

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE



DIPARTIMENTO DI MEDICINA E DI SCIENZE DELLA SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE PER LA SALUTE

XXVI CICLO

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14

**RUOLO DEI CANALI DEL K^+
 CA^{2+} - E VOLTAGGIO-DIPENDENTI
AD ALTA CONDUTTANZA
NELLA NEUROPROTEZIONE DA LEPTINA**

Relatore

Dott. Davide Viggiano

Dottoranda

Maria Mancini

Matr. 143291

Correlatori

Chiar.^{mo} Prof. Maurizio Tagliatela

Chiar.^{ma} Prof.ssa Lorella Maria Teresa Canzoniero

Coordinatore

Chiar.^{mo} Prof. Guido Maria Grasso

Anno Accademico 2012/2013

A Giovanni e alla mia famiglia

INDICE

INTRODUZIONE

1.1	Trasmissione glutammatergica ed eccitotossicità	1
1.1.1	Calcio, disfunzione mitocondriale e morte neuronale	5
1.1.2	Omeostasi di sodio, cloro, potassio ed eccitotossicità	9
1.2	Ruolo dei canali del potassio nel danno neuronale	12
1.2.1	Canali BK: struttura, distribuzione e proprietà biofisiche	12
1.2.2	Proprietà fisiologiche, rilevanza fisiopatologica e modulazione dei canali BK	16
1.3	Leptina: origine, struttura e funzioni	19
1.3.1	Trasporto, legame ai recettori e vie di segnalazione	22
1.3.2	Neuroprotezione della leptina nel sistema nervoso centrale	25
1.4	Scopo della ricerca	31

MATERIALI E METODI

2.1	Animali	33
2.2	Dissezione e colture neuronali	33
2.3	Genotipizzazione di embrioni di topo	35
2.4	Trattamenti cellulari	37
2.5	Valutazione della sopravvivenza neuronale mediante saggio MTT e colorazione con ioduro di propidio	38
2.6	Colture di linee cellulari e trasfezioni transienti	39
2.7	Registrazioni elettrofisiologiche	41
2.8	Studi di microfluorimetria	46
2.9	Statistica	47
2.10	Materiale utilizzato	48

RISULTATI

3.1	Tossicità di glutammato e di N-Metil-D-Aspartato su neuroni corticali di ratto	49
3.2	La leptina esercita neuroprotezione contro gli effetti neurotossici di NMDA in neuroni corticali di ratto	53
3.3	Il blocco farmacologico dei canali BK, nei neuroni corticali di ratto, previene gli effetti neuroprotettivi indotti dalla leptina dopo esposizione a NMDA	56
3.4	La leptina è inefficace nella neuroprotezione contro l'eccitotossicità indotta da NMDA in colture neuronali di topi Slo1 ^{+/-} e Slo1 ^{-/-}	59
3.5	La leptina induce l'attivazione delle correnti BK.....	61
3.6	Aumento indotto dalla leptina delle [Ca ²⁺] _i in neuroni corticali e in linee cellulari	72
3.7	La fosfoinositolo-3-chinasi (PI3K) partecipa all'aumento delle correnti BK mediato dalla leptina	74
	DISCUSSIONE	77
	PROSPETTIVE FUTURE	83
	BIBLIOGRAFIA	85

INTRODUZIONE

1.1 Trasmissione glutammatergica ed eccitotossicità

L'eccitotossicità si riferisce agli effetti tossici derivati da un'eccessiva e prolungata attivazione di recettori per aminoacidi eccitatori (Lipton, 2008; Vincent e Mulle, 2009), e nelle ultime decadi è stato ipotizzato che l'aminoacido eccitatorio glutammato, svolgesse un ruolo essenziale nella patogenesi della morte neuronale (Bano *et al.*, 2005).

Il concetto di eccitotossicità è stato introdotto da Olney e Sharpe nel 1969 quando per primi dimostrarono che i neuroni esposti al neurotrasmettitore glutammato, da essi stessi sintetizzato, erano destinati a morire a seguito di un'eccessiva eccitazione neuronale (Olney *et al.* 1969) dovuta ad aumentate concentrazioni di tale aminoacido eccitatorio o ad un'esposizione prolungata a concentrazioni moderatamente elevate del neurotrasmettitore. Più tardi, nel 1987, Choi indicava che il glutammato era una sorta di neurotossina, potente e di rapida azione, capace di mediare gli effetti neurotossici inducendo l'influsso di ioni calcio (Ca^{2+}) attraverso l'attivazione di recettori per il glutammato, supportando in tal modo la teoria che questa molecola potesse essere considerata un neurotrasmettitore chiave nello sviluppo di molte malattie neurologiche (Choi, 1988; Choi, 1987; Choi *et al.* 1987).

L'acido glutammico è un aminoacido proteinogenico non essenziale principalmente presente nel sistema nervoso centrale dei mammiferi dove svolge il ruolo di messaggero o neurotrasmettitore agendo principalmente su tre compartimenti, ovvero a livello di neuroni presinaptici, postsinaptici e all'interno delle cellule gliali e lavorando non solo come trasmettitore da punto a punto, ma anche come molecola di segnalazione extrasinaptica grazie al fenomeno di spillover e al crosstalk sinaptico (Okubo *et al.*, 2010).

Il glutammato media la maggior parte della neurotrasmissione rapida eccitatoria nel sistema nervoso centrale (SNC), ed eccita virtualmente ogni neurone. Si tratta del principale mediatore dell'informazione sensoriale, della coordinazione motoria, dei processi emozionali e cognitivi, ed è responsabile anche dei cambiamenti plastici che si sviluppano più lentamente e che sono connessi con i processi di plasticità sinaptica, della formazione e del recupero della memoria, dello sviluppo neuronale. Nonostante queste caratteristiche, se accidentalmente rilasciato nel tessuto cerebrale in quantità elevate, il

glutammato può infliggere danno massivo (Okubo *et al.*, 2010), dipendente da come le cellule sono programmate a rispondere quando esposte ad esso (Yu *et al.*, 2008). In condizioni di normalità esistono dei meccanismi cellulari responsabili del mantenimento di basse concentrazioni extracellulari di glutammato, che sono essenziali per le corrette funzioni cerebrali; da ciò ne consegue che il glutammato deve essere presente nelle giuste concentrazioni e nel posto giusto in quanto in quantità troppo elevate è dannoso, ma nello stesso tempo quantità troppo basse sono inadeguate considerato il suo ruolo essenziale.

Il corretto funzionamento della neurotrasmissione eccitatoria dipende dal mantenimento dell'omeostasi basata sulla regolazione del rilascio di glutammato dal pool vescicolare nei terminali nervosi presinaptici, dal suo uptake da parte delle cellule gliali circostanti, e dalla sensibilità dei recettori al glutammato. Solo le cellule che esprimono sulla loro superficie recettori per il glutammato sono sensibili ad esso e capaci di rispondere alla stimolazione attivando canali ionici ad essi accoppiati o una cascata di segnalazione intracellulare (Fig.1).

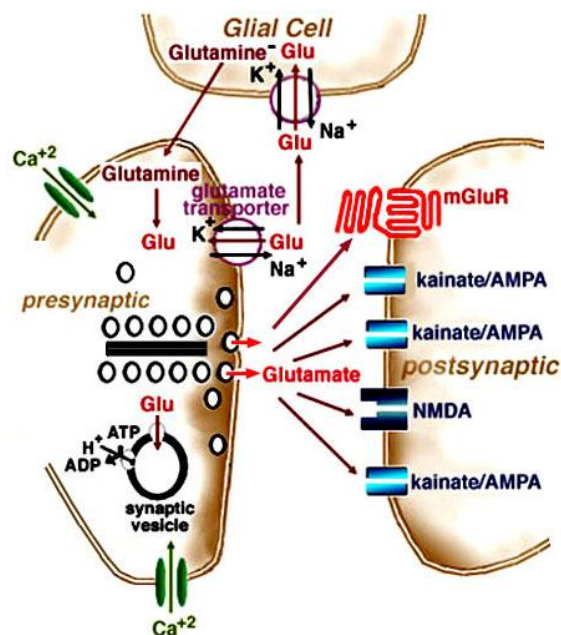


Fig.1. Rappresentazione schematica di una sinapsi glutammatergica. Sono mostrati i meccanismi responsabili del mantenimento di basse concentrazioni intracellulari del neurotrasmettitore e i recettori post-sinaptici cui il glutammato si lega (da Webvision; Connaughton, 2007).

Il glutammato può esercitare i suoi effetti attraverso il legame sia di recettori ionotropici (iGluRs), anche noti come canali ionici modulati dal glutammato, che di recettori metabotropici accoppiati a proteine G (mGluRs).

Il gruppo dei recettori iGluRs comprende tre principali classi recettoriali ovvero i recettori α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), i recettori kainato (KA), e i recettori N-Methyl-D-aspartate (NMDA), così denominati in accordo ai loro agonisti selettivi (Wollmuth *et* Sobolevsky, 2004).

I recettori AMPA e kainato, entrambi permeabili al sodio (Na^+), sono coinvolti nelle risposte postsinaptiche eccitatorie rapide, i recettori NMDA, permeabili a Ca^{2+} e Na^+ , nella generazione lenta di potenziali postsinaptici e i recettori metabotropici nelle risposte neuromodulatorie ritardate, riflettendo la loro lenta modalità di attivazione.

I recettori AMPA sono generalmente coespressi con i recettori NMDA a livello delle sinapsi glutamatergiche dove in maniera congiunta contribuiscono ai processi di plasticità sinaptica che sono coinvolti nei fenomeni di apprendimento, memoria, eccitotossicità e neuroprotezione. Tali recettori tipicamente differiscono nella loro cinetica di risposta al rilascio presinaptico di glutammato. I recettori AMPA mediano risposte postsinaptiche rapide anche a potenziali molto negativi o in assenza di potenziali d'azione, e la rapida desensitizzazione di tali recettori è responsabile delle correnti postsinaptiche eccitatorie (EPSCs); i recettori NMDA, invece, sono caratterizzati da una cinetica più lenta in quanto contengono siti di legame per agonisti da cui dipende la loro attivazione e la cui presenza rende i recettori capaci di agire da rilevatori della depolarizzazione di membrana e del legame del ligando.

I recettori NMDA sono costituiti da diverse subunità raggruppabili in tre categorie, NR1, NR2 e NR3, a loro volta comprendenti una varietà di subunità, che si organizzano a formare il recettore completo costituito da un set di quattro subunità (due NR1 e due NR2 oppure occasionalmente NR3) (Paoletti *et* Neyton, 2007). La composizione nelle subunità recettoriali cambia con lo sviluppo neuronale, per cui mentre nei neuroni immaturi sono predominanti le subunità NR1/2B (Waxman *et* Lynch, 2005), a partire da 12 giorni *in vitro* (days *in vitro* - DIV), aumenta l'espressione sinaptica della subunità NR2A e la configurazione dominante del recettore è NR1/2A/2B, con livelli di NR1/2B più alti a livello extra-sinaptico. La diversa localizzazione dei recettori NMDA a livello sinaptico ed extra-sinaptico, genera anche una diversità nelle risposte derivanti dalla stimolazione in questi diversi distretti; è stato infatti riportato che l'influsso di Ca^{2+}

indotto dalla stimolazione di recettori extra-sinaptici sia responsabile di morte neuronale, mentre quello conseguente la stimolazione dei recettori sinaptici non lo sia (Hardingham *et al.*, 2010). Questa differenza potrebbe essere in realtà dovuta alle diverse risposte da parte dei mitocondri agli influssi di Ca^{2+} nelle diverse sedi anche se sembra che sia l'intensità che la durata dell'influsso di Ca^{2+} mediato dai recettori NMDA, indipendentemente dalla localizzazione, siano fattori critici per il tipo di risposta generata, con una segnalazione pro-sopravvivenza indotta da un segnale di Ca^{2+} moderato, e una segnalazione pro-morte in risposta ad un influsso di Ca^{2+} intenso e prolungato (Soriano *et al.* Hardingham, 2007; Hou *et al.*, 2008).

L'attivazione dei recettori NMDA richiede la stimolazione di siti recettoriali ovvero il sito di riconoscimento del glutammato, posizionato sulla subunità NR2, e il sito modulatorio per il legame della glicina, sulla subunità NR1, nonché la rimozione dello ione magnesio (Mg^{2+}) che esercita un blocco voltaggio-dipendente del canale (Ginsberg, 2008) (Fig.2); solo dopo attivazione dei recettori AMPA, che è accompagnata da ingresso di ioni Na^+ , a livello dei recettori NMDA si verifica la rimozione del blocco da Mg^{2+} , indotta da un aumento del valore del potenziale di membrana, e i canali acquistano permeabilità ai cationi Ca^{2+} e Na^+ (Wollmuth *et al.* Sobolevsky, 2004).

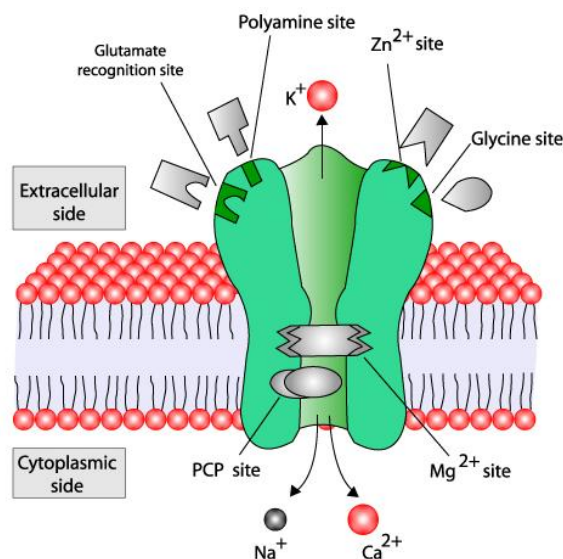


Fig.2. Rappresentazione del recettore NMDA. Sono mostrati i siti recettoriali, i siti modulatori, i siti di legame agli ioni Mg^{2+} e Zn^{2+} nonché la permeabilità ionica del recettore (da AnaesthesiaUK).

