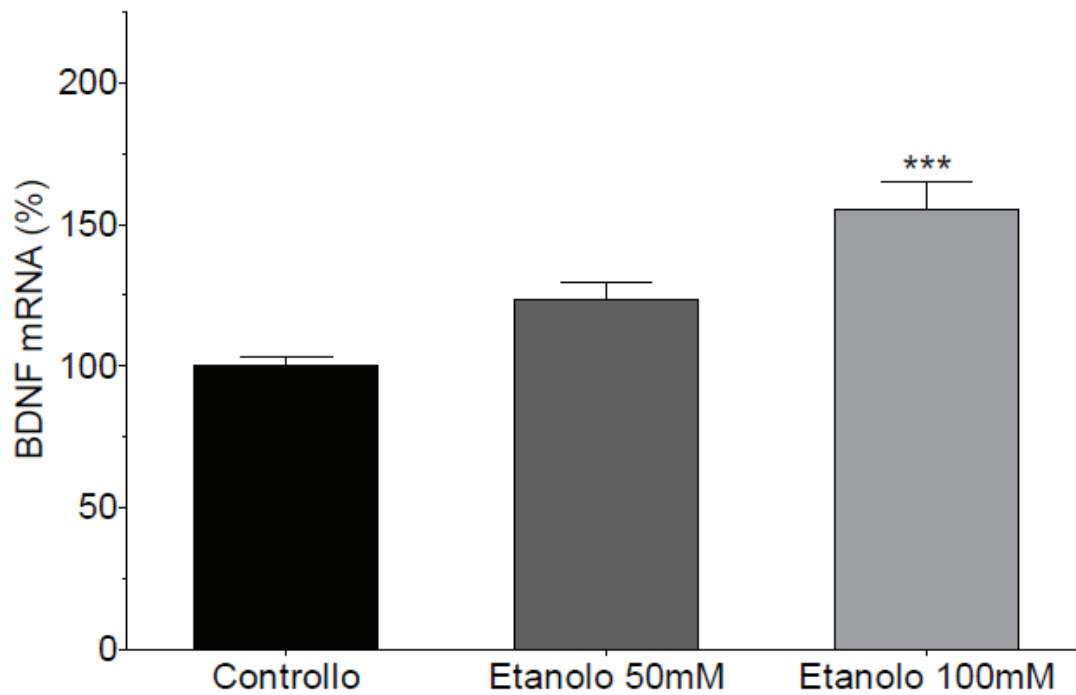


Figura 2: *Effetto dell'esposizione cronica all'etanolo sull'espressione genica del BDNF in colture neuronali. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM (n=6-7 per ogni gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni *** $p < 0.0001$, verso il gruppo di controllo.*

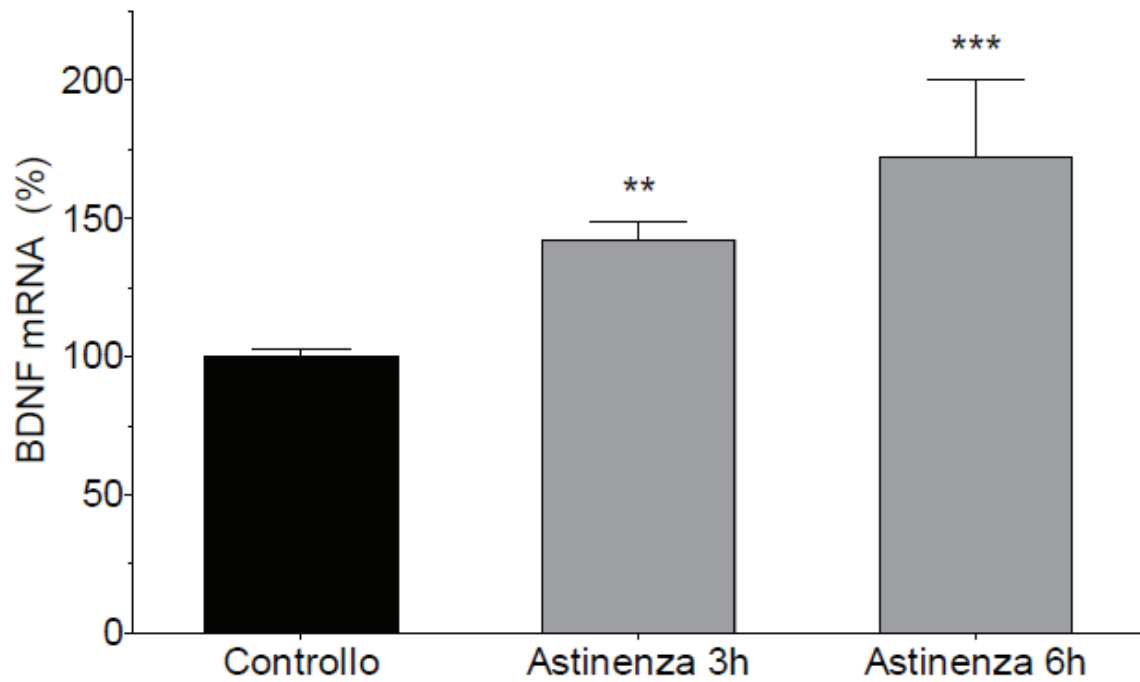


Figura 3: Effetto dell'astinenza dopo trattamento cronica all'etanolo (100 mM) sull'espressione genica del BDNF in colture neuronali. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM ($n=6-7$ per ogni gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ verso il gruppo di controllo.

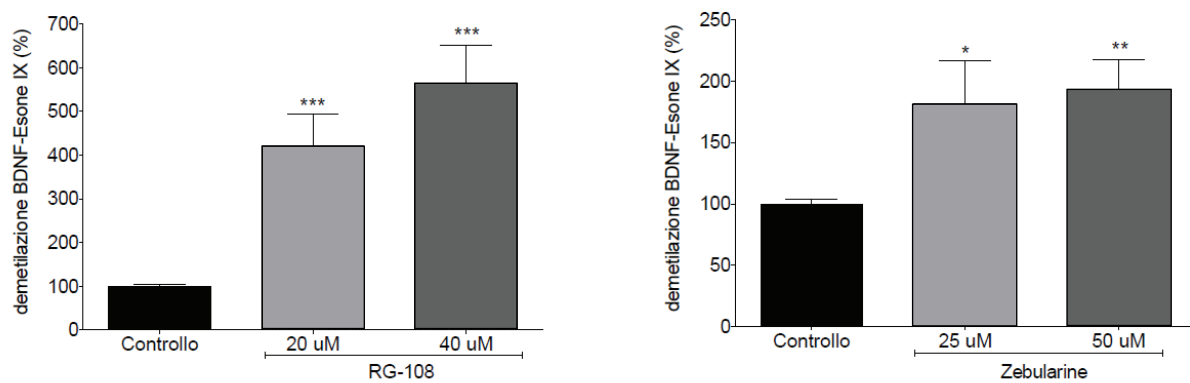


Figura 4: Effetto di due inibitori dell'enzima DNMT (RG-108 e Zebularina) sullo stato di metilazione del gene del BDNF dopo trattamento acuto (3h). I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM ($n=6$ per ogni gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ verso il gruppo di controllo.