L'attivazione dei recettori può essere bloccata dalla co-applicazione del D-(-)-2-amino-5-phosphonovalerate (APV, un antagonista competitivo), del (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK-801, un antagonista non competitivo) o dall'acido chinurenico, antagonista della glicina generato endogenamente (Foster *et al.*, 1984, Paoletti *et Neyton*, 2007).

Durante l'eccitazione glutammatergica, la cooperazione tra i recettori AMPA e NMDA rappresenta dunque un requisito fondamentale per il funzionamento dell'intero sistema di trasmissione che in qualche modo si autoregola visto che l'attivazione dei recettori NMDA innesca vie di segnalazione intracellulari Ca^{2+} -dipendenti che modulano l'espressione di superficie di recettori AMPA (Chen *et Lipton*, 2006) e che tutti i recettori, lavorando in correlazione, partecipano al rilascio di glutammato (Maragakis *et Rothstein*, 2006).

La regolazione e il corretto funzionamento dell'intero sistema sono inoltre garantiti dalla presenza di speciali pompe presenti sulla superficie di membrana che rimuovono il glutammato dagli spazi extracellulari evitando che i livelli diventino troppo elevati e che il neurotrasmettitore si trasformi in una tossina capace di uccidere gli stessi neuroni. Sebbene le pompe lavorino meticolosamente per mantenere i livelli di glutammato nel giusto range, in alcuni casi i trasportatori di membrana non riescono a gestire la situazione per lungo tempo, e il glutammato libera la sua forza distruttiva non uccidendo i neuroni direttamente, ma eccitando le cellule eccessivamente e causando l'apertura di canali che mediano l'ingresso massivo di ioni che normalmente entrano nella cellula in quantità limitate (Ikonomidou *et Turski*, 2002).

1.1.1 Calcio, disfunzione mitocondriale e morte neuronale

Durante una condizione di eccitotossicità, i meccanismi responsabili del re-uptake del glutammato sono compromessi e i livelli extracellulari di tale neurotrasmettitore possono raggiungere concentrazioni che si aggirano intorno ai 100 μ M. Un accumulo eccessivo di glutammato e l'attivazione prolungata ed eccessiva dei recettori glutammatergici, in particolare il tipo NMDA, sono accompagnati da un influsso di Ca^{2+} , Na^+ , cloro (Cl) e zinco (Zn^{2+}), e da efflusso di potassio (K^+). Il ruolo del Ca^{2+} nella neurotossicità indotta dal glutammato è stato dimostrato da Berdichevsky e collaboratori (1983) e da Choi e collaboratori (1988) che osservarono che mentre la rimozione del

Na^+ extracellulare preveniva il rigonfiamento neuronale in colture di neuroni corticali, ma non preservava dai processi degenerativi, la rimozione del Ca^{2+} extracellulare attenuava la degenerazione neuronale. Queste osservazioni suggeriscono che il processo di eccitotossicità è caratterizzato da due fenomeni: il rigonfiamento immediato, dipendente da Na^+ e dal Cl^- , e una degenerazione cellulare tardiva dipendente dal Ca^{2+} , che potrebbe essere simulata utilizzando lo ionoforo A23187. Studi precedenti concludevano inoltre che la componente Ca^{2+} è la causa più significativa di morte neuronale quando i neuroni sono esposti a concentrazioni più basse di glutammato (Bano *et al.*, 2005). Concentrazioni tossiche di Ca^{2+} citoplasmatico possono anche derivare dal rilascio dai depositi interni a seguito di danni ai mitocondri o essere una conseguenza dell'attivazione dei recettori metabotropici per il glutammato che, accoppiati a proteine G, stimolano il rilascio di inositolo trifosfato che attiva i canali del Ca^{2+} presenti sul reticolo endoplasmatico; anche il malfunzionamento di recettori e canali presenti sulla membrana di tali organuli cellulari possono contribuire a questo fenomeno. L'aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} citoplasmatico può portare ad una cascata di effetti neurotossici a valle, suggerendo che i mitocondri giocano un ruolo centrale nella biologia cellulare sia in quanto produttori di ATP che come regolatori dei segnali di Ca^{2+} che normalmente è trasportato al loro interno.

La fosforilazione ossidativa avviene a livello della membrana mitocondriale interna che contiene gli enzimi che costituiscono la catena respiratoria (Calì *et al.*, 2011). Il trasporto degli elettroni attraverso la catena, libera energia favorevole che è impiegata dai complessi I (NADH-ubiquinone ossido reduttasi), III e IV per pompare protoni dalla matrice creando un gradiente protonico e un gradiente elettrochimico attraverso la membrana mitocondriale interna. L'uptake mitocondriale di Ca^{2+} regola la produzione e l'attivazione di tre enzimi metabolici, ovvero la piruvato deidrogenasi, la chetoglutarato deidrogenasi e l'isocitrato deidrogenasi (Yacoubian *et al.*, 2010), e in condizioni normali la depolarizzazione indotta dal calcio attiva tali deidrogenasi e l'ATP sintasi (Brandon *et al.*, 2006). Durante la normale attività fisiologica, la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) aumenta solo transientemente (da secondi a pochi minuti) e non ha effetti avversi sui neuroni (Takahashi *et al.*, 1999), tuttavia in condizioni di stress neuronale la capacità dei neuroni di controllare i flussi di Ca^{2+} e di recuperare da un carico di Ca^{2+} è compromessa; è infatti noto che l'uptake eccessivo di Ca^{2+} in mitocondri isolati, a seguito della formazione del poro di transizione di permeabilità (PTP) e alla perdita del

potenziale di membrana mitocondriale, è responsabile dell'aumentata formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali l'anione superossido (O^{2-}), il radicale idrossilico (OH), e il perossido d'idrogeno (H_2O_2), che a loro volta inibiscono la piruvato deidrogenasi e gli enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici nonché il complesso I della catena respiratoria. Inoltre, la disfunzione mitocondriale causata da un lieve insulto eccitotossico può portare alla morte cellulare dipendente o meno dall'attivazione delle caspasi (Lipton *et al.*, 2008) a cui contribuiscono anche proteasi chiamate calpaine che sono capaci di degradare una varietà di substrati incluso proteine citoscheletriche, recettori di membrana, ed enzimi metabolici.

La disfunzione mitocondriale, il sovraccarico di Ca^{2+} e l'attivazione di enzimi Ca^{2+} -dipendenti come la fosfolipasi A_2 (Miller *et al.*, 2010), l'ossido nitrico sintasi (Mattson MP, 2000), e la xantina ossidasi (Atlante *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2012), attraverso l'aumentata produzione di radicali liberi causano danno a proteine, carboidrati, acidi nucleici e lipidi, un aspetto quest'ultimo particolarmente importante nello stress ossidativo nei neuroni in quanto la perossidazione dei lipidi di membrana determina la formazione di aldeidi tossiche, come la 4-idrossinonenale, che compromettono il funzionamento di trasportatori di membrana come ATPasi, trasportatori del glucosio e trasportatori del glutammato, aumentando ulteriormente lo squilibrio omeostatico del Ca^{2+} (Mattson, 2003) (Fig.3).

Tra le specie radicaliche generate in risposta all'aumentato influsso di Ca^{2+} indotto dal glutammato, l'ossido nitrico (NO) riveste una particolare importanza in quanto è una molecola messaggero a livello del sistema nervoso centrale sintetizzata dall'ossido nitrico sintasi, a partire dalla L-arginina, utilizzando NADPH e ossigeno molecolare (Bian *et Murad*, 2003). A livello cerebrale sono stati identificati tre differenti isoenzimi della NO sintasi (NOS) ovvero la NOS endoteliale (eNOS), quella inducibile (iNOS) e quella neuronale (nNOS). Mentre la NOS inducibile produce alti livelli di NO e la sua attività è indipendente dai segnali di calcio, le NOS neuronale ed endoteliale producono in maniera Ca^{2+} /calmodulina dipendente basse concentrazioni di NO in tempi relativamente lunghi che partecipano ad eventi di tossicità acuta o di morte neuronale ritardata. La neurotossicità è principalmente dipendente dalla formazione di radicali perossinitrito (ONOO), che si formano in seguito all'interazione tra NO e O^{2-} , nonché dall'overstimolazione dei recettori NMDA conseguente al rilascio massivo di

glutammato indotto dallo stesso NO in quanto modulatore del rilascio di neurotrasmettitori.

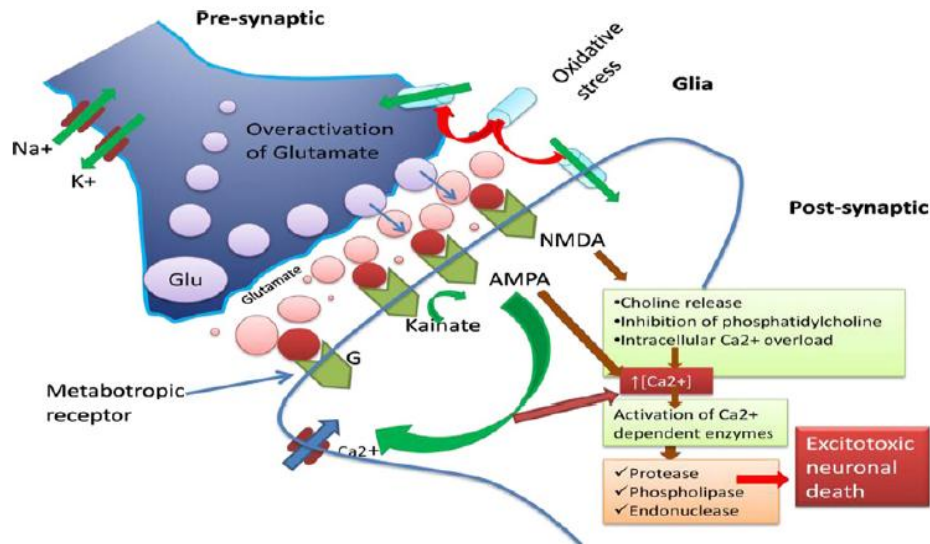


Fig.3. Rappresentazione della morte neuronale eccitotossica. L'overattivazione dei recettori del glutammato presenti sui terminali post-sinaptici dei neuroni innesca una cascata di eventi caratterizzata dal rilascio di colina, eccessivo influsso di Ca²⁺ e attivazione di vari enzimi Ca²⁺-dipendenti con conseguente morte neuronale eccitotossica (da Mehta *et al.*, 2013).

Dosi elevate di NO sono responsabili dell'apoptosi che è innescata soprattutto a seguito dei danni a carico del DNA con accumulo di p53 e stimolazione dell'espressione della proteina p21, direttamente coinvolta nell'arresto del ciclo cellulare; tuttavia l'effetto citotossico dell'ossido nitrico è soprattutto a carico dei mitocondri dove inibisce la respirazione mitocondriale inattivando la citocromo *c* ossidasi, i complessi della catena respiratoria e gli enzimi del ciclo di Krebs, e favorisce la formazione del PTP con rilascio del citocromo *c* e conseguente attivazione della caspasi, rilascio di ROS e di Ca²⁺ che attiva proteine Ca²⁺-dipendenti, come le calpaine (Bano *et al.*, 2005), che degradano le pompe di membrana responsabili dell'estrusione di Ca²⁺. Questo evento potrebbe spiegare il legame tra eccitotossicità e necrosi nonostante un'iniziale attivazione dei meccanismi apoptotici (Schwab *et al.*, 2002). La tossicità indotta dal glutammato induce quindi sia morte apoptotica che necrotica, e le cellule seguono la strada necrotica come seconda scelta quando la via apoptotica non è disponibile a causa dei bassi livelli di ATP (Dessi *et al.*, 1993).

1.1.2 Omeostasi di sodio, cloro, potassio ed eccitotossicità

Sebbene l'eccitotossicità sia frequentemente considerata sinonimo di morte cellulare Ca^{2+} -dipendente, numerosi studi hanno chiaramente dimostrato che gli effetti neurotossici del glutammato, e in particolare la rapida tossicità, sono indotti principalmente da un influsso di Na^+ e Cl^- e dal rigonfiamento osmotico, mentre la morte ritardata è un processo Ca^{2+} -dipendente (Kumar *et al.*, 2006; Won *et al.*, 2002) (Fig.4).

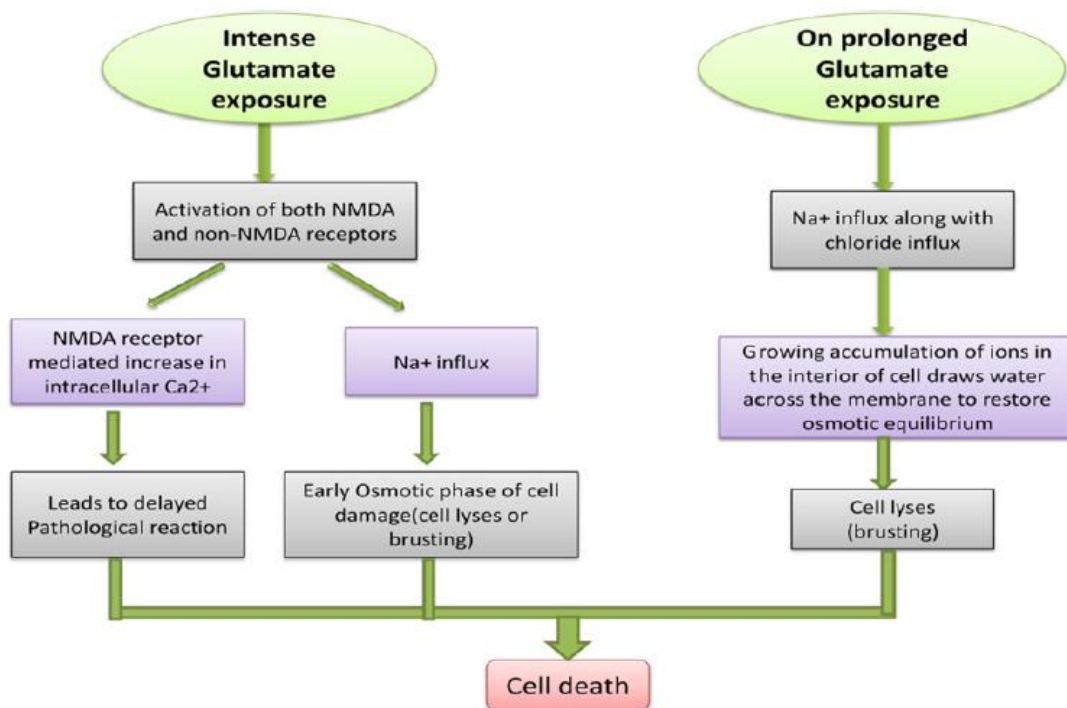


Fig.4. Meccanismo di eccitotossicità. La cascata di eventi che porta alla morte neuronale include l'iperattivazione dei recettori per il glutammato che causa un'eccessiva stimolazione sia dei recettori NMDA che non-NMDA e un eccessivo influsso di Ca^{2+} , con accumulo di Na^+ e Cl^- che causano alterazione nell'equilibrio omeostatico responsabile della lisi cellulare (da Mehta *et al.*, 2013).

È stato infatti dimostrato che la presenza di Na^+ e Cl^- extracellulari, ma non di Ca^{2+} , causavano una forma di eccitotossicità caratterizzata dalla rapida formazione di bordature dendritiche seguita da rigonfiamento somatico generalizzato e morte cellulare necrotica; il rimpiazzamento del Na^+ e del Cl^- con specie ioniche impermeabili preveniva il rigonfiamento cellulare indotto dal glutammato e riduceva fortemente la morte cellulare (Yu *et al.*, 2000). Evidenze farmacologiche suggeriscono che il Na^+ ,

che entra principalmente nelle cellule attraverso canali AMPA e NMDA (Kiedrowsky, 2007; Mongin, 2007), può direttamente causare danno, stress ossidativo e morte cellulare. Gli effetti del danno ossidativo sono fortemente esacerbati e alla base di tale condizione c'è l'aumentato utilizzo di ATP da parte della pompa del Na^+ , attivata dall'ingresso di Na^+ , accoppiato all'incapacità dei mitocondri di rispondere adeguatamente all'aumentata produzione di ATP.

La concentrazione di Cl^- intracellulare aumenta come conseguenza dell'influsso passivo che accompagna l'influsso di Na^+ , dell'attivazione dei canali del Cl^- regolati dal GABA, del blocco dei canali del Cl^- voltaggio-dipendenti, del funzionamento inverso dei trasportatori di Cl^- verso l'esterno e dell'attivazione dei cotrasportatori di Cl^- verso l'interno (Chen *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2006; Schwartz-Bloom *et al.*, 2001). In condizioni di normalità, il neurotrasmettitore inibitorio GABA, è iperpolarizzante in quanto il potenziale inverso di equilibrio per il Cl^- (E_{Cl}) è negativo rispetto al potenziale di riposo della membrana; tuttavia quando i livelli di Cl^- intracellulare sono più alti rispetto al normale l' E_{Cl} si sposta a valori più positivi e l'attivazione dei recettori GABA_A causa efflusso di Cl^- e depolarizzazione di membrana accompagnata da influsso di Ca^{2+} attraverso i recettori NMDA.

L'aumento dei livelli intracellulari di Cl^- potrebbe essere anche indotto da aumentati livelli extracellulari di K^+ che si accumula nell'ambiente extracellulare a causa del fallimento dell'attività della pompa Na^+/K^+ conseguente alla mancanza di ATP; l'esposizione sostenuta ad elevate concentrazioni di K^+ causa una significativa morte neuronale. Concentrazioni fisiologiche di K^+ prevengono l'attivazione dei recettori di morte, il rilascio del citocromo c , la formazione dell'apoptosoma, l'attivazione delle caspasi e l'attività apoptotica delle nucleasi (Yu, 2003). I canali del K^+ sono i principali contributori nel mantenimento del potenziale di riposo e la loro attivazione aiuta a mantenere il potenziale di membrana iperpolarizzato, ma in condizioni di stress neuronale l'efflusso di K^+ può causare morte neuronale. È stato dimostrato che neuroni corticali esposti a glutammato in presenza di ridotte concentrazioni di Na^+ e Ca^{2+} , perdono K^+ intracellulare e vanno incontro ad apoptosi; sia la perdita di K^+ che l'apoptosi possono essere attenuate da un aumento dei livelli di K^+ extracellulare e ciò indica che sia l'efflusso di K^+ mediato dai recettori per il glutammato, che la perdita di K^+ intracellulare contribuiscono alla morte neuronale apoptotica (Yu *et al.*, 1997; 1999). D'altro canto è stato però dimostrato che attivatori dei canali del K^+ sono

neuroprotettivi contro la morte neuronale in modelli animali, presumibilmente grazie all'iperpolarizzazione di membrana da essi mediata e alla riduzione dell'eccitabilità di membrana (Yu, 2003). Gli attivatori dei canali del K^+ potrebbero inoltre interferire con la mobilitazione del Ca^{2+} dai depositi intracellulari oppure mimare il preconditionamento (Yu, 2003).

1.2 Ruolo dei canali del K⁺ nel danno neuronale

I neuroni esprimono un'ampia varietà di canali del K⁺, tra cui i canali rettificanti entranti per il K⁺ (inward rectifying K⁺ (Kir) channels), i canali del K⁺ ad alta conduttanza attivati dal Ca²⁺ (Big conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels) e i canali del K⁺ voltaggio dipendenti (voltage-gated K⁺ (K_v) channels).

I canali del K⁺ sono regolatori cruciali dell'eccitabilità neuronale grazie alla loro capacità di stabilizzare il potenziale di membrana.

Lo stress neuronale è caratterizzato da una varietà di fenomeni quali aumentati livelli di glutammato a livello extracellulare, aumentati livelli intracellulari di Na⁺ e Ca²⁺, e rapida riduzione dei livelli intracellulari di ATP (Dirnagl *et al.*, 2003). Questi eventi e l'aberrante eccitabilità neuronale associata, in ultima istanza causano danno neuronale e morte; tuttavia i neuroni contengono numerosi meccanismi protettivi endogeni ed i canali del K⁺ sono idealmente adatti per tali scopi: i canali K_{ATP}/Kir6.2 si aprono in risposta a ridotti livelli di ATP; i canali BK mostrano aumentata attivazione in risposta agli aumentati livelli intracellulari di Ca²⁺, mentre l'attività dei canali K_v può essere potenziata da un'aumentata eccitabilità neuronale. L'apertura di tali canali iperpolarizza la membrana portando il valore del potenziale vicino al valore di equilibrio per il K⁺ e induce una soppressione dell'eccitabilità neuronale. In particolar modo i canali BK, grazie alla loro squisita sensibilità al Ca²⁺ forniscono un'importante sistema di feedback negativo per il controllo dell'ingresso di Ca²⁺ nei neuroni in quanto, inattivando i canali del Ca²⁺ voltaggio dipendenti (voltage-dependent calcium (Ca_v) channels) e aumentando l'attività dello scambiatore Na⁺/Ca²⁺, regolano i processi Ca²⁺-dipendenti.

1.2.1 Canali BK: struttura, distribuzione e proprietà biofisiche

I canali del potassio BK, anche conosciuti come BK_{Ca}, Slo1, MaxiK o K_{Ca1.1}, sono codificati dal gene Slo1 (KCNMA1) localizzato sul cromosoma 10 (10q22.3). Il gene ha una struttura piuttosto complessa con una sequenza codificante che ricopre 770 K bp e organizzata in oltre 20 esoni. I trascritti di tale gene sono sottoposti ad un esteso processamento e i neuroni mammiferi esprimono varianti di splicing alternativo (Fury *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2008). I canali BK sono espressi ubiquitariamente nel sistema nervoso centrale e a livello cerebrale sono prevalentemente localizzati a livello degli assoni e dei terminali sinaptici nell'ippocampo e nel cervelletto (Knaus *et al.*, 1996;

Misonou *et al.*, 2006); in quest'ultima sede sono stati ritrovati a livello dendritico nelle cellule del Purkinje. La loro espressione presinaptica è consistente con il loro ruolo di regolatori nel rilascio di neurotrasmettitori, e a livello corticale ed ippocampale le subunità sono prevalentemente espresse nei terminali glutammatergici piuttosto che in quelli GABAergici. La loro presenza a livello post-sinaptico (Sailer *et al.*, 2006) contribuisce alla ripolarizzazione che fa seguito ad un potenziale d'azione (Poolos *et al.*, 1999).

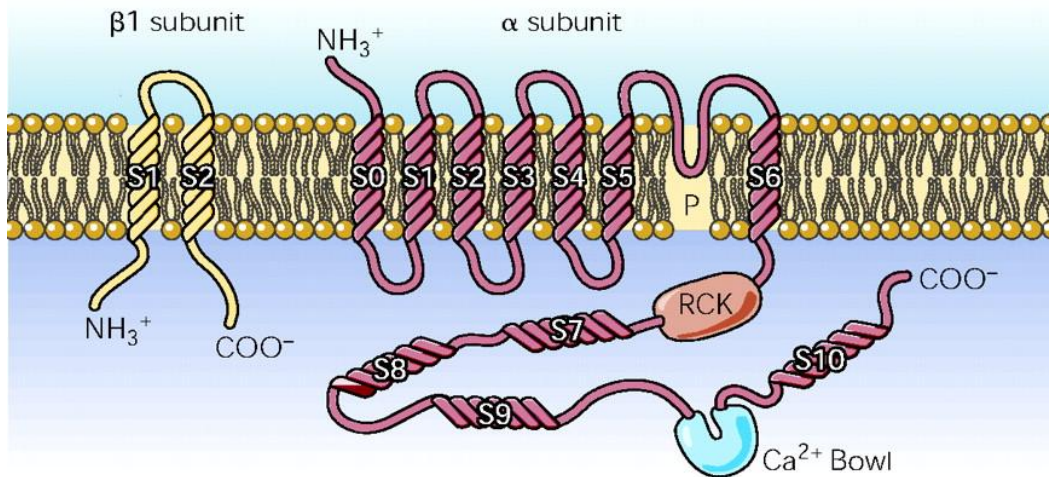
I canali BK hanno una conduttanza compresa tra 100-300 pS e sono attivati sia da aumenti nei livelli intracellulari di Ca^{2+} che da eventi di depolarizzazione di membrana. I meccanismi di Ca^{2+} - e voltaggio-dipendenza non sono correlati, ma ogni fenomeno è capace in maniera autonoma di aumentare la probabilità di apertura dei canali (Horrigan *et al.*, 2002). In condizioni fisiologiche i canali BK hanno una bassa affinità per il Ca^{2+} e per attivare il canale sono necessarie concentrazioni superiori a 10 μ M; questa sensibilità al Ca^{2+} rappresenta un importante meccanismo di feedback per il controllo dell'ingresso di Ca^{2+} ed i conseguenti processi Ca^{2+} -dipendenti.

Dal punto di vista strutturale un canale funzionale minimo è costituito da quattro subunità α identiche che determinano le proprietà base di conduttanza unitaria, di sensibilità al voltaggio e al Ca^{2+} , e la probabilità di apertura; in molti tessuti, tuttavia, le subunità α sono associate con subunità β regolatorie, la cui espressione è tessuto specifica (Fig.5).

I canali BK sono dunque tetrameri di subunità α organizzate a formare un poro. Ogni subunità contiene 6 segmenti transmembrana (S1-S6) a livello della corta estremità N-terminale e un unico segmento idrofobico (S0). Oltre ai domini transmembrana, ogni subunità α è caratterizzata dalla presenza di altri 4 segmenti (S7-S10) a livello della lunga porzione C-terminale che si estende sul versante intracitoplasmatico (Wallner *et al.*, 1996). Il poro di permeabilità, selettivo al passaggio di ioni K^+ , è localizzato al centro delle quattro subunità α ed è circondato dal dominio di sensibilità al voltaggio (segmenti S1-S4) (Ma *et al.*, 2006). La presenza di residui acidi a livello dei segmenti S2 e S3, e di residui basici, carichi positivamente, a livello del segmento S4, conferisce ai canali sensibilità al voltaggio (Diaz *et al.*, 1998); la depolarizzazione di membrana causa movimento di questi residui carichi che risulta nell'apertura (gating) del poro di permeabilità al K^+ . Il motivo formante il poro è un loop tra i segmenti S5 e S6 che

controlla la permeabilità del canale; il segmento S6 sembra essere il principale determinante strutturale per il gating (Wu *et al.*, 2009).

A BK channel structure



B

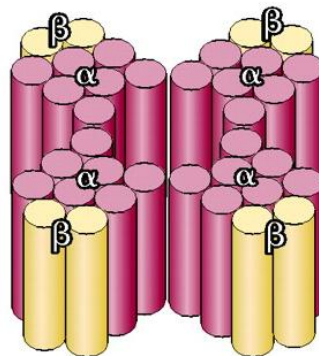


Fig.5. Schema rappresentativo dei canali BK. (A) Struttura delle subunità α e β dei canali. La subunità β consiste di due domini transmembrana mentre la subunità α presenta 11 domini idrofobici (S0-S10) con S0-S6 che attraversano la membrana citoplasmatica; la regione che costituisce il poro del canale si trova tra i segmenti S5 e S6. (B) Canale BK nativo formato dall'associazione delle quattro subunità α e le quattro subunità β (da Ledoux *et al.*, 2006).