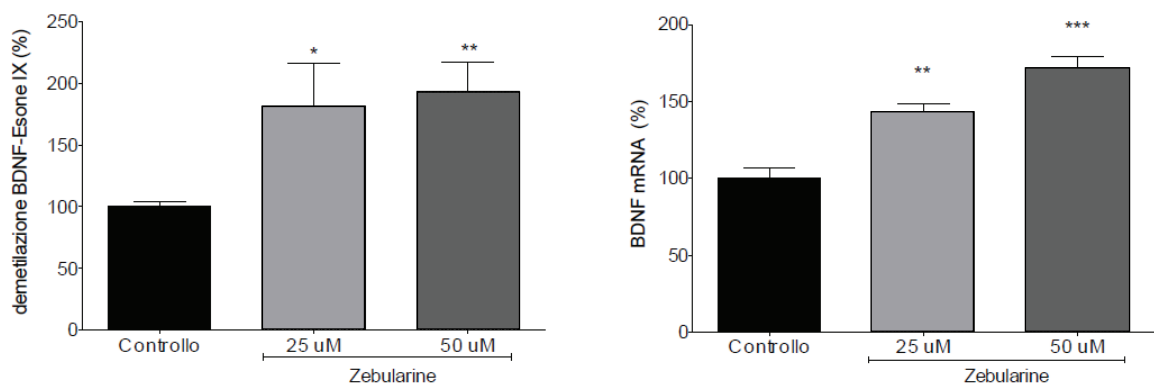


Figura 5: *Effetto della Zebularina sullo stato di metilazione del gene del BDNF e corrispondente espressione degli mRNA dopo trattamento acuto (3h) in colture neuronali. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM (n=6-7 per ogni gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ verso il gruppo di controllo.*

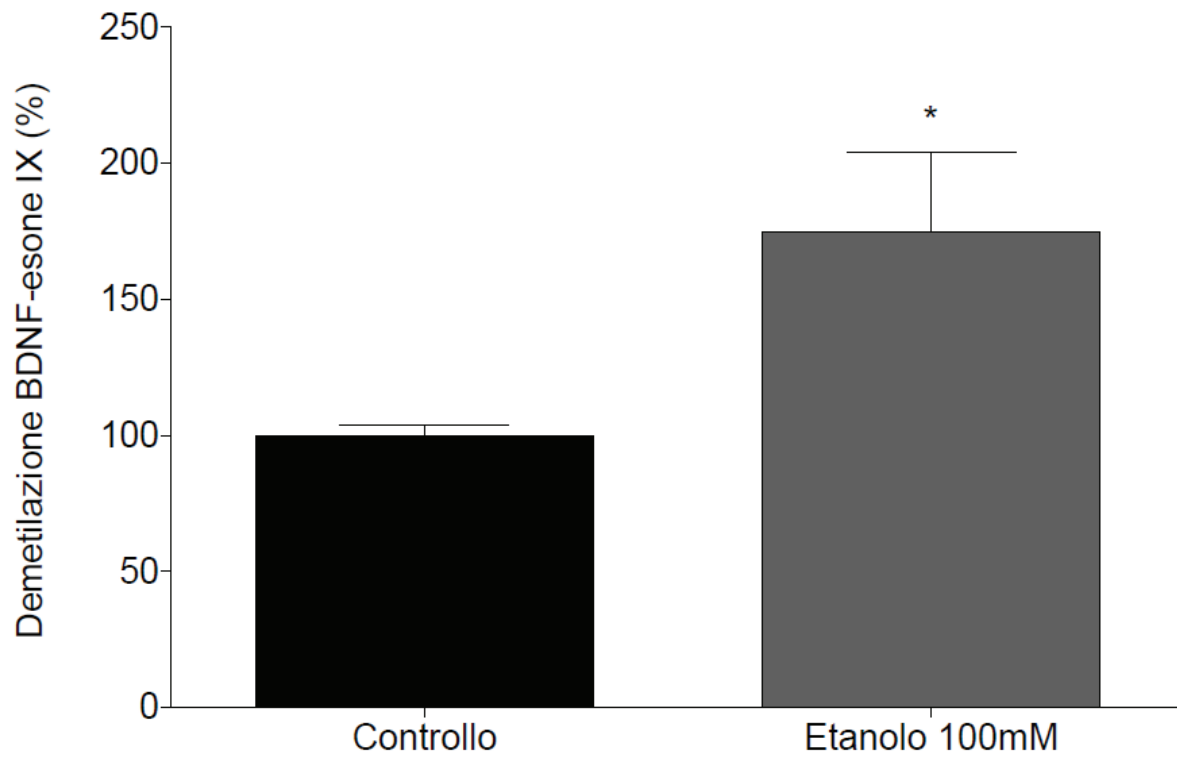


Figura 6: *Effetto dell'esposizione acuta all'etanolo sulla metilazione del gene BDNF in colture neuronali. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM (n=6-7 per ogni gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con lo student t test * $p < 0.05$ verso il gruppo di controllo.*

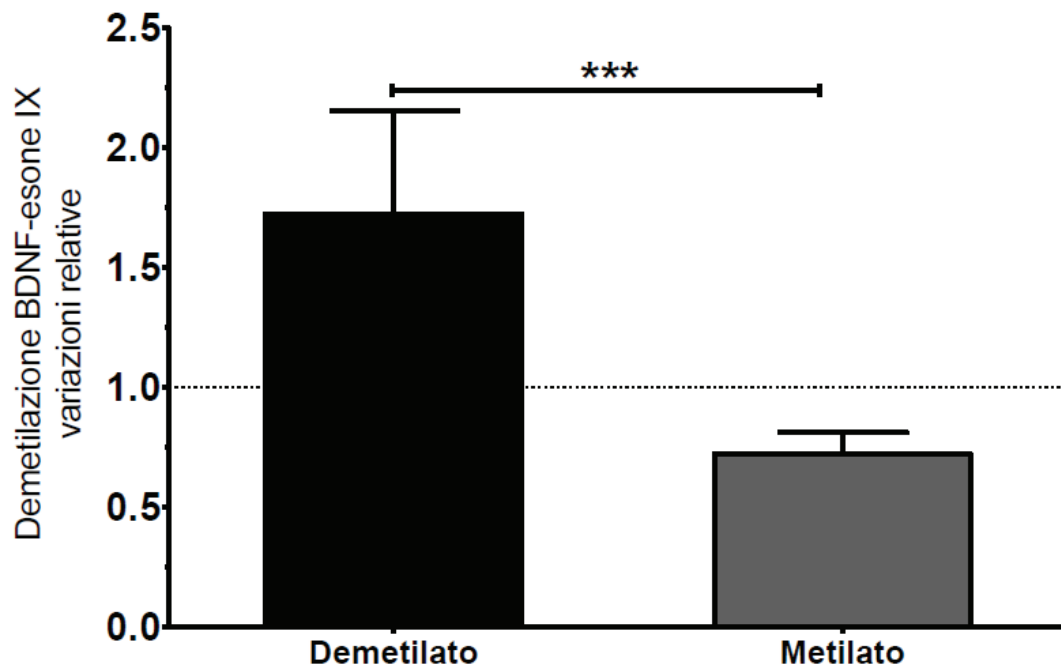


Figura 7: Differenze tra i livelli di DNA demetilato e DNA metilato ottenuti utilizzando due set di primer differenti nel gruppo sperimentale trattato in acuto con etanolo 100 mM. I valori sono espressi come variazioni relative tra i due gruppi sperimentali. La statistica è stata fatta utilizzando l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni *** $p < 0.0001$ verso il gruppo di controllo.

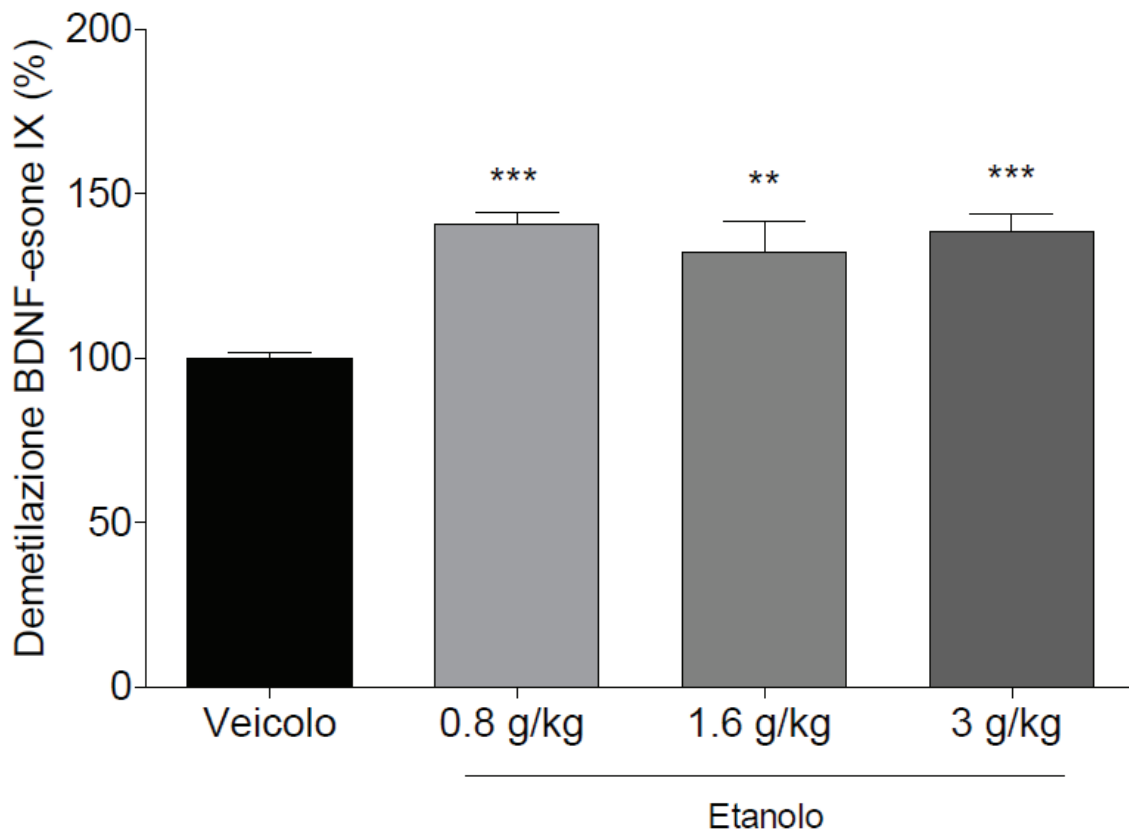


Figura 8: Effetto dell'esposizione acuta a dosi crescenti di etanolo sullo stato di metilazione del gene del BDNF nell'ippocampo di ratto dopo 1h dall'iniezione. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM ($n=6$ per ciascun gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ verso il gruppo di controllo.

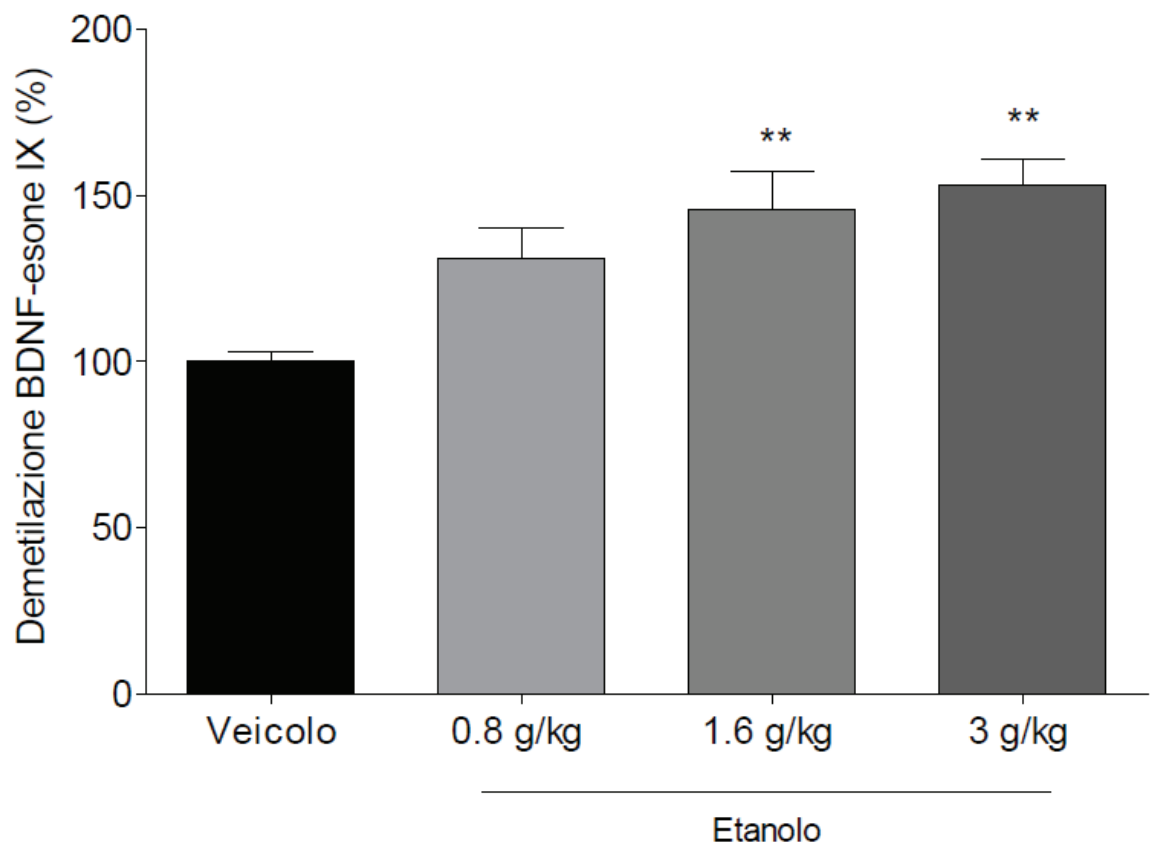


Figura 9: Effetto dell'esposizione acuta a dosi crescenti di etanolo sullo stato di metilazione del gene del BDNF nell'ippocampo di ratto dopo 3h dall'iniezione. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM ($n=6$ per ciascun gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni ** $p < 0.01$ verso il gruppo di controllo.

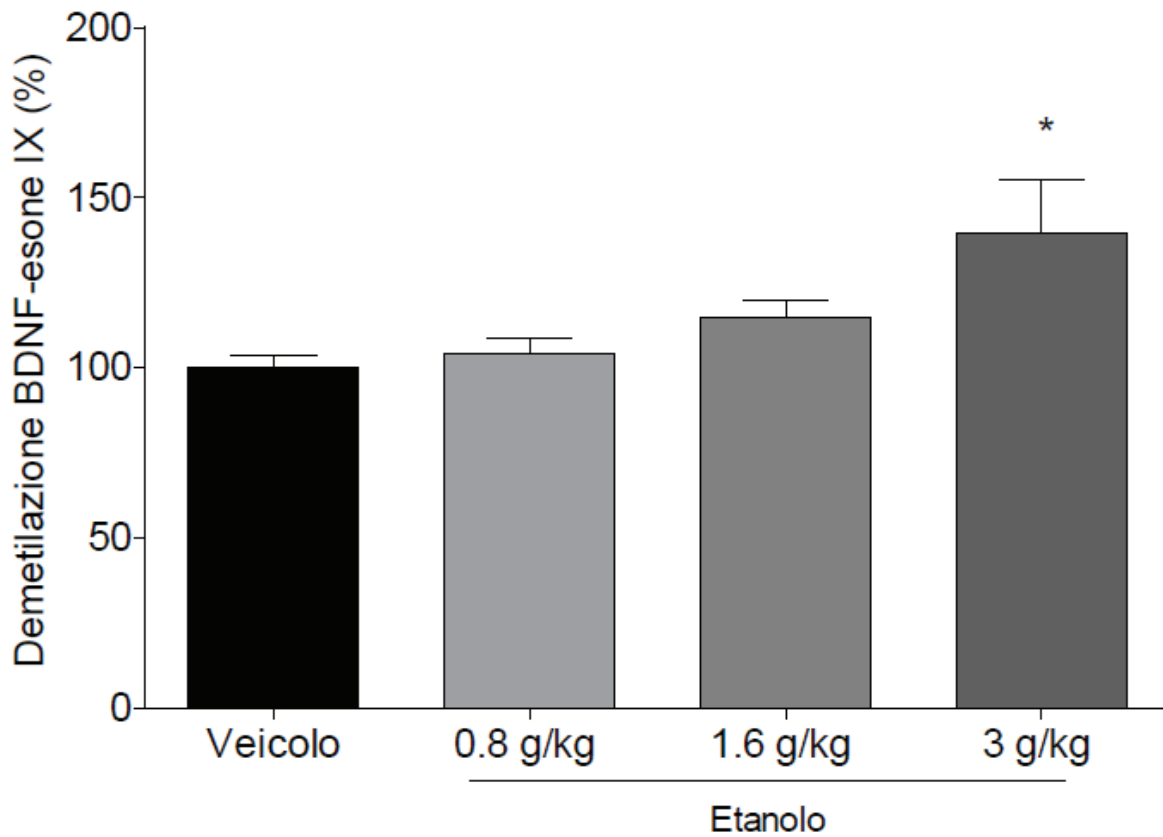


Figura 10: Effetto dell'esposizione acuta a dosi crescenti di etanolo sullo stato di metilazione del gene del BDNF nell'ippocampo di ratto dopo 5h dall'iniezione. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM ($n=6$ per ciascun gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni * $p < 0.05$ verso il gruppo di controllo.