La regione C-terminale intracellulare contiene due domini regolatori della conduttanza al K^+ (RCK1 e RCK2) che contribuiscono alla regolazione fisiologica dei canali BK indotta dal Ca^{2+} o da altri stimoli intracellulari (Yuan *et al.*, 2010; Schreiber *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2010). La regione distale (segmenti S9-S10) o dominio di coda C-terminale,

contiene la “Ca²⁺ bowl”, una regione ricca di aspartato che è un elemento strutturale del dominio RCK2. Ogni subunità α del canale BK contiene due domini tandem RCK1-RCK2, e la sensibilità al Ca²⁺ è determinata da un “gating ring” di otto domini RCK di quattro subunità α assemblate (Wang *et al.*, 2009). Grazie a queste caratteristiche strutturali l’apertura dei canali BK si verifica attraverso due meccanismi indipendenti di sensibilità, uno che è voltaggio dipendente a livello dell’estremità N-terminale, e l’altro che è Ca²⁺ dipendente a livello dell’estremità C-terminale. I canali BK sono caratterizzati dalla presenza di almeno due siti di riconoscimento del Ca²⁺, uno a bassa affinità e l’altro ad alta affinità. I siti di riconoscimento del Ca²⁺ ad alta affinità sono localizzati nel dominio RCK1 (Xia *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010) e nella “Ca²⁺ bowl” del dominio RCK2 (Yusifov *et al.*, 2008). Il sito di riconoscimento del Ca²⁺ a bassa affinità è localizzato nel dominio RCK1, ma la sua funzione non è stata chiarita; è solo noto che in condizioni fisiologiche, quando le [Ca²⁺]_i sono comprese nel range di poche centinaia di nanomoli a decine di micromoli, i siti di riconoscimento del Ca²⁺ a bassa affinità non sono occupati dallo ione (Zhang *et al.*, 2001), suggerendo che il loro contributo nell’aumento della probabilità di apertura del canale è limitato.

I canali BK possono essere inoltre attivati da Mg²⁺ intracellulare (Shi *et al.*, 2002) e da H⁺ intracellulari (Hou *et al.*, 2008), e in entrambi i casi i siti di riconoscimento e sensibilità sono localizzati prevalentemente a livello del dominio RCK1; la regolazione dell’attivazione dei canali include inoltre reazioni di fosforilazione mediate da PKA (c-AMP-dependent protein kinase) e PKC (protein kinase C), che rispettivamente attivano o inibiscono i canali BK (Zhou *et al.*, 2011); in questo modo numerosi fattori metabolici contribuiscono al controllo dell’attività dei canali.

I canali BK nativi sono associati con subunità β accessorie chiamate β 1- β 4 organizzate in due domini che attraversano la membrana. Ogni subunità è interposta tra due subunità α adiacenti (Lui *et al.*, 2010). Dal punto di vista funzionale le subunità β alterano il gating e la sensibilità farmacologica dei canali BK nonché la loro regolazione per mezzo di reazioni di fosforilazione (Dworetzky *et al.*, 1996; Meera *et al.*, 2000). In particolar modo la subunità regolatoria β 1 aumenta la sensibilità al Ca²⁺ dei canali BK e rallenta la velocità di apertura del canale, mentre la subunità β 2 conferisce rapida cinetica di inattivazione (Lee *et al.*, 2009; Wallner *et al.*, 1999); la subunità β 3 aumenta l’attività del canale BK, e infine la subunità β 4, specifica per i canali BK espressi a livello

cerebrale, aumenta o riduce l'attività del canale rispettivamente in alte o basse concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} (Brenner *et al.*, 2000). La subunità $\beta 4$ rallenta inoltre le cinetiche di attivazione e inattivazione dei canali BK aumentando la sensibilità del canale a bloccanti del poro come caribdotossina e iberiotossina (Wang *et al.*, 2006). Contrariamente alle subunità α , che sono distribuite in maniera ubiquitaria, le subunità β mostrano un ristretto pattern di espressione (Hu *et al.*, 2003; Uebele *et al.*, 2000): l'espressione delle subunità $\beta 1$ è prevalente al di fuori del sistema nervoso centrale, mentre quella di $\beta 4$ sembra essere ristretta principalmente a livello di questo (Behrens *et al.*, 2000). A livello del sistema nervoso centrale sono espresse anche le subunità $\beta 2$ e $\beta 3$ i cui livelli di mRNA possono essere deboli oppure alti (Piwonska *et al.*, 2008).

1.2.2 Proprietà fisiologiche, rilevanza fisiopatologica e modulazione dei canali BK

La sensibilità dei canali BK al Ca^{2+} , le rapide cinetiche di attivazione, e l'estremamente ampia conduttanza del singolo canale, fanno sì che l'attivazione di tali canali possa essere un'importante risposta all'ingresso di Ca^{2+} e alla depolarizzazione di membrana in condizioni fisiologiche. I canali BK sono implicati nella generazione della fase rapida del potenziale di iperpolarizzazione postumo (after-hyperpolarization potential - AHP), e agiscono come determinanti chiave nel periodo refrattario del firing, limitando l'influsso di Ca^{2+} attraverso i canali del Ca^{2+} -voltage dipendente e i recettori per il glutammato localizzati a livello dendritico e dei terminali sinaptici (Sausbier *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2001). La prevenzione dell'aumento dei livelli di Ca^{2+} , avviene non solo attraverso l'inattivazione dei canali Ca_v , ma anche attraverso un aumento dell'attività dello scambiatore Na^+/Ca^{2+} . A livello presinaptico i canali BK svolgono inoltre l'importante ruolo nella regolazione negativa del rilascio di neurotrasmettitori attivato nei terminali presinaptici dall'influsso di calcio attraverso i canali Ca_v . L'attivazione presinaptica dei canali BK sembra tuttavia essere strettamente associata all'aumento massivo dei livelli di Ca^{2+} intracellulare nei terminali presinaptici che si verifica in condizioni di stress neuronale; l'attivazione porta alla chiusura dei canali Na_v e Ca_v con inibizione di successivi potenziali d'azione ed effetto protettivo contro la neurodegenerazione

associata; è stato infatti osservato che il blocco farmacologico dei canali BK in condizioni di ischemia cerebrale aggrava il danno neuronale (Rundén-Pran *et al.*, 2002).

Considerata la loro capacità nel controllo dell'eccitabilità neuronale, la modulazione dei canali BK potrebbe avere un'importante rilevanza clinica in quanto molti fattori responsabili del danno neuronale, incluso Ca^{2+} e pH, regolano l'attività dei canali BK (Sanabria *et al.*, 2001; Xion *et al.*, 2000).

A livello del sistema nervoso centrale, il Ca^{2+} responsabile dell'attivazione dei canali BK è fornito principalmente dai canali del calcio (Ca_v) e dai recettori NMDA (Chang *et al.*, 1997; Isaacson *et al.*, 2001; Berkefeld *et al.*, 2006), che colocalizzano con i canali BK, e la cui attivazione è associata ad eventi di depolarizzazione di membrana. La depolarizzazione di membrana, inoltre, porta spesso ad acidificazione intracellulare che può modificare l'attivazione dei canali BK, ma se da una parte ioni H^+ sono capaci di attivare i canali BK, dall'altra la presenza concomitante di alti livelli di Ca^{2+} porta ad una riduzione dell'attività dei canali stessi (Song *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010). Allo stesso modo lo Zn^{2+} , che controlla l'eccitabilità neuronale, può attivare i canali BK mentre una riduzione nei livelli di tale ione può causare stati di ipereccitabilità. Anche il contributo di alcuni modulatori dei canali BK, come ad esempio l'eme che porta alla liberazione di monossido di carbonio, resta ancora poco chiaro e il ruolo di tali sostanze è controverso (Tang *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2008). È noto invece che l'attività dei canali può essere inibita dal colesterolo che riduce sia l'apertura media che il tempo di chiusura degli stessi (Crowley *et al.*, 2003), ma può essere tuttavia aumentata da una varietà di ormoni steroidei (King *et al.*, 2006; Valverde *et al.*, 1999). Molti altri fattori endogeni inclusi ossido nitrico e metaboliti dell'acido arachidonico modulano l'attività dei canali BK attraverso reazioni di fosforilazioni o defosforilazioni; in entrambi i casi si assiste ad un potenziamento dell'attività dei canali rispettivamente attraverso una riduzione della cinetica di inattivazione e un aumento della probabilità di apertura (Sun *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2006). Infine, oltre all'etanolo che è capace di attivare i canali aumentando il loro tempo medio di apertura e promuovendo il gating dipendente dal Ca^{2+} (Liu *et al.*, 2008), una vasta gamma di altri composti esogeni è capace di modulare l'attivazione dei canali BK.

I canali BK sono altamente sensibili al bloccante non selettivo TEA, e a svariate neurotossine e farmaci che bloccano selettivamente e con alta potenza tali canali, incluso iberiotossina, caribdotossina e slotossina, tutte da veleno di scorpione, e paxillina, una

tossina estratta invece da fungo. Mentre le tossine di scorpione agiscono come bloccanti del poro (Kaczorowski *et al.*, 1999), il meccanismo inibitorio della paxillina è più complesso e coinvolge modulazione allosterica (Sanchez *et al.*, 1996).

Sono stati sviluppati anche numerosi attivatori dei canali BK con l'obiettivo di sopprimere l'eccitabilità di membrana, come NS1608 e NS1619 il cui meccanismo di attivazione non è perfettamente conosciuto, ma sembra essere indipendente dal Ca^{2+} (Strobaek *et al.*, 1996). L'attivatore BMS-204352 è strutturalmente simile a NS1619, ed è un potente attivatore Ca^{2+} -dipendente dei canali BK (Gribkoff *et al.*, 2001); questa caratteristica ha lasciato intendere che tale composto potesse essere utilizzato come attivatore specifico dei canali in condizioni di stress neuronale caratterizzate quindi da elevati livelli di Ca^{2+} . Sebbene il farmaco mostrava un promettente effetto protettivo in modelli animali di ischemia cerebrale, quando utilizzato nella fase III di un trial clinico (Jensen *et al.*, 2002), non mostrava effetti significativi se confrontato con un placebo e rivelava inoltre una bassa selettività per i canali BK in quanto agiva anche su altri canali al K^+ (Schroder *et al.*, 2001; Schroder *et al.*, 2003; Dupuis *et al.*, 2002).

1.3 Leptina: origine, struttura e funzioni

Nel 1949, nel laboratorio del professore Jackson, Ingalls e collaboratori osservarono una linea di topi inusualmente grassi caratterizzati da un peso corporeo tre volte superiore rispetto agli animali normali; il gene responsabile di tale mutazione che causava dunque obesità fu identificato solo nel 1994 (Halaas *et al.*, 1995) e denominato *ob* (obese). Il prodotto di tale gene è una proteina sintetizzata principalmente dal tessuto adiposo che, nei mammiferi, partecipa al mantenimento dell'omeostasi energetica aumentando la spesa energetica e riducendo l'assunzione di cibo, portando di conseguenza ad una perdita di peso (Pellemounter *et al.*, 1995).

La proteina sintetizzata a partire da tale gene fu chiamata da Halaas e collaboratori con il nome di leptina, dal greco *leptos* che vuol dire “magro” o “snello”.

La leptina umana consiste di 146 aminoacidi con un peso molecolare di circa 16 kDa; mostra un'omologia di sequenza pari a circa l'80% con la leptina di altre specie e appartiene alla classe I della famiglia delle citochine a lunga catena (Baumann *et al.*, 1996). La struttura della leptina consiste di quattro eliche impacchettate e connesse mediante un segmento molto corto e due loops di interconnessione più lunghi. Sebbene la maggior parte della leptina sia sintetizzata dal tessuto adiposo bianco, anche altre strutture come stomaco (Bado *et al.*, 1998), placenta (Hoggard *et al.*, 1997), muscolo scheletrico (Wang *et al.*, 1998), cuore (Purdham *et al.*, 2004) e cervello (Morash *et al.*, 1999) sono capaci di sintesi anche se a livelli molto più bassi.

I principali effetti conosciuti della leptina sulla fisiologia dei mammiferi sono la soppressione dell'assunzione di cibo, la stimolazione della termogenesi e la regolazione della secrezione neuroendocrina (Hwa *et al.*, 1996; Friedman *et al.*, 1998; Friedman, 2009).

La funzione di soppressore dell'assunzione di cibo è espletata in seguito al legame della leptina ai propri recettori localizzati sulla superficie di neuroni ipotalamici di cui regola l'attività. Il nucleo arcuato ipotalamico (ARC), è la regione più strettamente associata agli effetti della leptina sull'omeostasi energetica.

Il nucleo arcuato contiene almeno due popolazioni di neuroni sensibili alla leptina. La prima popolazione produce il potente peptide oreogigenico Neuropeptide Y (NPY) e il peptide correlato alla proteina Agouti (Agouti-Related Protein – AgRP); iniezioni di NPY o AgRP determinano un aumento dell'assunzione di cibo, mentre l'ablazione di

neuroni NPY o AgRP determina una significativa ipofagia e perdita di peso (Gropp *et al.*, 2005; Luquet *et al.*, 2005). Entrambe queste popolazioni neuronali rappresentano importanti modulatori dell'assunzione di cibo, e le azioni della leptina quale soppressore dell'appetito, è almeno in parte legata alla sua capacità di inibire tali neuroni.