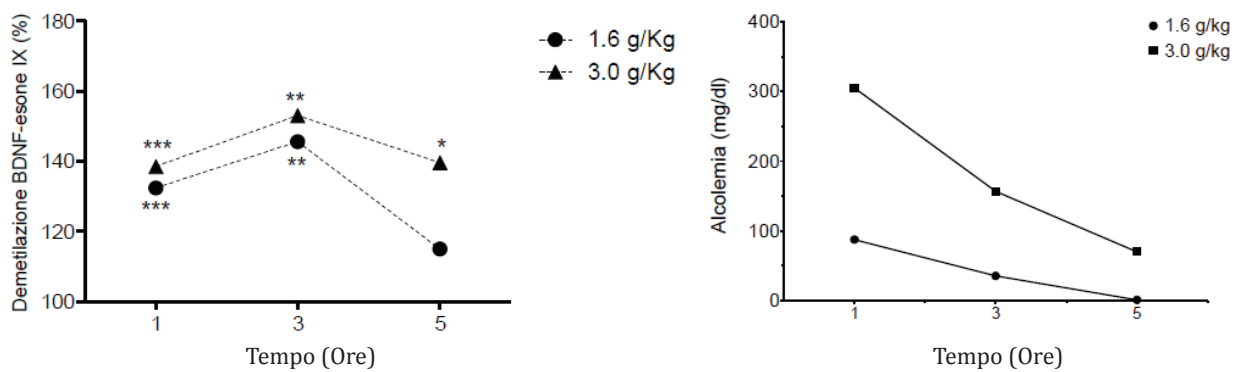


Figura 11: *Effetto dell'esposizione acuta a dosi crescenti di etanolo (1,6; 3 g/kg) sullo stato di metilazione del gene del BDNF nell'ippocampo di ratto dopo 1,3,5h dall'iniezione. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM (n=6 per ciascun gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni *** $p < 0.001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ verso il gruppo di controllo. Di fianco sono mostrati i profili dell'etanolemia degli stessi animali in cui è stata eseguita l'analisi dello stato di metilazione.*

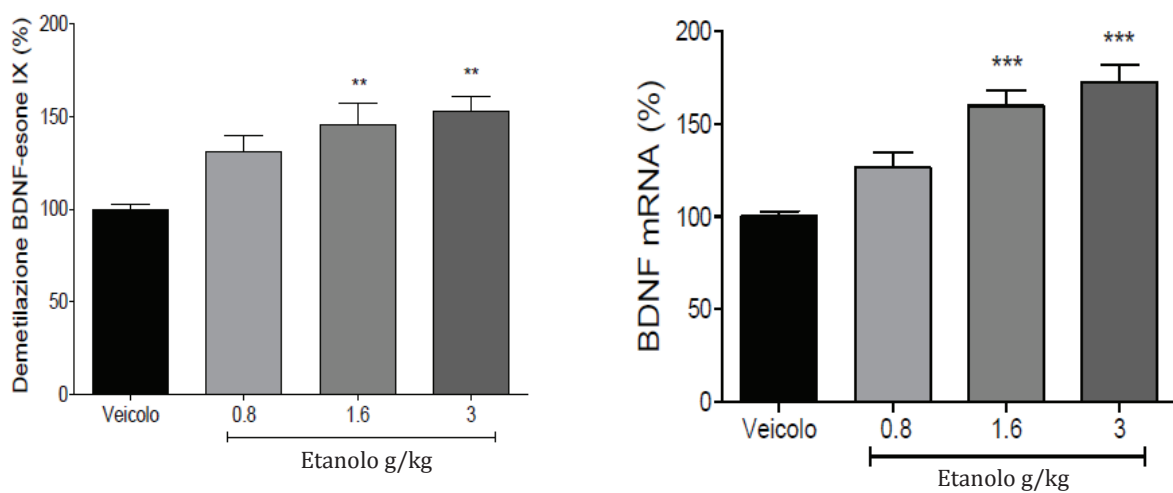


Figura 12: Effetto dell'esposizione acuta a dosi crescenti di etanolo sullo stato di metilazione e sull'espressione genica del gene del BDNF nell'ippocampo di ratto dopo 3h dall'iniezione. I valori sono espressi in percentuale di cambiamento rispetto al controllo come medie \pm SEM ($n=6$ per ciascun gruppo sperimentale). La statistica è stata fatta con l'ANOVA a una via a cui è seguito il post hoc di Bonferroni *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ verso il gruppo di controllo.

BIBLIOGRAFIA

Aakalu G., Smith W. B., Nguyen N., Jiang C. and Schuman E. M. (2001) Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30, 489-502.

Abraham W. C. and Williams J. M. (2008) LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiology of Learning Memory* 89, 260-268.

Aid T., Kazantseva A., Piirsoo M., Palm K. and Timmusk T. (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *Journal of Neuroscience Research* 85, 525-535.

Ait-Daoud N., Johnson B. A., Prihoda T. J. and Hargita I. D. (2001) Combining ondansetron and naltrexone reduces craving among biologically predisposed alcoholics: preliminary clinical evidence. *Psychopharmacology (Berl)*. 154, 23-27.

Allan A. M. and Harris R. A. (1986) Gamma-aminobutyric acid and alcohol actions: neurochemical studies of long sleep and short sleep mice. *Life Sciences* 39, 2005-2015.

Allan A. M., Weeber E. J., Savage D. D. and Caldwell K. K. (1997) Effects of prenatal ethanol exposure on phospholipase C-beta 1 and phospholipase A2 in hippocampus and medial frontal cortex of adult rat offspring. *Alcohol and Clinical Experimental Research* 21, 1534-1541.

Allen G. C., West J. R., Chen W. J. and Earnest D. J. (1998) Developmental alcohol exposure disrupts circadian regulation of BDNF in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurotoxicology and Teratology* 26, 353-358.

Altar C. A. and DiStefano P. S. (1998) Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neuroscience*. 21, 433-437.

Anderson P. and Baumberg B. (2006) Alcohol in Europe: Health, social and economic impact. *Eurohealth* 12, 17-20.

Anier K., Malinovskaja K., Aonurm-Helm A., Zharkovsky A. and Kalda A. (2010) DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice *Neuropsychopharmacology* 35, 2450–2461.

Baj G., Leone E., Chao M. V. and Tongiorgi E. (2011) Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 16813-16818.

Best C. A. and Laposata M. (2003) Fatty acid ethyl esters: toxic non-oxidative metabolites of ethanol and markers of ethanol intake. *Frontiers in Bioscience* 8, 202-217.

Bhave S. V., Ghoda L. and Hoffman P. L. (1999) Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *Journal of Neuroscience* 19, 3277-3286.

Biggio G., Concas A., Follesa P., Sanna E. and Serra M. (2007) Stress, ethanol, and neuroactive steroids. *Pharmacology and Therapeutics* 116, 140-171.

Blednov Y. A. and Harris A. R. (2008) Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) regulation of ethanol sedation, dependence and consumption: Relationship to acamprosate actions. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11, 775-793.

Bliss T. V. and Collingridge G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

Bolaños C. A., Barrot M., Berton O., Wallace-Black D., Nestler E. J. (2003) Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biological Psychiatry* 54, 1317-1329.

Bolaños C. A. and Nestler E. J. (2004) Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular Medicine* 5, 69-83.

Bönsch D., Lenz B., Kornhuber J. and Bleich S. (2005) DNA hypermethylation of the

alpha synuclein promoter in patients with alcoholism. *Neuroreport* 16, 167-170.

Bonthius D. J., Karacay B., Dai D. and Pantazis N. J. (2003) FGF-2, NGF and IGF-1, but not BDNF, utilize a nitric oxide pathway to signal neurotrophic and neuroprotective effects against alcohol toxicity in cerebellar granule cell cultures. *Brain Reserch Developmental Brain Research* 140, 15-28.

Booth M. J., Branco M. R., Ficz G., Oxley D., Krueger F., Reik W. and Balasubramanian S. (2012) Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science* 336, 934-937.

Boulle F., van den Hove D. L., Jakob S.B., Rutten B. P., Hamon M., van Os J., Lesch K. P., Lanfumey L., Steinbusch H.W. and Kenis G. (2012) Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* 17, 584-596.

Bramham C. R. and Messaoudi E. (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Progress in Neurobiology* 76, 99-125.

Carboni S., Isola R., Gessa G. L. and Rossetti Z. L. (2003) Ethanol prevents the glutamate release induced by N-methyl-D-aspartate in the rat striatum. *Neuroscience Letters* 152, 133-136.

Carlezon W. A. Jr., Duman R. S. and Nestler E. J. (2005) The many faces of CREB. *Trends Neuroscience* 28, 436-445.

Carlino D., De Vanna M. and Tongiorgi E. (2013) Is altered BDNF biosynthesis a general feature in patients with cognitive dysfunctions? *Neuroscientist* 19, 345-353.

Carmignoto G., Pizzorusso T., Tia S. and Vicini S. (1997) Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex. *Journal of Physiology* 498, 153-164.

Carnicella S., Kharazia V., Jeanblanc J., Janak P. H. and Ron D. (2008) GDNF is a fast-acting potent inhibitor of alcohol consumption and relapse. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America 105, 8114-8119.

Carta M., Mameli M. and Valenzuela C. F. (2004) Alcohol enhances GABAergic transmission to cerebellar granule cells via an increase in Golgi cell excitability. *Journal of Neuroscience* 24, 3746-3751.

Chandler L. J. and Sutton G. (2005) Acute ethanol inhibits extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate response element binding protein activity in an age- and brain region-specific manner. *Alcohol and Clinical Experimental Research* 29, 672-682.

Chen C. H., Pan C. H., Chen C. C. and Huang M. C. (2011) Increased oxidative DNA damage in patients with alcohol dependence and its correlation with alcohol withdrawal severity. *Alcohol and Clinical Experimental Research* 35, 338-344.

Chen W. G., Chang Q., Lin Y., Meissner A., West A. E., Griffith E. C., Jaenisch R. and Greenberg M. E. (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885-889.

Cheng Q. and Yeh H. H. (2003) Brain-derived neurotrophic factor attenuates mouse cerebellar granule cell GABA(A) receptor-mediated responses via postsynaptic mechanisms. *Journal of Physiology* 548, 711-721.

Christensen J. K., Moller I. W., Ronsted P., Angelo H. R. and Johansson B. (1991) Dose-effect relationship of disulfiram in human volunteers. I: Clinical studies. *Pharmacology and Toxicology* 68, 163-165.

Chiaruttini C., Sonogo M., Baj G., Simonato M. and Tongiorgi E. (2008) BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Molecular Cell Neuroscience* 37, 11-19.

Colombo G. and Grant K. A. (1992) NMDA receptor complex antagonists have ethanol-like discriminative stimulus effects. *Annual of the New York Academy of Science* 654, 421-423.

Cunha C., Brambilla R. and Thomas K. L. (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience* 3:1.

Di Chiara G. (1997) Alcohol and dopamine. *Alcohol Health & Research World*. 21,108-114.

Diehl A. M., Yang S. Q., Cote P. and Wand G. S. (1992) Chronic ethanol consumption disturbs G-protein expression and inhibits cyclic AMP-dependent signaling in regenerating rat liver. *Hepatology* 16, 1212-1219.

Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S.F., Collins, P.J., Davis, C.A., Doyle, F., Epstein, C.B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., et al. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74.

Follesa P., Mancuso L., Biggio F., Mostallino M. C., Manca A., Mascia M. P., Busonero F., Talani G., Sanna E. and Biggio G. (2003) Gamma-hydroxybutyric acid and diazepam antagonize a rapid increase in GABA(A) receptors alpha(4) subunit mRNA abundance induced by ethanol withdrawal in cerebellar granule cells. *Molecular Pharmacology*. 63, 896-907.

Follesa P., Biggio F., Mancuso L., Cabras S., Caria S., Gorini G., Manca A., Orru A. and Biggio G.(2004) Ethanol withdrawal-induced up-regulation of the alpha2 subunit of the GABAA receptor and its prevention by diazepam or gamma-hydroxybutyric acid. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 120, 130-137.

Follesa P., Mostallino M. C., Biggio F., Gorini G., Caria S., Busonero F., Murru L., Mura M. L., Sanna E. and Biggio G. (2005) Distinct patterns of expression and regulation of GABA receptors containing the delta subunit in cerebellar granule and hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* 94, 659-671.

Follesa P., Biggio F., Talani G., Murru L., Serra M., Sanna E. and Biggio G. (2006) Neurosteroids, GABAA receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacology (Berl)*. 186, 267-280.

Feng J. and Nestler E. J. (2010) MeCP2 and drug addiction. *Nature Neuroscience* 13, 1039-1041.

Ficz G., Branco M. R., Seisenberger S., Santos F., Krueger F., Hore T. A., Marques C. J., Andrews S. and Reik W. (2011) Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473, 398-402.

Funk C. K., O'Dell L. E., Crawford E. F. and Koob G. F. (2006) Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala mediates enhanced ethanol self-administration in withdrawn, ethanol-dependent rats. *Journal of Neuroscience* 26, 11324-11332.

Garro A. J., McBeth D. L., Lima V. and Lieber C. S. (1991) Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: implications for the fetal alcohol syndrome. *Alcohol and Clinical Experimental Research* 15, 395-398.

Gilpin N. W., Misra K., Koob G. F. (2008) Neuropeptide Y in the central nucleus of the amygdala suppresses dependence-induced increases in alcohol drinking. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 90, 475-480.

Goldberg L. (1943) Quantitative studies on alcohol tolerance in man. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum* 5, 1-128.

Haapasalo A., Sipola I., Larsson K., Akerman K. E., Stoilov P., Stamm S., Wong G. and Castrén E. (2002) Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 277, 43160-43167.

Hamamoto T., Yamada S. and Hirayama C. (1990) Nonoxidative metabolism of ethanol in the pancreas; implication in alcoholic pancreatic damage. *Biochemical Pharmacology*. 39, 241-245.

Han J. Y., Jeong J. Y., Lee Y. K., Roh G. S., Kim H. J. and Kang S. S., et al. (2006) Suppression of survival kinases and activation of JNK mediate ethanol-induced cell death in the

developing rat brain. *Neuroscience Letters* 398, 113–117.

Harper C. and Matsumoto I. (2005) Ethanol and brain damage. *Current Opinion in Pharmacology* 5, 73-78.

Heaton M. B., Kim D. S. and Paiva M. (2000) Neurotrophic factor protection against ethanol toxicity in rat cerebellar granule cell cultures requires phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Neuroscience Letters* 291, 121-125.

Heaton M. B., Madorsky I., Paiva M. and Siler-Marsiglio K. I. (2004) Ethanol-induced reduction of neurotrophin secretion in neonatal rat cerebellar granule cells is mitigated by vitamin E. *Neuroscience Letters* 370, 51-54.

Hicks S. D., Middleton F. A. and Miller M. W. (2010) Ethanol-induced methylation of cell cycle genes in neural stem cells. *Journal of Neurochemistry* 114,1767-1780.

Hiroi N. and Agatsuma S. (2005) Genetic susceptibility to substance dependence. *Molecular Psychiatry* 10, 336-344.

Hodge C. W., Samson H. H. and Chappelle A. M. (1997) Alcohol self-administration: Further examination of the role of dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 21, 1083-1091.

Hofer M. M. and Barde Y. A. (1988) Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature* 331, 261-262.

Hyytia P. and Koob G. F. (1995) GABAA receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. *European Journal of Pharmacology* 283, 151-159.

Jaenisch R. and Bird A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33, 245-254.

Jenuwein T. and Allis C. D. (2001) Translating the histone code. *Science* 293,1074-

1080.

Jiang Y., Langley B., Lubin F. D., Renthal W., Wood M. A., Yasui D. H., Kumar A., Nestler E. J., Akbarian S. and Beckel-Mitchener A. C. (2008) Epigenetics in the nervous system. *Journal of Neuroscience* 28, 11753-11759.

Johnson B. A. (2004) Role of serotonergic system in the neurobiology of alcoholism: implications for treatment. *CNS Drugs* 18, 1105-1118.

Jovanovic J. N., Czernik A. J., Fienberg A. A., Greengard P. and Sihra T. S. (2000) Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neuroscience* 3, 323-329.

Kellinger M. W., Song C. X., Chong J., Lu X. Y., He C. and Wang D. (2012) 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reduce the rate and substrate specificity of RNA polymerase II transcription. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 831-833.