Adiacenti ai neuroni NPY/AgRP si trovano altri neuroni che producono pro-opiomelanocortina (POMC) e trascritti regolati da cocaina e anfetamina (CART). La pro-opiomelanocortina è una proteina precursore che è processata in una varietà di prodotti più piccoli, tra cui l'ormone che stimola gli alpha-melanociti (α -MSH); iniezioni di α -MSH o del suo analogo stabile Melanotan II (MTII) determinano soppressione dell'assunzione di cibo, mentre la delezione genetica dei neuroni POMC risulta in un fenotipo obeso (Krude *et al.*, 1998; Yaswen *et al.*, 1999). In questi neuroni è stato inoltre dimostrato che il fenotipo obeso è causato dalla delezione dei recettori per la leptina, e che quindi la capacità dei neuroni POMC di esercitare un'influenza inibitoria sull'assunzione di cibo dipende parzialmente dalla capacità della leptina di inibire tali neuroni.

I neuroni del nucleo arcuato, oltre alla leptina, rispondono anche un'ampia varietà di segnali come grelina e PYY (Kohno *et al.*, 2003; Riediger *et al.*, 2004), nonché glucosio, acidi grassi e aminoacidi, ma un altro importante segnale ormonale che reprime l'attività dei neuroni NPY e stimola i neuroni POMC è l'insulina; iniezioni dirette di tale ormone inibiscono l'assunzione di cibo mentre la delezione selettiva dei recettori per l'insulina causa obesità (Bruning *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 1979). Gli effetti fisiologici di insulina e leptina sono in parte sovrapponibili e questo aspetto è dipendente da vie intracellulari comuni che tali ormoni regolano (Fig.6).

Le azioni della leptina nella regolazione dell'assunzione di cibo non si limitano al solo nucleo arcuato, ma si estendono anche al nucleo ventromediale (VMN), dove l'ormone attiva i neuroni che producono SF-1, e all'area caudale del tronco cerebrale dove invece agisce su una popolazione di neuroni all'interno del nucleo del tratto solitario (NTS) inibendo in entrambi i casi l'assunzione di cibo e riducendo l'adiposità corporea (Dhillon *et al.*, 2006; Bingham *et al.*, 2008; Grill *et al.*, 2002; Grill, 2006).

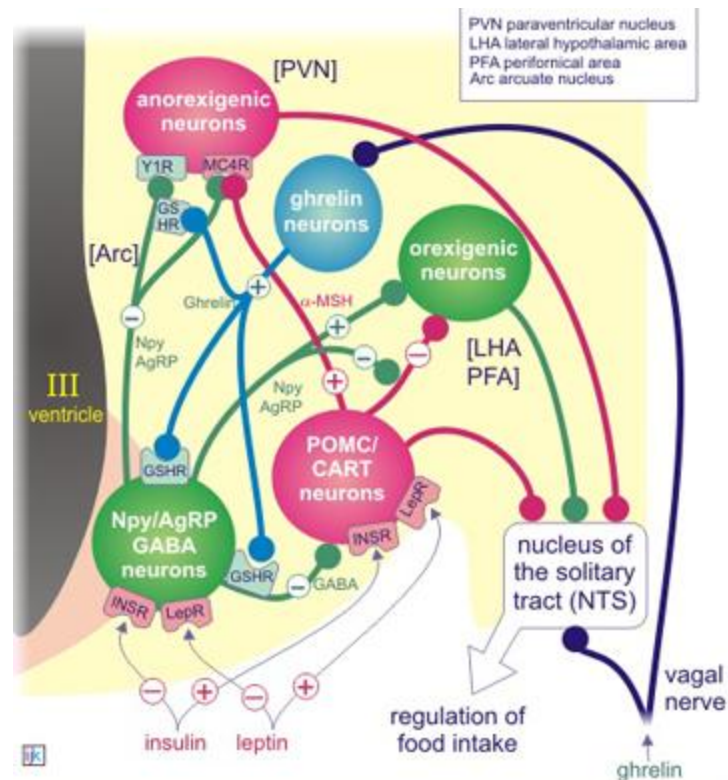


Fig.6. Regolazione dell'assunzione di cibo a livello del nucleo arcuato da parte della leptina e dell'insulina (ormoni anoressigenici) e da parte della grelina (ormone oressigenico). Le linee viola indicano uno "stop eating" mentre quelle verdi indicano un "go eating" (da Cell Biology promotion: Obesity Project 2009).

La soppressione dell'assunzione di cibo rappresenta tuttavia solo una componente degli effetti della leptina sulla regolazione dell'omeostasi energetica, in quanto tale ormone è capace di aumentare la spesa energetica e l'ossidazione dei grassi attraverso l'attivazione del sistema nervoso simpatico e del tessuto adiposo bruno agendo conseguentemente anche a livello di altri tessuti e in particolare del muscolo scheletrico (Hwa *et al.*, 1997; Shimabukuro *et al.*, 1997; Dumbar *et al.*, 1997; Commins *et al.*, 1997).

La regolazione dell'omeostasi energetica, inoltre, non avviene solo attraverso il sistema nervoso simpatico ma anche attraverso la secrezione ormonale neuroendocrina di ormoni tiroidei, ormone della crescita, ACTH e gonadotropine. Grazie a quest'ultimo ormone, la leptina regola in maniera meno diretta la riproduzione: perdite di peso e bilanci energetici negativi sono associati ad un'alterazione della capacità riproduttiva dipendente dall'inibizione del rilascio di gonadotropine; la leptina, agendo a livello

ipotalamico e promuovendo la secrezione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), probabilmente attraverso l'inibizione del NPY, migliora significativamente la funzione riproduttiva (Henry *et al.*, 2001; McDonald *et al.*, 1989).

1.3.1 Trasporto, legame ai recettori e vie di segnalazione

Il recettore della leptina (ObR o LEPR), anche conosciuto come CD295, è un prodotto del gene diabetes (*db*) o gene *Lepr* (Tartaglia *et al.*, 1995), che codifica per un dominio recettoriale a singola catena che appartiene alla superfamiglia dei recettori di classe I per le citochine (Baumann *et al.*, 1996). Il gene *Lepr* codifica per sei forme recettoriali prodotte mediante splicing alternativo, ObRa-ObRf; di queste forme, ObRb, la sola proteina *full-length* prodotta e la sola funzionale, consiste di 1162 residui aminoacidici di cui 303 formano il motivo di segnalazione intracellulare. Tutte le altre forme recettoriali sono chiamate nel complesso *short-forms* a causa dei loro domini intracellulari tronchi a vari livelli che ne causano l'incapacità nella segnalazione; tali isoforme sono tuttavia importanti nel trasporto e nella regolazione della biodisponibilità della leptina a livello del sistema nervoso centrale dopo che la leptina rilasciata dagli adipociti abbandona il circolo sanguigno per attraversare la barriera ematoencefalica (Fig.7). Il trasporto della leptina è unidirezionale, competitivo e saturabile ed è un sistema ad alta affinità a livello ipotalamico e del plesso corioideo, e a bassa affinità a livello di tutte le altre aree cerebrali. L'isoforma ObR-e, che è totalmente tronca e manca anche della porzione di legame alla membrana posseduta invece da tutti gli altri recettori, è secreta nel circolo sanguigno dove lega la leptina circolante regolandone i livelli ematici (Gallardo *et al.*, 2005).

La forma lunga del recettore è la più espressa a livello ipotalamico con una concentrazione più alta a livello dei nuclei arcuato, ventromediale, dorsomediale, e laterale (Fei *et al.*, 1997; Banks *et al.*, 1996; Mercer *et al.*, 1996) ed ha un'espressione significativa anche a livello di ippocampo, corteccia cerebrale, substantia nigra pars compacta e cervelletto (Weng *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007); le forme brevi sono invece espresse prevalentemente nel plesso corioideo, nelle cellule endoteliali della barriera ematoencefalica e nell'ipotalamo, e a livelli più bassi anche in altre aree cerebrali (Golden *et al.*, 1997).

Il legame della leptina al recettore ne induce l'omodimerizzazione che determina il reclutamento della proteina ad attività tirosin-chinasica JAK2 (Janus tyrosine kinase 2) che si attiva mediante autofosforilazione a livello dei residui di tirosina 1007/1008 (Taga *et al.*, 1997) e fosforila i residui tirosinici del dominio intracellulare di ObR-b e altre chinasi. Tale meccanismo amplifica il segnale della leptina e determina l'attivazione di molteplici chinasi effettrici.

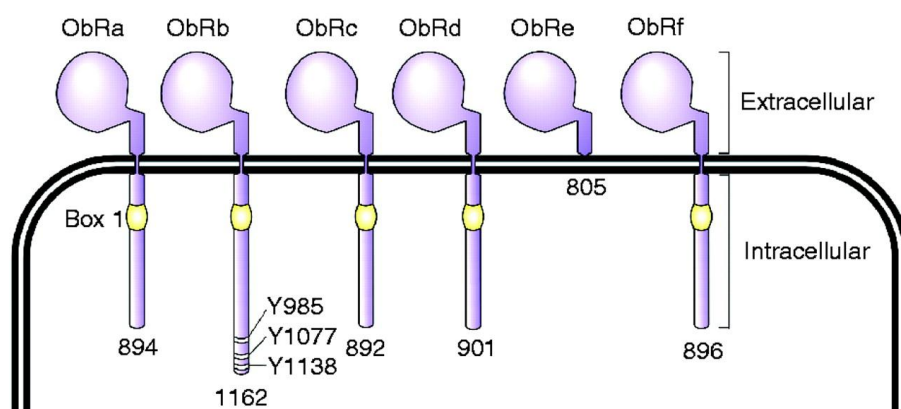


Fig.7. Isoforme del recettore della leptina. Le sei isoforme, derivanti da processi di splicing alternativo, presentano un dominio extracellulare comune e domini intracellulari con diversa lunghezza. La regione box1 è richiesta per l'interazione con la chinasi Jak e media l'attivazione del recettore; solo la forma lunga (ObRb) contiene tuttavia i domini per l'attivazione completa del recettore e per la trasduzione di segnali a valle (da Marroquí *et al.*, 2012)

La fosforilazione del recettore si verifica a livello di tre siti che diventano a loro volta siti di ancoraggio per ulteriori componenti di segnalazione a valle (Fig.8). I siti fosforilati sono: Tyr985, Tyr1077, Tyr1138. La fosforilazione della Tyr985 porta al reclutamento e alla fosforilazione della proteina SHP2 (SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase), che conseguentemente lega e attiva la proteina GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2). GRB2, insieme a SHP2, attiva molte vie di segnalazione che includono MEK (miogeno-activated protein kinase) ed ERK (extracellular signal-related kinase). ERK svolge un duplice effetto sull'attività cellulare in quanto, oltre a modificare l'espressione genica di c-fos e di BDNF (brain-derived neurotrophic factor) attraverso l'attivazione della proteina CREB (cAMP-response element binding protein) (Banks *et al.*, 2000), fosforila e inibisce numerose proteine proapoptotiche tra cui BAD (binding

alcohol dehydrogenase) e Bim-EL (Cheung *et al.*, 2004). Parallelamente all'attivazione di MEK-ERK, la fosforilazione della Tyr1077 recluta la proteina IRS (insulin receptor substrate) che porta all'attivazione della proteina PI3K (phosphoinositide-3 kinase) e del suo effettore a valle Akt (Wauman *et al.*, 2008) che è una chinasi critica nella regolazione della vitalità neuronale grazie alla sua azione pro-sopravvivenza e alla sua attività antiapoptotica (Zhang *et al.*, 2004).

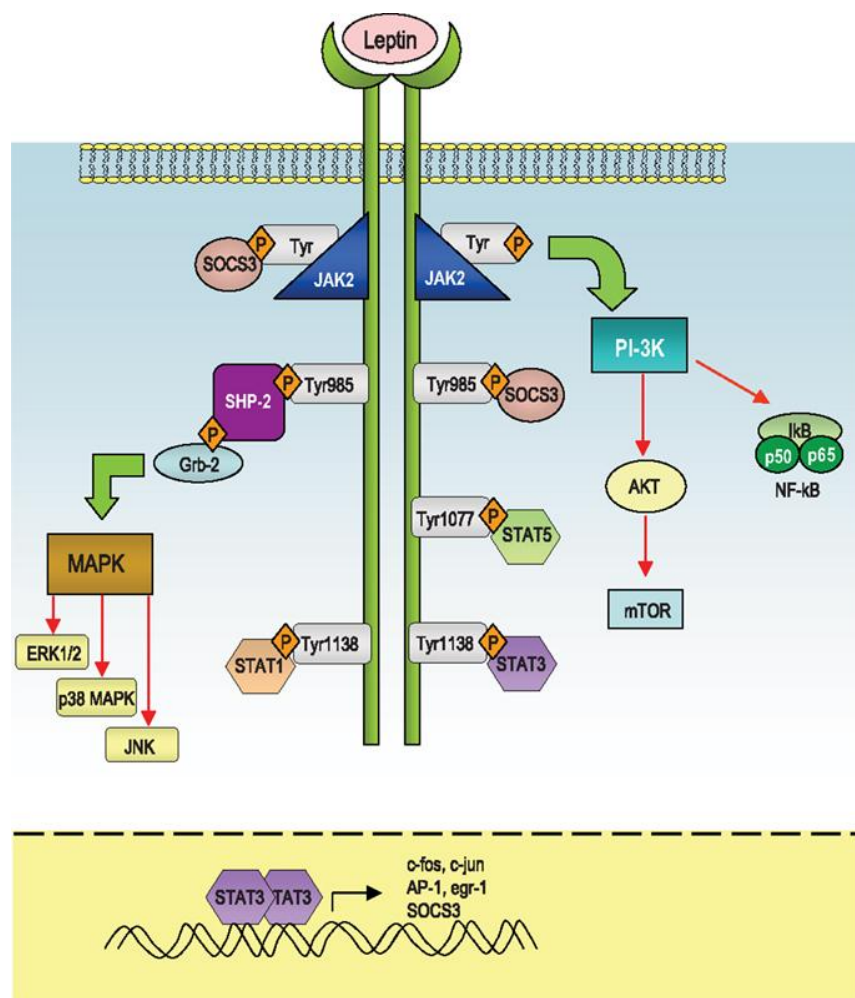


Fig.8. Rappresentazione schematica delle vie indotte dalla leptina. Il legame della leptina al proprio recettore ne induce l'autofosforilazione e la fosforilazione di Jak2 che determina l'attivazione della via PI3K/Akt. Le proteine STAT vengono reclutate a livello di siti diversi e in particolar modo dalla dimerizzazione e traslocazione della proteina STAT3 nel nucleo dipende l'espressione di numerosi geni. Il reclutamento invece delle proteine SHP-2 e Grb-2 è responsabile dell'attivazione della via MAPK/ERK (da Procaccini *et al.*, 2013).