Klein R., Conway D., Parada L. F. and Barbacid M. (1990) The *trkB* tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61, 647-656.

Knipper M., da Penha Berzaghi M., Blöchl A., Breer H., Thoenen H. and Lindholm D. (1994) Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 6, 668-671.

Koob G. F. (2003) Alcoholism: Allostasis and beyond. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 27, 232-243.

Koob G. F. (2004) A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. *Biochemical Pharmacology* 68, 1515-1525.

Koppel I., Aid-Pavlidis T., Jaanson K., Sepp M., Pruunsild P., Palm K. and Timmusk T. (2009) Tissue-specific and neural activity-regulated expression of human BDNF gene

in BAC transgenic mice. *BMC Neuroscience* 10-68.

Korte M., Carroll P., Wolf E., Brem G., Thoenen H. and Bonhoeffer T. (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8856-8860.

Kulkarny V. V., Wiest N. E., Marquez C. P., Nixon S. C., Valenzuela C. F. and Perrone-Bizzozero N. I. (2011) Opposite effects of acute ethanol exposure on GAP-43 and BDNF expression in the hippocampus versus the cerebellum of juvenile rats. *Alcohol* 45, 461-471.

Kushner M. G., Sher K. J. and Beitman B. D. (1990) The relation between alcohol problems and the anxiety disorders. *American Journal of Psychiatry* 147, 685-695.

Lambert J.J., Belelli D., Harney S.C., Peters J.A. and Frenguelli B.G. (2001) Modulation of native and recombinant GABA(A) receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. *Brain Research. Brain Research Reviews* 37, 68-80.

LaPlant Q., Vialou V., Covington H. E., Dumitriu D., Feng J., Warren B, Maze I., Dietz D. M., Watts E. L., Iñiguez S. D., Koo J. M., Mouzon E., Renthal W., Hollis F., Wang H., Noonan M. A., Ren Y. H., Eisch A. J., Bolaños C. A., Kabbaj M., Xiao G. H., Neve R. L., Hurd L. L., Oosting R. S., Fan G. P., Morrison J. H. and Nestler E. J. (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience* 13, 1137-1143.

Laposata M., Minda M., Capriotti A. M., Hartman E. J., Furth E. E., Iozzo R. V. (1988) Reversible phenotypic modulation induced by deprivation of exogenous essential fatty acids. *Laboratory Investigation* 59, 838-847.

Lee R., Kermani P., Teng K. K. and Hempstead B. L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948.

LeMarquand D., Pihl R.O., Benkelfat C. (1994) Serotonin and alcohol intake, abuse, and

dependence: findings of animal studies. *Biological Psychiatry* 36, 395–421.

Leo A., Hansch C. and Elkins D. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews* 71, 525-615.

Leslie S. W., Barr E., Chandler J. and Farrar R. P. (1983) Inhibition of fast- and slow-phase depolarization-dependent synaptosomal calcium uptake by ethanol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 225, 571-575.

Levi-Montalcini R., Cohen S. (1960) Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Annals of the New York Academy Sciences* 85, 324-341.

Levine E. S., Dreyfus C. F., Black I. B. and Plummer M. R. (1995) Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8074-8077.

Levine E. S., Dreyfus C. F., Black I. B. and Plummer M. R. (1996) Selective role for trkB neurotrophin receptors in rapid modulation of hippocampal synaptic transmission. *Brain Research Molecular Brain Research*. 38, 300-303.

Lieber C. S. (1997) Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Chimica Acta* 257, 59-84.

Liljequist S. and Engel J. (1982) Effects of GABAergic agonists and antagonists on various ethanol-induced behavioral changes. *Psychopharmacology* 78, 71-75.

Lindsay R. M., Barde Y. A., Davies A. M. and Rohrer H. (1985) Differences and similarities in the neurotrophic growth factor requirements of sensory neurons derived from neural crest and neural placode. *Journal of Cell Science Supplement* 3, 115-129.

Lister R., Pelizzola M., Downen R. H., Hawkins R. D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J. R., Lee L., Ye Z., Ngo Q. M., Edsall L., Antosiewicz-Bourget J., Stewart R., Ruotti V, Millar A. H, Thomson J. A., Ren B. and Ecker J. R. (2009) Human DNA methylomes at base

resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-22.

Littleton J. M. (2007) Acamprosate in alcohol dependence: Implications of a unique mechanism of action. *Journal of Addiction Medicine* 1, 115-125.

Liu Q. R., Walther D., Drgon T., Polesskaya O., Lesnick T. G., Strain K. J., de Andrade M., Bower J. H., Maraganore D. M. and Uhl G. R. (2005) Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *American Journal of Medical Genetics Part B*. 134, 93-103.

Liu Q. R., Lu L., Zhu X. G., Gong J. P., Shaham Y. and Uhl G. R. (2006) Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Research* 1067, 1-12.

Luo J. (2012) Mechanisms of ethanol-induced death of cerebellar granule cells. *Cerebellum* 11, 145-154.

Lovinger D. M., White G. and Weight F. F. (1989) Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243, 1721-1724.

Lubin F. D., Roth T. L. and Sweatt J. D. (2008) Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *Journal of Neuroscience* 28, 10576-10586.

Lubin F. D. (2011) Epigenetic gene regulation in the adult mammalian brain: multiple roles in memory formation. *Neurobiology of Learning Memory* 96,68-78.

Madamba S. G., Hsu M., Schweitzer P. and Siggins G. R. (1995) Ethanol enhances muscarinic cholinergic neurotransmission in rat hippocampus in vitro. *Brain Research* 685, 21-32.

Madamba S.G., Schweitzer P., Siggins G.R. (1999) Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism. *Journal of*

Neurophysiology 82, 1768-1775.

Madsen H. B., Navaratnarajah S., Farrugia J., Djouma E., Ehrlich M., Mantamadiotis T., Van Deursen J. and Lawrence A. J. (2012) CREB1 and CREB-binding protein in striatal medium spiny neurons regulate behavioural responses to psychostimulants. *Psychopharmacology (Berl)*. 219, 699-713.

Maier S. E., Cramer J. A., West J. R. and Sohrabji F. (1999) Alcohol exposure during the first two trimesters equivalent alters granule cell number and neurotrophin expression in the developing rat olfactory bulb. *Journal of Neurobiology* 41, 414-423.

Margaret I. Davis (2008) Ethanol-BDNF interactions: Still More Questions than Answers. *Pharmacology Therapy* 118, 36-57.

Martinowich K., Hattori D., Wu H., Fouse S., He F., Hu Y., Fan G. and Sun Y. E. (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302, 890-893.

Marutha Ravindran C. R. and Ticku M. K. (2005) Role of CpG islands in the up-regulation of NMDA receptor NR2B gene expression following chronic ethanol treatment of cultured cortical neurons of mice. *Neurochemistry International* 46, 313-327.

Mayr B. and Montminy M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Review Molecular Cell Biology* 2, 599-609.

McAlhany R. E. Jr, Miranda R. C., Finnell R. H. and West J. R. (1999) Ethanol decreases Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) protein release but not mRNA expression and increases GDNF-stimulated Shc phosphorylation in the developing cerebellum. *Alcohol and Clinical Experimental Research* 23, 1691-1697.

McAllister A. K., Katz L. C. and Lo D. C. (1996) Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 17, 1057-1064.

McBride W. J., Lovinger D. M., Machu T., Thielen R. J. Rodd Z. A., Murphy J. M., Roache

J. D. and Johnson B. A. (2004) Serotonin-3 receptors in the actions of alcohol, alcohol reinforcement, and alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 28, 257-267.

McClung C. A. and Nestler E. J. (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nature Neuroscience* 6, 1208-1215.

McClung C. A., Nestler E. J. (2008) Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology* 33, 3-17.

McCreery M. J. and Hunt W. A. (1978) Physico-chemical correlates of alcohol intoxication. *Neuropharmacology* 17, 451-461.

McGough N. N., He D. Y., Logrip M. L., Jeanblanc J., Phamluong K., Luong K., Khara-zia V., Janak P. H. and Ron D. (2004) RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *Journal of Neuroscience* 24, 10542-10552.

McPherson C. S. and Lawrence A. J. (2007) The nuclear transcription factor CREB: involvement in addiction, deletion models and looking forward. *Current Neuropharmacology* 5, 202-212.

Meffert M. K., Chang J. M., Wiltgen B. J., Fanselow M. S. and Baltimore D. (2003) NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nature Neuroscience* 6, 1072-1078.

Melis M., Spiga S. and Diana M. (2005) The dopamine hypothesis of drug addiction: Hypodopaminergic state. *International Review of Neurobiology* 63, 101-154.

Merlo-Pich E., Lorang M., Yeganeh M., Rodriguez de Fonseca F., Raber J., Koob G. F. and Weiss F. (1995) Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *Journal of Neuroscience* 15, 5439-5447.

Miller M. W. (2004) Repeated episodic exposure to ethanol affects neurotrophin content in the forebrain of the mature rat. *Experimental Neurology* 189, 173-181.

Miller M. W. and Mooney S. M. (2004) Chronic exposure to ethanol alters neurotrophin content in the basal forebrain-cortex system in the mature rat: effects on autocrine-paracrine mechanisms. *Journal of Neurobiology* 60, 490-498.

Ming Z., Knapp D. J., Mueller R. A., Breese G. R. and Criswell H. E. (2001) Differential modulation of GABA- and NMDA-gated currents by ethanol and isoflurane in cultured rat cerebral cortical neurons. *Brain Research* 920, 117-124.

Mitchell P. J. and Tjian R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 28, 245-371.

Moonat S., Starkman B. G., Sakharkar A. and Pandey S. C. (2010) Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cellular and Molecular Life Science* 67, 73-88.

Moonat S., Sakharkar A. J., Zhang H. and Pandey S. C. (2011) The role of amygdaloid brain-derived neurotrophic factor, activity-regulated cytoskeleton-associated protein and dendritic spines in anxiety and alcoholism. *Addiction Biology* 16, 238-250.

Moore L. D., Le T. and Fan G. (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23-38.

Moore S. D., Madamba S. G. and Siggins G. R. (1990) Ethanol diminishes a voltage-dependent K⁺ current, the M-current, in CA1 hippocampal pyramidal neurons in vitro. *Brain Research* 516, 222-228.

Morgan J. I. and Curran T. (1995) Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neuroscience* 18, 66-67.

Morrow A. L., VanDoren M. J. and Devaud L. L. (1998). Effects of progesterone or neuroactive steroid? *Nature* 395, 652-653.

Morrow A. L., VanDoren M. J., Penland S. N. and Matthews D. B. (2001) The role of GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence. *Brain Research Reviews* 37, 98-109.

Mowla S. J., Farhadi H. F., Pareek S., Atwal J. K., Morris S. J., Seidah N. G. and Murphy R. A. (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12660-12666.

Mukherjee S., Das S. K., Vaidyanathan K. and Vasudevan D. M. (2008) Consequences of alcohol consumption on neurotransmitters -an overview. *Current Neurovascular Research*. 5, 266-272.

Myers R.D. and Veale W.L. (1968) Alcohol preference in the rat: reduction following depletion of brain serotonin. *Science* 160, 1469-1471.

Nagy L. E. (2004) Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury. *Annual Review of Nutrition* 24, 55-78.

Nakao N., Kokaia Z., Odin P. and Lindvall O. (1995) Protective effects of BDNF and NT-3 but not PDGF against hypoglycemic injury to cultured striatal neurons. *Experimental Neurology* 131, 1-10.

Nestler E. J. (2008) Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Biological Science* 362, 3245-3255.

Nestler E. J. (2011) Hidden switches in the mind. *Scientific American*. 305, 76-83.

Nestler E.J. (2013) Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. 76, 259-268.

Nie Z., Madamba S. G. and Siggins G. R. (1994) Ethanol inhibits glutamatergic neurotransmission in nucleus accumbens neurons by multiple mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 271, 1566-1573.

Nie Z., Schweitzer P., Roberts A. J., Madamba S. G., Moore S. D. and Sigging G. R. (2004) Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science* 303, 1512-1514.

Olive M. F., Mehmert K. K., Messing R. O. and Hodge C. W. (2000) Reduced operant ethanol self-administration and in vivo mesolimbic dopamine responses to ethanol in PKA-epsilon-deficient mice. *European Journal of Neuroscience* 12, 4131-4140.

Olive M. F., Koenig H. N., Nannini M. A. and Hodge C. W. (2001) Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *Journal of Neuroscience* 21, RC184.

Pandey S. C. (1996) Acute and chronic ethanol consumption effects on the immunolabeling of Gq/11 alpha subunit protein and phospholipase C isozymes in the rat brain. *Journal of Neurochemistry* 67, 2355-2361.

Pandey S. C., Chartoff E. H., Carlezon W. A. Jr, Zou J., Zhang H., Kreibich A. S., Blendy J. A. and Crews F. T. (2005) CREB gene transcription factors: role in molecular mechanisms of alcohol and drug addiction. *Alcohol and Clinical Experimental Research* 29, 176-184.

Pandey S. C., Zhang H., Roy A. and Xu T. (2006) Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. *Journal of Clinical Investigation* 115, 2762-2773.

Pandey S. C., Zhang H., Roy A. and Misra K. (2006) Central and medial amygdaloid brain-derived neurotrophic factor signaling plays a critical role in alcohol-drinking and anxiety-like behaviors. *Journal of Neuroscience* 26, 8320-8331.

Pandey S. C., Zhang H., Ugale R., Prakash A., Xu T. and Misra K. (2008) Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *Journal of Neuroscience* 28, 2589-2600.

Pandey S. C., Ugale R., Zhang H., Tang L. and Prakash A. (2008) Brain chromatin re-

modeling: a novel mechanism of alcoholism. *Journal of Neuroscience* 28, 3729-3737.

Pang P. T., Teng H. K., Zaitsev E., Woo N. T., Sakata K., Zhen S., Teng K. K., Yung W. H., Hempstead B. L. and Lu B. (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487-91.

Pascual M., Boix J., Felipe V. and Gueri C. (2009) Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *Journal of Neurochemistry* 108, 920-931.

Ponomarev I. (2013) Epigenetic control of gene expression in the alcoholic brain. *Alcohol Research* 35, 69-76.

Pruunsild P., Kazantseva A., Aid T., Palm K. and Timmusk T. (2007) Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90, 397-406.

Raivio N., Tiraboschi E., Saarikoski S. T., Castrén E. and Kiianmaa K. (2012) Brain-derived neurotrophic factor expression after acute administration of ethanol. *European Journal of Pharmacology* 687, 9-13.

Rassnick S., Pulvirenti L. and Koob G. F. (1992) Oral ethanol self-administration in rats is reduced by the administration of dopamine and glutamate receptor antagonists into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 109, 92-98.

Rassnick S., Heinrichs S. C., Britton K. T. and Koob G. F. (1993b) Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Research* 605, 25-32.

Rehm J., Baliunas D., Borges G. L., Graham K., Irving H., Kehoe T., Parry C. D., Patra J., Popova S., Poznyak V., Roerecke M., Room R., Samokhvalov A. V. and Taylor B. (2010) The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of di-

sease: an overview. *Addiction* 105, 817-843.

Rinn, J.L. and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry* 81, 145-166.

Riveros-Rosas H., Julian-Sanchez A. and Pina E. (1997) Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Archives of Medical Research* 28, 453-471.

Roberto M., Madamba S. G., Moore S. D. Tallent M.K. and Siggins G.R. (2003) Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 100, 2053-2058

Roberto M. , Madamba S. G. Stouffer D. G. Parsons L.H. and Siggins G.R. (2004a) Increased GABA release in the central amygdala of ethanol-dependent rats. *Journal of Neuroscience* 24, 1594-1603.

Roberto M., Schweitzer P., Madamba S. G. Stouffer D.G., Parsons L.H. and Siggins G.R. (2004b) Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: An in vitro and in vivo analysis. *Journal of Neuroscience* 24, 1594-1603.

Roberts A. J., McDonald J. S., Heyser C. J. Kieffer B.L., Matthes H.W., Koob G.F. and Gold L.H. (2000b) μ -Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293, 1002-1008.

Robinson T. E. and Kolb B. (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47, 33-46.

Robison A. J. and Nestler E. J. (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature Review of Neuroscience* 12, 623-637.

Rose C. R., Blum R., Kafitz K. W., Kovalchuk Y. and Konnerth A. (2004) From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays* 26, 1185-1194.