Infine la fosforilazione della Tyr1138 porta al reclutamento di monomeri di STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) che, dopo la fosforilazione da parte di JAK2, dimerizzano e si attivano mediando una serie di eventi trascrizionali tra cui molti associati con l'assunzione di cibo e la spesa energetica, come la sintesi di proopiomelanocortina (Cowley *et al.*, 2001), ma anche altri correlati alla trascrizione di proteine antiapoptotiche tra cui Bcl-xL (Guo *et al.*, 2008). STAT3 inoltre è capace di aumentare l'espressione di SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) che è un regolatore a feedback negativo della fosforilazione di ObR-b indotta da JAK2 (Bjørbaek *et al.*, 1998).

1.3.2 Neuroprotezione della leptina nel sistema nervoso centrale

L'espressione diffusa dei recettori della leptina a livello di molte aree cerebrali, ha messo in evidenza la capacità di tale ormone di esercitare effetti anche a livello di siti extra-ipotalamici; infatti, oltre ad essere un modulatore dell'assunzione di cibo, è stato recentemente proposto che la leptina possa in realtà modificare strutture e funzioni neuronali e sinaptiche esercitando effetti neurotrofici e neuroprotettivi (Ahima *et al.*, 1999; Signore *et al.*, 2008; Tang, 2008) in diversi distretti cerebrali, contribuendo a fenomeni di plasticità, al miglioramento dell'apprendimento e della memoria nonché al mantenimento e alla riparazione del sistema nervoso.

Nei siti extra-ipotalamici la leptina agisce regolando direttamente le funzioni neuronali e l'attività sinaptica. In particolar modo, a livello della regione CA1 ippocampale, la leptina è responsabile dell'induzione di fenomeni di plasticità sinaptica e della memoria spaziale; è stato infatti riportato che in modelli animali la mancanza di leptina o del suo recettore altera lo sviluppo di potenziamento a lungo termine (long-term potentiation - LTP) e depressione a lungo termine (long-term depression - LTD) associata alla riduzione dell'attività della CAMK II (Li *et al.*, 2002). In accordo con questa osservazione, è stato dimostrato infatti che il trattamento dei neuroni ippocampali con leptina stimola la fosforilazione della CAMK II facilitando lo sviluppo di LTP, ma in condizioni di aumentata eccitabilità la leptina evoca LTD. I cambiamenti nei fenomeni di LTP e LTD sono dipendenti dalla capacità della leptina di regolare la funzione dei recettori NMDA di cui ne modifica l'attivazione inducendo variazioni nei livelli intracellulari di Ca^{2+} e

facilitando la trasmissione sinaptica mediata da tali recettori (Shanley *et al.*, 2001; Durakoglugil *et al.*, 2005); inoltre l'ormone sembra essere anche capace di alterare l'espressione delle subunità NR1, NR2B, nonché della sinapsina 2A e della sinaptofisina (Walker *et al.*, 2007).

La leptina, oltre alla capacità di modificare l'attività dei recettori NMDA, regola anche la funzione dei canali BK che sono responsabili della ripolarizzazione dei potenziali d'azione; questa capacità di attivare i canali BK fa sì che la leptina sia un importante regolatore dell'eccitabilità neuronale a livello ippocampale. È stato infatti dimostrato che la leptina possiede una potente azione anticonvulsivante considerata la capacità di ridurre significativamente l'eccitabilità ippocampale in due modelli di epilessia (Shanley *et al.*, 2002a; 2002b; O'Malley *et al.*, 2005). È stato suggerito che l'attivazione dei canali BK da parte della leptina sia un processo guidato dalla PI3K che attraverso la riorganizzazione dei filamenti di actina, oltre ad attivare i canali con un meccanismo ancora poco chiaro, ne indurrebbe il trafficking e la clusterizzazione a livello delle sinapsi ippocampali (Fig.9). La PI3K, oltre ad essere coinvolta nell'attivazione dei canali BK a livello ippocampale, sembrerebbe essere implicata anche nella regolazione dei fenomeni di LTP, LTD e modulazione dei recettori NMDA da parte della leptina; tuttavia, nei siti extra-ipotalamici le vie di segnalazione utilizzate dalla leptina sono multiple e comprendono la via delle MAPK e Src (Irving *et al.*, 2006).

Oltre agli effetti diretti sulle funzioni neuronali e sinaptiche, la leptina è capace di influenzare i neuroni alterando la loro struttura e plasticità. Evidenze iniziali di tale capacità derivano dall'osservazione che modelli animali deficienti di leptina mostrano cervelli più piccoli e le anomalie nello sviluppo cerebrale sono già evidenti in utero; la somministrazione di leptina a questi animali determina un aumento delle dimensioni del cervello nonché aumentati livelli di DNA e un'aumentata espressione di proteine (Ahima *et al.*, 1999; Udagawa *et al.*, 2006). Studi più recenti forniscono evidenze sulla capacità della leptina di esercitare effetti proliferativi sulla corteccia cerebrale fetale ed indicano che tale ormone è associato con il mantenimento e il differenziamento di cellule staminali neuronali e di progenitori della linea gliale e neuronale (Udagawa *et al.*, 2007). Osservazioni simili sono state fatte anche nell'uomo in cui è stato riportato che i livelli di leptina plasmatica sono correlati al volume di materia grigia in molte aree cerebrali e che la somministrazione di leptina ad individui carenti determina grossi

cambiamenti nella struttura cerebrale aumentando il volume di materia grigia e le capacità cognitive (Pannacciulli *et al.*, 2007; Matochik *et al.*, 2005; Paz-Filho *et al.*, 2008).

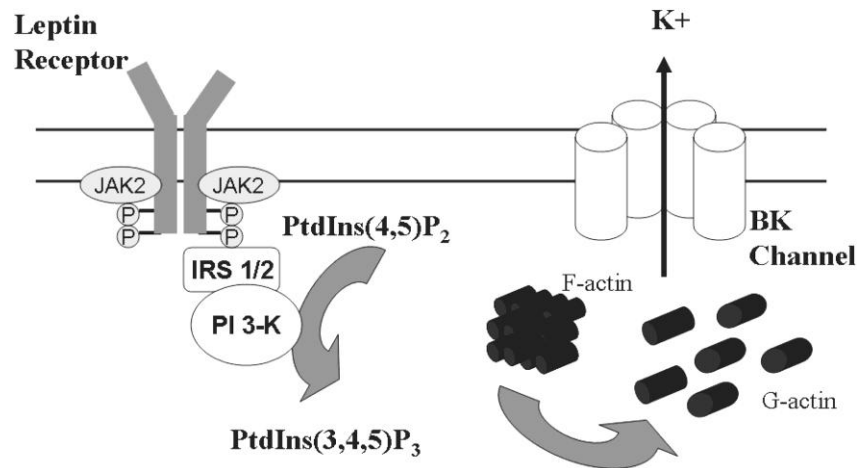


Fig.9. Ipotetica via di segnalazione che lega il recettore della leptina all'attivazione dei canali BK. Dopo il legame della leptina al recettore ObR, la PI3K attivata promuoverebbe la conversione di PIP2 in PIP3 che a sua volta indurrebbe la depolimerizzazione dei filamenti di actina e il successivo raggruppamento nonché attivazione dei canali BK a livello sinaptico (da O'Malley *et al.*, 2005).

Le aree interessate ai cambiamenti indotti dalla leptina nelle strutture neurali sono varie ed interessano ipotalamo, ippocampo, corteccia e cervelletto. In tali distretti è stato osservato che la leptina è capace di aumentare la densità delle proiezioni assonali, di promuovere l'outgrowth neuritico, di aumentare la motilità e la densità dei filopodi dendritici e di stimolare la morfogenesi del cono (Bouret *et al.*, 2004; O'Malley *et al.*, 2007; Valerio *et al.*, 2006). Tali evidenze, complessivamente, supportano un modello in cui la leptina agisce per influenzare la struttura e la plasticità neuronale e questi cambiamenti, a loro volta, potrebbero essere importanti nel regolare le funzioni cerebrali.

È stato da tempo dimostrato che la leptina esercita effetti benefici in numerose cellule non neuronali di cui è capace di inibire la morte apoptotica e promuovere la sopravvivenza e la proliferazione. L'esposizione alla leptina promuove infatti la sopravvivenza di osteoblasti, linfociti T, cellule follicolari dell'ovaio, cellule beta del pancreas, cellule stellate epatiche e varie cellule cancerose (Gordeladze *et al.*, 2002;

Mansour *et al.*, 2006; Almong *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2004; Hoda *et al.*, 2007). Inoltre è stato anche dimostrato attraverso vari studi condotti *in vitro* che la leptina, agendo sui neuroni, è capace di proteggerli da processi di neurodegenerazione e morte cellulare attraverso l'attivazione di segnali di neuroprotezione.

Neuroni in coltura richiedono la presenza di fattori neurotrofici o siero per la sopravvivenza e, la rimozione di tali elementi, determina morte neuronale. È stato riportato che la leptina riduce la morte di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y causata dalla rimozione di siero (Russo *et al.*, 2004) nonché di neuroni ippocampali privati di fattori neurotrofici (Guo *et al.*, 2008); i meccanismi antiapoptotici associati a tale azione della leptina, e dipendenti dall'attivazione delle vie intracellulari JAK-STAT, PI3-kinase e ERK, risultano essere associati alla sottoregolazione della caspasi-10 e della proteina TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand).

Numerosi studi descrivono inoltre la capacità della leptina di migliorare la sopravvivenza cellulare in modelli di ischemia cerebrale. I principali meccanismi di morte neuronale associati all'ischemia includono la necrosi indotta dalla deprivazione di ossigeno e glucosio, l'eccitotossicità mediata dal glutammato, lo stress ossidativo e i successivi meccanismi apoptotici (Lipton, 1999); è stato osservato che la leptina è capace di agire a livello di ciascuno di tali processi riducendo la morte ischemica. Gli effetti protettivi della leptina contro l'eccitotossicità glutammatergica, sono stati per la prima volta riportati in neuroni di topo da Dicou e collaboratori (2001) i quali osservarono che il pretrattamento di colture primarie con leptina per 20 ore preservava i neuroni da morte cellulare indotta da NMDA, e tale effetto poteva essere contrastato dall'aggiunta di un inibitore di JAK2 (AG490); il gruppo dimostrava inoltre che la co-iniezione intracerebrale di leptina in topi neonati, riduceva del 50% l'entità delle lesioni corticali e le cisti di materia bianca indotte da iniezioni di ibotenato, un analogo del glutammato. Questi effetti neuroprotettivi della leptina furono successivamente confermati da Guo e collaboratori (2008) i quali affermavano che il pretrattamento di 24 ore di neuroni ippocampali di ratto con leptina, aumentava la sopravvivenza neuronale dopo esposizione a NMDA; lo stesso gruppo riportava anche la capacità della leptina di migliorare la sopravvivenza neuronale dopo esposizione a ferro ferroso (Fe^{2+}) che causa stress ossidativo e perossidazione lipidica attraverso la produzione di radicali idrossili.

Gli effetti *in vitro* della leptina sono stati supportati da studi *in vivo* su modelli di ischemia cerebrale focale che dimostrano la sua capacità di ridurre il volume dell'infarto dopo

occlusione dell'arteria cerebrale mediana (middle cerebral artery occlusion – MCAO) quando somministrata intraperitonealmente anche fino a 90 minuti dopo l'inizio della riperfusione (Zhang et al., 2007) e di facilitare il recupero dopo MCAO. Gli effetti neuroprotettivi sembrano dipendere dalle vie di segnalazione associate ai fattori di crescita (STAT3, PI3K/Akt, ERK/MAPK), ma alcune evidenze dimostrano che la leptina sia implicata anche nella via di segnalazione NF- κ B/c-Rel come dimostrato dal fatto che la capacità della leptina di migliorare le funzioni cerebrali dopo MCAO è attenuata in topi deficitari di c-Rel e dal fatto che tale ormone è capace di stimolare gli effetti antiapoptotici di Bcl-xl in neuroni corticali attraverso un meccanismo c-Rel dipendente (Spano *et al.*, 2009; Valerio *et al.*, 2009). Ai meccanismi neuroprotettivi della leptina si affiancano anche le capacità di neurogenesi ed angiogenesi nel periodo successivo all'insulto ischemico; è stato infatti dimostrato che la leptina è capace di aumentare in maniera significativa il numero di cellule staminali neuronali e ridurre l'entità delle lesioni nell'aria corticale interessata dall'insulto (Avraham *et al.*, 2011).

La capacità neuroprotettive della leptina non si limitano a modelli di ischemia cerebrale, ma sono apprezzabili anche in altri modelli patologici. È stato infatti dimostrato che la leptina è capace di proteggere da eccitotossicità neuroni ippocampali di topi *ob^{-/-}* che sono inclini ad attacchi epilettici (Erbayat-Altay *et al.*, 2006); il modello utilizzato prevedeva l'applicazione di glutammato *in vitro* o l'iniezione intracerebrovascolare di kainato, entrambi capaci di attivare i recettori per il glutammato. Similmente pretrattamenti con leptina determinano una riduzione degli attacchi in animali in cui era stata indotta epilessia mediante iniezione intracerebrale di 4-aminopiridina, un inibitore dei canali del potassio voltaggio dipendenti, o iniezione intraperitoneale di pentilentetrazolo, un'antagonista non competitivo del GABA (Xu *et al.*, 2008). Di particolare interesse nello studio era la modalità utilizzata per rilasciare la leptina; l'ormone era iniettato a livello intranasale dimostrando che un rilascio non invasivo può produrre significative risposte fisiologiche a livello cerebrale incluso la neuroprotezione. Gli effetti neuroprotettivi della leptina sono stati valutati anche in altri modelli di malattie neurodegenerative quali la malattia di Parkinson e la malattia di Alzheimer. Nel primo caso, è stata valutata la capacità della leptina di revertire la perdita di neuroni dopaminergici sia *in vitro* che *in vivo*; la tossicità della 6-idrossidopamina era significativamente attenuata dalla leptina ed era ridotta la perdita di neuroni positivi per la tirosina idrossilasi, indotta da tale neurotossina. I meccanismi intracellulari di tale

neuroprotezione sono stati identificati nell'attivazione delle vie JAK/STAT, MEK/ERK e GBR2, con ERK1/2 e pCREB quali effettori vitali; inoltre l'attività delle caspasi 3 e 9, nonché di altri marcatori apoptotici era significativamente ridotta (Weng *et al.*, 2007). Per quanto riguarda la malattia di Alzheimer, è stato invece dimostrato che la leptina previene l'accumulo, e quindi l'aumento, della proteina A β nel cervello di topo agendo principalmente sull'attività delle secretasi supportando un ruolo protettivo della leptina nell'insorgenza della malattia (Niedowicz *et al.*, 2012); inoltre uno studio recente di Lieb e collaboratori (2009), mostrava che individui con bassi livelli plasmatici di leptina hanno un rischio maggiore di sviluppare la malattia di Alzheimer attraverso meccanismi ancora sconosciuti. Bassi livelli circolanti di leptina sono stati inoltre osservati anche in pazienti affetti da malattia di Huntington (Popovic *et al.*, 2004).

1.4 Scopo della ricerca

Il processo di eccitotossicità è un evento alla base della morte neuronale che caratterizza l'ischemia, l'epilessia e numerose altre malattie neurodegenerative; tuttavia, nei neuroni cerebrali, la modulazione dei canali del K^+ conferisce un certo grado di neuroprotezione. Il coinvolgimento dei canali BK nelle risposte neuronali adattative agli insulti ischemici è stato già precedentemente dimostrato, infatti il blocco farmacologico dei canali BK in fettine organotipiche ippocampali durante deprivazione di ossigeno e glucosio così come l'ablazione del gene *Slol*, codificante per la subunità α del canale, in un modello *in vivo* di ischemia cerebrale focale acuta, peggiorano il danno neurologico (Rundén-Pran *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2010). In modelli animali, è stato inoltre riportato che l'attivazione farmacologica dei canali BK mediante l'attivatore BMS-204352 determina una riduzione del danno neuronale in attacchi ischemici acuti (Gribkoff *et al.*, 2001) ed attenua l'edema cerebrale nonché la compromissione neurologica motoria dopo trauma cerebrale (Cheney *et al.*, 2001). Sebbene questo composto risultasse essere inefficace nel manifestare significativi effetti anti-ischemici nell'uomo, e la sua selettività non è assoluta (Schroder *et al.*, 2001; 2003), sembra plausibile che puntare alla modulazione dei canali BK come obiettivo per attenuare l'iperexcitabilità neuronale indotta dall'ischemia o dagli stati epilettici rappresenti una valida strategia neuroprotettiva.

Oltre a canali BK, un grande corpo di evidenze mostra che l'ormone leptina, non solo è responsabile della regolazione ipotalamica dell'assunzione di cibo e dell'omeostasi energetica, ma agendo a livello di siti extraipotalamici inibisce l'attività simil-epilettiforme in ippocampo e neocorteccia ed esercita effetti neuroprotettivi in diverse aree cerebrali. Sebbene le evidenze farmacologiche ottenute in alcuni di questi studi (Shanley *et al.*, 2002a e 2002b; O'Malley *et al.*, 2005; Gavello *et al.*, 2012) abbiano suggerito che i canali BK possano mediare almeno parte degli effetti anticonvulsivanti e neuroprotettivi, mancano evidenze dirette dell'attivazione dei canali BK da parte di tale adipochina durante i fenomeni neurodegenerativi, che farebbero della leptina un interessante potenziale candidato per il trattamento farmacologico di malattie neurodegenerative.

L'obiettivo dello studio è stato dunque quello di testare le capacità neuroprotettive della leptina in un modello di degenerazione neuronale indotta in neuroni corticali esposti ad un classico insulto eccitotossico, ovvero al composto N-Metil-D-Aspartato, agonista dei

recettori ionotropici per il glutammato di tipo NMDA e di testare la capacità della leptina di attivare i canali del K^+ di tipo BK valutando il loro potenziale coinvolgimento nel fenomeno di neuroprotezione mediata dalla leptina servendosi sia di farmaci modulatori dei canali BK, che di animali geneticamente modificati caratterizzati dalla delezione del gene *Slo1* codificante per la subunità α del canale. Ulteriore obiettivo è stato quello di caratterizzare i meccanismi molecolari alla base dell'attivazione di tali canali ionici indotta dalla leptina e della conseguente neuroprotezione da essi mediata.

MATERIALI E METODI

2.1 Animali

Gli animali impiegati per la preparazione delle colture neuronali utilizzate negli esperimenti di eccitotossicità e neuroprotezione, consistevano di embrioni di ratti Wistar oppure di topi wild-type, eterozigoti o knockout per il gene *Slo1* appartenenti al ceppo FVB/NJ. I ratti sono stati acquistati presso la compagnia Charles River (Calco, Italia) e allevati ed incrociati presso l'Istituto di ricerche genetiche Gaetano Salvatore, Biogem Scarl (Ariano Irpino, Italia), mentre i topi FVB/NJ ci sono stati concessi dal Prof. Aldrich (Università del Texas, Austin, USA) e sono stati allevati ed incrociati presso l'Università Friedrich-Schiller di Jena (Germania).

Gli animali sono stati mantenuti in condizioni standard di temperatura, umidità e illuminazione, nutriti con cibo ed acqua a volontà e maneggiati in accordo con le raccomandazioni degli Istituti Nazionali per la Salute italiano e tedesco e in accordo ad un protocollo sperimentale approvato dai comitati scientifici istituzionali dell'Università del Sannio di Benevento (Italia) e dell'Università Friedrich-Schiller di Jena. Sono stati fatti tutti gli sforzi possibili per minimizzare la sofferenza e il numero di animali utilizzati negli esperimenti.

Gli animali gravidi sono stati allevati per 15-17 giorni e l'età embrionale è stata calcolata considerando come giorno embrionale 0.5 il giorno in cui è stata apprezzata la presenza del tappo vaginale.

2.2 Dissezione e colture neuronali

Per minimizzare la sofferenza, gli animali sono stati anestetizzati mediante inalazione di dietiletere prima del sacrificio. Le madri gravide sono state sacrificate mediante decapitazione o dislocazione cervicale e sottoposte a chirurgia finalizzata alla rimozione degli embrioni dalla cavità uterina utilizzando strumenti chirurgici sterili; i feti ancora contenuti nel sacco embrionale sono stati quindi trasferiti in una piastra contenete mezzo di dissezione freddo. Ogni feto è stato rimosso dalla propria camera gestazionale e rapidamente decapitato mediante taglio netto a livello della regione cervicale. Le teste sono state raccolte e mantenute in mezzo di dissezione freddo; nel caso dei ratti le cortecce isolate dai cervelli sono state unite e si è proceduti con una sola piastratura,

mentre per quanto riguarda i topi le cortecce derivanti da ciascun embrione sono state trattate singolarmente e si è proceduti dunque con la piastratura di neuroni derivanti da singoli embrioni. In questo caso ogni embrione era stato precedentemente etichettato per la caratterizzazione genotipica al fine di discriminare animali omozigoti da individui eterozigoti.

Il mezzo di dissezione utilizzato consisteva di HBSS con aggiunta di 27 mM glucosio, 20 mM saccarosio, 4 mM bicarbonato di sodio, che era stato in precedenza preparato, opportunamente filtrato attraverso sistemi filtranti dotati di membrane porose dal diametro di 0.2 μm e conservato a +4°C.

La dissezione cerebrale è stata effettuata allo stereomicroscopio mediante l'utilizzo di due pinzette sterili. Due incisioni, una in direzione caudale e l'altra in direzione rostrale, hanno permesso di sollevare un lembo del cranio cartilagineo, ancora molle a questo stadio, e di rimuovere il cervello intatto che è stato trasferito in una nuova piastra per essere dissezionato.

Il tronco cerebrale è stato rimosso, i due emisferi cerebrali separati e da ciascun emisfero sono state allontanate le meningi. Si è proceduti quindi alla separazione delle cortecce cerebrali che sono state trasferite in una nuova piastra, sminuzzate mediante una pinzetta, raccolte in un tubo da centrifuga e centrifugate. Dopo la rimozione del sopranatante, al pellet è stato aggiunto mezzo di piastratura alla temperatura di 37°C, preparato fresco, e consistente in Eagle's MEM supplementato con 5% siero fetale bovino, 5% siero di cavallo, 2 mM L-glutammmina, 20 mM glucosio, 26 mM bicarbonato di sodio. Mediante una pipetta Pasteur di vetro il pellet è stato risospeso e meccanicamente tritato fino alla scomparsa degli agglomerati di cellule. Altro mezzo di piastratura è stato poi aggiunto per ottenere una diluizione di 2 emisferi cerebrali in 5 ml di mezzo, nel caso dei ratti, e 2 emisferi cerebrali in 4 ml di mezzo nel caso dei topi.

I neuroni sono stati seminati su piastre da 24 pozzetti, nel volume di 500 μl , o su piastre da 12 pozzetti, nel volume di 1 ml, queste ultime contenevano vetrini dal diametro di 18 mm. Sia le piastre che i vetrini erano stati precedentemente polilisinati mediante aggiunta di poli-D-lisina con peso molecolare > 300000, alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/ml}$. La polilisina, necessaria a favorire l'adesione delle cellule al substrato, è stata ricostituita in H₂O distillata sterile e tenuta incubata per tutta la notte alla temperatura di 37°C. Le piastre erano state successivamente lavate diverse volte con H₂O sterile, al fine

di rimuovere residui di polilisina altrimenti tossica per i neuroni, ed asciugate a 37°C prima della piastratura.

Per migliorare la polilisatura dei vetrini utilizzati, gli stessi in precedenza erano stati sottoposti ad appropriati passaggi di pulitura in acido nitrico capace di degradare tutto il materiale organico presente su di essi; quindi sono stati ripetutamente lavati con H₂O milliQ e stufati alla temperatura di 200°C per 4 ore.

I neuroni piastrati sono stati incubati in un'atmosfera saturata per il 5% di CO₂ alla temperatura di 37°C. Dopo tre/quattro giorni in coltura sono stati trattati per 24 ore con l'agente citotossico citosina arabinofuranoside (Ara-C) alla concentrazione di 10 µM il quale, essendo un analogo dei nucleotidi, è capace di interferire con la replicazione e la riparazione del DNA di cellule non neuronali quali astrociti, oligodendrociti, microglia e cellule endoteliali presenti nelle colture (Dichter, 1978) o cellule residue delle meningi, impedendone ulteriori divisioni. Al termine del trattamento il mezzo è stato parzialmente rimosso e sostituito con mezzo di crescita costituito da Eagle's MEM supplementato da 10 % siero di cavallo, 2 mM L-glutamina, 20 mM glucosio, 26 mM bicarbonato, il quale è stato poi parzialmente rinfrescato due volte alla settimana per tutto il tempo in cui i neuroni sono stati mantenuti in coltura (12-16 DIV). La presenza del siero di cavallo favoriva l'outgrowth neuritico portando alla formazione di numerose connessioni sinaptiche.

2.3 Genotipizzazione di embrioni di topo

La necessità di genotipizzare i topi *Slo1* derivava dal fatto che gli animali knockout hanno difficoltà nell'accoppiamento in quanto l'assenza del canale causa disfunzione erettile nei maschi. Sono stati pertanto incrociati animali eterozigoti e la generazione di animali privi del gene *Slo1* avveniva secondo il classico rapporto mendeliano: 25% knockout, 25% wild-type, 50% eterozigoti (Meredith *et al.*, 2004).

Le code degli embrioni prelevati da madri gravide, sono state dunque tagliate e digerite per tutta la notte a 55°C in 750 µl di buffer SNET (20 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 1% SDS, 0.4 M NaCl) con aggiunta di 15 µl di proteinasi K. Il giorno successivo il DNA genomico è stato estratto con fenolo/cloroformio in rapporto 1:1 e precipitato in etanolo. 500 ng di DNA genomico sono stati utilizzati per le reazioni di PCR in cui sono stati impiegati buffer 1X con MgCl₂, 0.25 mM dNTPs, 0.5 µM di ogni primer, 2.5U Taq

polimerasi, 2% DMSO per un volume di reazione di 50 μ l. I primers utilizzati per amplificare il prodotto dell'allele knockout ($Slo1^{-/-}$) a circa 800 bp erano: NEO 5' (5' ATA GCC TGA AGA ACG AGA TCA GC 3') e RA 14025 3' (5' CCT CAA GAA GGG GAC TCT AAA C 3'); il prodotto dell'allele wild-type ($Slo1^{+/+}$) era invece amplificato a 332 bp mediante i primers: Exon1 5'-3 (5' TTC ATC ATC TTG CTC TGG CGG ACG 3') e WT 3'-2 (5' CCA TAG TCA CCA ATA GCC C 3'). Le condizioni di amplificazione utilizzate nella reazione di PCR sono state le seguenti:

94°C	2'	
94°C	30s	
53°C	30s	X5
72°C	2'	
94°C	30s	
50°C	30s	X30
72°C	2'	
72°C	5'	
4°C	∞	

I prodotti di amplificazione sono stati risolti su gel ad una concentrazione di agarosio pari a 1.5% (Fig.10).