Roth T. L., Lubin F. D., Funk A. J. and Sweatt J. D. (2009) Lasting epigenetic influence of

early-life adversity on the BDNF gene. *Biological Psychiatry* 65, 760-769.

Roy A. and Pandey S. C. (2002) The decreased cellular expression of neuropeptide Y protein in rat brain structures during ethanol withdrawal after chronic ethanol exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 26, 796-803.

Russo S. J., Bolanos C. A., Theobald D. E., DeCarolis N. A., Renthal W., Kumar A., Winstanley C. A., Renthal N. E., Wiley M. D., Self D. W., Russell D. S., Neve R. L., Eisch A. J. and Nestler E. J. (2007) IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates. *Nature Neuroscience* 10, 93-99.

Russo S. J., Wilkinson M. B., Mazei-Robinson M. S., Diets D. M., Maze I., Krishnan V., Renthal W., Graham A., Birnbaum S. G., Green T. A., Robinson B., Lesselyong A., Perrotti L. I., Bolanos C. A., Kumar A., Clark M. S., Neumaier J. F., Neve R. L., Bhakar A. L., Barker P. A. and Nestler E. J. (2009) Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *Journal of Neuroscience* 29, 3529-3537.

Russo S. J., Mazei-Robinson M. S., Ables J. L. and Nestler E. J. (2009) Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology* 56, 73- 82.

Sadri-Vakili G., Kumaresan V., Schmidt H. D., Famous K. R., Chawla P., Vassoler F. M., Overland R. P., Xia E., Bass C. E., Terwilliger E. F., Pierce R. C., Cha J. H. (2010) Cocaine-induced chromatin remodeling increases brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat medial prefrontal cortex, which alters the reinforcing efficacy of cocaine. *Journal of Neuroscience* 30, 11735-11744.

Sairanen M., Lucas G., Ernfors P., Castrén M. and Castrén E. (2005) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 25, 1089-1094.

Sakharkar A. J., Zhang H., Tang L., Shi G. and Pandey S. C. (2012) Histone deacetylases (HDAC)-induced histone modifications in the amygdala: a role in rapid tolerance to the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol and Clinical Experimental Research* 36, 61-

71.

Sanchis-Segura C., Lopez-Atalaya J. P. and Barco A. (2009) Selective boosting of transcriptional and behavioral responses to drugs of abuse by histone deacetylase inhibition. *Neuropsychopharmacology* 34, 2642-2654.

Sanna E., Talani G., Busonero F. Pisu M.G., Purdy R.H., Serra M. and Biggio G. (2004) Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABAA receptor activity in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 24, 6521-6530.

Schratt G. M., Nigh E. A., Chen W. G., Hu L. and Greenberg M. E. (2004) BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *Journal of Neuroscience* 24, 7366-7377.

Segal R. A. (2003) Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annual Review of Neuroscience*. 26, 299-330.

Sellers E. M., Schuller R., Romach M. K. and Horbay G. L. (2006) Relative abuse potential of opioid formulations in Canada: a structured field study. *Journal of Opioid Management* 2, 219-227.

Stahl K., Mylonakou M. N., Skare Ø., Amiry-Moghaddam M., Torp R. (2011) Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease. *Brain Research* 1378, 105-118.

Suzuki R., Lumeng L., McBride W. J., Li T. K. and Hwang B.H. (2004) Reduced neuropeptide Y mRNA expression in the central nucleus of amygdala of alcohol preferring (P) rats: its potential involvement in alcohol preference and anxiety. *Brain Research* 1014, 251-254.

Szulwach K. E., Li X., Li Y., Song C. X., Wu H., Dai Q., Irier H., Upadhyay A. K., Gearing M., Levey A. I., Vasanthakumar A., Godley L. A., Chang Q., Cheng X., He C. and Jin P. (2011) 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment

and aging. *Nature Neuroscience* 14, 1607-1616.

Tanaka T, Saito H. and Matsuki N. (1997) Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 17, 2959-2966.

Tapia-Arancibia L., Rage F., Givalois L., Digneon P., Arancibia S. and Beaugé F. (2001) Effects of alcohol on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in discrete regions of the rat hippocampus and hypothalamus. *Journal of Neuroscience Research* 63, 200-208.

Teng H. K, Teng K. K., Lee R., Wright S., Tevar S., Almeida R. D., Kermani P, Torkin R., Chen Z. Y., Lee F. S., Kraemer R. T., Nykjaer A. and Hempstead B. L. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *Journal of Neuroscience* 25, 5455-5463.

Thurston A. W. Jr and Shukla S. D. (1992) Ethanol modulates epidermal growth factor-stimulated tyrosine kinase and phosphorylation of PLC-gamma 1. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 185, 1062-1068.

Ticku M. K. , Lowrimore P. and Lehoullier P. (1986) Ethanol enhances GABA-induced ³⁶Cl⁻ influx in primary spinal cord cultured neurons. *Brain Research Bulletin* 17, 123-126.

Tongiorgi E. (2008) Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neuroscience Research* 61, 335-346.

Tsankova N., Renthal W., Kumar A. and Nestler E. J. (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Review of Neuroscience* 8, 355-367.

Tyler W. J. and Pozzo-Miller L. D. (2001) BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *Journal of Neuroscience* 21, 4249-4258.

Ulm R. R., Volpicelli J. R. and Volpicelli L. A. (1995) Opiates and alcohol self-administration in animals. *Journal of Clinical Psychiatry* 56, 5-14.

Uzbay I. T., Usanmaz S. E., Tapanyigit E. E., Aynacioglu S. and Akarsu E. S. (1998) Dopaminergic and serotonergic alterations in the rat brain during ethanol withdrawal: association with behavioral signs. *Drug Alcohol Dependence* 53, 39-47.

Valenzuela C.F. (1997) Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol Health Research World* 21, 144-148.

VanDoren M. J., Matthews D. B., Janis G. C. Grobin A. C., Devaud L. L. and Morrow A. L. (2000) Neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one modulates electrophysiological and behavioral actions of ethanol. *Journal of Neuroscience* 20, 1989-2000.

Virkkunen M. and Linnoila M. (1990) Serotonin in early onset, male alcoholics with violent behaviour. *Annals of Medicine*. 22, 327-331.

Wall T. L., Gallen C. C. and Ethlers C. L. (1993) Effects of alcohol on the EEG in Asian men with genetic variations of ALDH2. *Biological Psychiatry* 34, 91-99.

Walter H. J., McMahon T., Dadgar J., Wang D. and Messing R. O. (2000) Ethanol regulates calcium channel subunits by protein kinase C delta-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25717-25722.

Weiss F., Lorang M.T., Bloom F. E. and Koob G. F. (1993) Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: Genetic and motivational determinants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 267, 250-258.

Weissman M. M., Myers J. K. and Harding P. S. (1980) Prevalence and psychiatric heterogeneity of alcoholism in a United States urban community. *Journal of Studies on Alcohol* 41, 672-681.

Wolstenholme J. T., Warner J. A., Capparuccini M. I., Archer K. J., Shelton K. L. and Miles M. F. (2011) Genomic analysis of individual differences in ethanol drinking: evidence for non-genetic factors in C57BL/6 mice. *PLoS One* 6, e21100.

Wu L., Wells D., Tay J., Mendis D., Abbott M. A., Barnitt A., Quinlan E., Heynen A., Fallon J.R. and Richter J. D. (1998) CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* 21, 1129-1139.

Wu H. and Zhang Y. (2011) Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes & Development* 25, 2436-2452.

Yin Y., Edelman G. M. and Vanderklish P. W. (2002) The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2368-2373.

Zhang X., Kusumo H., Sakharkar A. J., Pandey S. C., Guizzetti M. (2014) Regulation of DNA methylation by ethanol induces tissue plasminogen activator expression in astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 128,344-349.

Zheng W. H. and Quirion R. (2004) Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival. *Journal of Neurochemistry* 89, 844-852.

Zheng F., Zhou X., Luo Y., Xiao H., Wayman G. and Wang H. (2011) Regulation of brain-derived neurotrophic factor exon IV transcription through calcium responsive elements in cortical neurons. *PLoS One* 6, e28441.

Zhou F. C., Anthony B., Dunn K. W., Lindquist W. B., Xu Z. C. and Deng P. (2007) Chronic alcohol drinking alters neuronal dendritic spines in the brain reward center nucleus accumbens. *Brain Research* 1134, 148-161.