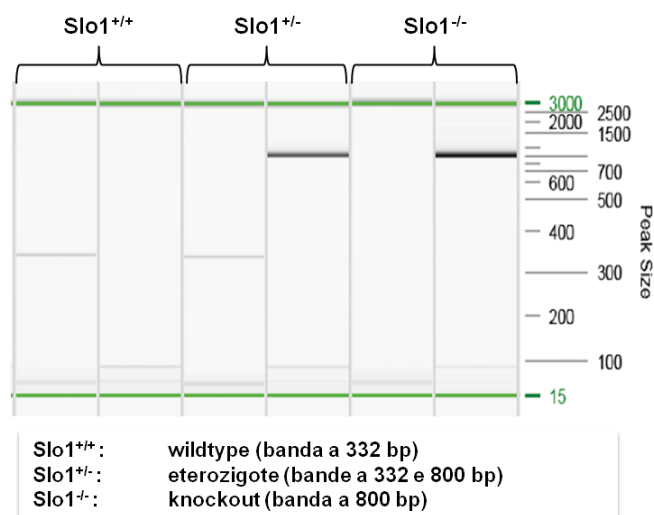


Fig.10. Immagine di un gel rappresentativo. I primers utilizzati amplificavano il prodotto dell'allele wild-type a ~332 bp e il prodotto dell'allele knockout a ~800 bp. Nell'eterozigote si osservavano la presenza di entrambi i prodotti di amplificazione.

2.4 Trattamenti cellulari

L'espressione *in vitro* di tutte le sottoclassi di recettori per il glutammato, segue delle tempistiche diverse: i recettori di tipo AMPA e di tipo kainato sono espressi precocemente, mentre i recettori NMDA subiscono cambiamenti nell'espressione delle subunità che li costituiscono durante la maturazione della coltura neuronale e, dalla differente composizione, dipende la loro capacità di rispondere all'agonista N-Metil-D-Aspartato. È stato osservato che le risposte a tale farmaco sono presenti dopo circa due settimane *in vitro* mentre le risposte ad agonisti di altri recettori per il glutammato avvengono a tempi più brevi.

Tutti i trattamenti sono stati dunque effettuati dopo 12 DIV rigorosamente in assenza di siero onde evitare effetti neuroprotettivi aspecifici legati alla presenza di fattori neurotrofici o della stessa leptina contenuta al suo interno. I neuroni sono stati lavati più volte con una soluzione salina di controllo contenente HEPES (HEPES control salt solution – HCSS) costituita da 120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 15 mM glucosio, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM NaOH, pH 7.4 e sono stati trattati utilizzando la stessa soluzione.

L'esposizione a glutammato oppure a NMDA e glicina, tutti sciolti in acqua, è stata fatta a temperatura ambiente ed è durata 15 minuti; il trattamento con leptina ricombinante umana, capace di legare con la stessa affinità i recettori della leptina umano, di ratto e di topo (Mistrik *et al.*, 2004) è stato simultaneo oppure è avvenuto 15 minuti, 2 ore o 6 ore prima dell'insulto tossico. La leptina era stata precedentemente ricostituita in una soluzione 20 mM Tris-HCl pH 8.0, aliquotata, congelata e diluita alla concentrazione necessaria prima dell'uso. Negli esperimenti che prevedevano l'utilizzo di farmaci bloccanti o attivatori dei canali al K⁺ di tipo BK (Paxillina, Iberiotossina e NS1619, tutti sciolti in DMSO che era presente in una quantità inferiore al 1% dove utilizzato alla concentrazione massima), questi sono stati aggiunti 15 minuti prima della leptina e mantenuti in incubazione per tutta la durata dell'esperimento. Al termine di tutti i trattamenti le colture sono state lavate diverse volte con HCSS e con un altro mezzo (media stock – MS) composto da MEM supplementato con 20 mM glucosio e 26 mM bicarbonato, nel quale i neuroni sono stati mantenuti per le successive 24 ore.

La scelta di utilizzare colture neuronali piuttosto che linee cellulari per effettuare gli esperimenti di neuroprotezione è stata dettata in primo luogo dall'elevata sensibilità dei

neuroni di rispondere ad insulti eccitotossici e dalla veridicità delle osservazioni; in più, l'impiego di neuroni isolati e non organizzati in tessuto, grazie tra l'altro alla possibilità di eliminare le cellule gliali non neuronali, permette di studiare la sola risposta neuronale prevenendo eventuali effetti protettivi o azioni di potenziamento che si potrebbero verificare nell'intera popolazione cellulare. Nonostante i vantaggi, tuttavia, l'utilizzo di una coltura cellulare neuronale presenta anche alcuni limiti: l'assenza di cellule gliali, che normalmente fanno da guaina alle sinapsi, causa significative modifiche nella loro formazione e, inoltre, la perdita dell'organizzazione del tessuto non permette di riprodurre a pieno quanto normalmente accade *in vivo*.

2.5 Valutazione della sopravvivenza neuronale mediante saggio MTT e colorazione con ioduro di propidio

I mitocondri sono primariamente coinvolti nei fenomeni di morte cellulare apoptotica che si verifica in seguito a stimoli recettoriali che attraverso svariati meccanismi causano caduta del potenziale di membrana mitocondriale che non è più garantito dalla catena respiratoria mitocondriale che produce energia gestita come gradiente elettrochimico. La caduta di potenziale causa un'alterazione della permeabilità della membrana mitocondriale esterna con conseguente rilascio di citocromo-c nel citosol e innesco delle vie apoptotiche con attivazione delle caspasi. La valutazione dell'attività mitocondriale rappresenta dunque un valido parametro per stimare la vitalità cellulare.

La vitalità dei neuroni è stata valutata 24 ore dopo ciascun esperimento di tossicità mediante l'utilizzo del saggio colorimetrico MTT che, servendosi di un agente ossidante cromogeno, permette di stimare il numero di mitocondri attivi e quindi, indirettamente, il numero di cellule vitali sull'intera popolazione esaminata (Aras *et al.*, 2008). Il sistema sfrutta la capacità delle deidrogenasi mitocondriali di scindere l'anello tetrazolico del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) in un composto cromogeno azotato detto formazano, che forma dei cristalli insolubili nell'ambiente intracellulare a cui le membrane risultano sostanzialmente impermeabili. I cristalli prodotti vengono quindi solubilizzati mediante un solvente e la quantità di formazano prodotta è misurata spettrofotometricamente.

I neuroni sono stati incubati con 5 mg/ml di MTT al buio, per 1 ora, in un'atmosfera saturata per il 5% di CO₂. Al termine dell'incubazione i sali di formazano sono stati

solubilizzati mediante isopropanolo acidificato (0.04 M HCl in isopropanolo assoluto) e l'assorbanza di ciascun campione è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 570 nm con sottrazione del background a 650 nm. I dati ottenuti sono stati espressi come percentuale dell'assorbanza misurata in cellule non trattate.

Il danno cellulare neuronale è stato valutato anche mediante marcatura con il fluorocromo ioduro di propidio (PI) capace di intercalarsi in maniera aspecifica nella doppia elica di DNA. Tale composto, molto stabile e altamente polare, è incapace di attraversare membrane cellulari integre e quindi penetra solo cellule che hanno la membrana danneggiata; questa caratteristica morfologica è tipica delle cellule necrotiche e per tale motivo lo ioduro di propidio è utilizzato come marcatore della morte per necrosi (Aras *et al.*, 2008). Anche in questo caso la valutazione della morte neuronale è stata effettuata dopo 24 ore dalla fine dei trattamenti: i neuroni sono stati incubati al buio con 5 µg/ml di PI per 1h a 37°C, in un'atmosfera saturata per il 5% di CO₂. Al termine dell'incubazione quando sono stati esposti ad una luce blu-verde (eccitazione 510-560 nm) le cellule morte emettevano una fluorescenza rosso brillante (emissione 590 nm) indice del legame del colorante al DNA. La captazione del PI è stata registrata mediante l'impiego di una telecamera digitale della Media Cybernetics (Silver Spring, MD, USA) montata su un microscopio a fluorescenza modello Eclipse 400 della Nikon Instruments (Firenze, Italia). Tre immagini digitali a contrasto di fase di tre campi microscopici selezionati in maniera random sono state utilizzate per effettuare l'analisi dei dati con il software Image J della NIH (Bethesda, MD, USA). I dati sono stati rappresentati come percentuale di cellule positive alla captazione del PI calcolata rispetto a cellule seminate in piastre sorelle e trattate per 24 ore con 300 µM NMDA che induceva la morte di quasi tutta la popolazione neuronale trattata.

2.6 Colture di linee cellulari e trasfezioni transienti

L'impiego di linee cellulari rappresenta uno strumento piuttosto vantaggioso per studiare l'attività di canali ionici, in quanto sono più semplici da maneggiare; inoltre, l'overespressione in sistemi eterologhi di una proteina d'interesse permette di studiare in maniera selettiva l'attività della sola proteina minimizzando le possibili interferenze. In aggiunta, i neuroni sono cellule eccitabili per eccellenza caratterizzate dalla presenza di

una miriade di canali ionici, per cui isolare le correnti d'interesse comporta nella maggior parte dei casi l'uso di bloccanti selettivi, spesso tossine, che andando ad agire su altri canali modificano in qualche modo lo stato di eccitabilità neuronale, cosa che potrebbe determinare una variazione nelle caratteristiche delle risposte.

Anche in questo caso, tuttavia, le linee cellulari presentano dei limiti: hanno il grande svantaggio di essere colture omogenee con cellule organizzate in un unico strato e derivanti da un solo clone cellulare immortalizzato, ma soprattutto si tratta di cellule che sono sostanzialmente alterate. Tali caratteristiche delle linee cellulari, fanno tra l'altro sì che le osservazioni fatte non siano quindi totalmente reali o interamente riproducibili nella stessa tipologia cellulare derivante da un clone diverso; quest'aspetto solleva numerose riflessioni su quanto sia rilevante e consistente un risultato ottenuto da esperimenti effettuati su una coltura primaria.

La linea cellulare Ea.hy926, derivante dalla fusione di cellule endoteliali della vena ombelicale umana e di cellule epiteliali alveolari basali di carcinoma umano, è caratteristica per l'espressione di correnti native derivanti dall'attivazione di canali BK costituiti dalla sola subunità α (Papassotiriou *et al.*, 2000); nella linea non è stato ritrovato nessuno mRNA codificante per subunità β .

Le cellule sono state cresciute in DMEM ad elevato contenuto di glucosio con l'aggiunta di 2 mM glutammina e 10% siero fetale bovino, amplificate fino al passaggio trenta e successivamente sostituite con più giovani.

Le cellule della linea HEK 293T, sono cellule immortalizzate derivanti da rene embrionale umano (human embryonic kidney – HEK) contenenti il grande antigene T di SV40 (Simian Vacuolating Virus 40 T Ag – SV40 large T antigen), un protooncogene derivato dal poliomavirus SV40 che permette la replicazione episomale di plasmidi trasfettati contenenti l'origine di replicazione di SV40. Questa caratteristica fa sì che in tali cellule si possano amplificare plasmidi trasfettati ed estendere l'espressione temporale del prodotto genico d'interesse da essi codificato.

Le cellule sono state cresciute in DMEM/Ham's F12 con l'aggiunta di 2 mM L-glutammina e 10% siero fetale bovino, e sono state mantenute in coltura fino al venticinquesimo passaggio. Dopo la piastratura sono state transientemente trasfettate con plasmidi codificanti per proteine di interesse e plasmidi codificanti per l'antigene CD8 utilizzando il kit di trasfezione Rotifect. La cotrasfezione insieme ai plasmidi CD8, che rappresentavano il 20% del DNA totale, è stata resa necessaria per identificare le

cellule trasfettate attraverso il sistema Dynabeads che sfrutta la capacità di biglie magnetiche di legare, in qualità di antigeni, i recettori CD8 espressi sulla superficie delle cellule trasfettate che verosimilmente esprimono anche la proteina d'interesse.

I plasmidi utilizzati nella trasfezione codificavano per la forma wild-type umana della subunità α del canale al potassio di tipo BK (o per una forma mutante completamente insensibile al Ca^{2+}), e per il recettore di topo della leptina.

La sequenza genica dei costrutti codificanti per i canali BK era in accordo alla sequenza del mRNA (*accession number*: [U11058](#)) di 5829 bp codificante per la subunità del canale di 1113 aminoacidi (*accession number*: [AAB65837](#)).

L'intera sequenza genica è stata clonata all'interno del vettore pCIneo il quale, prima del clonaggio, per favorire la successiva mutagenesi, era stato ulteriormente modificato attraverso l'introduzione di una mutazione a livello del residuo 1173 (C1173T) che portava alla formazione di un sito PmeI, precedentemente silente. Il plasmide è stato inoltre tagliato con gli enzimi di restrizione XhoI e SalI e nuovamente ligato per generare un costrutto mancante di 29 nucleotidi, incluso un sito di restrizione per l'enzima EcoRI, a livello della regione 3'UTR.

Le mutazioni introdotte nella sequenza genica clonata, mediante un metodo basato su PCR, consistevano nella sostituzione di acido glutammico con alanina a livello del residuo 535 (E535A) e nella delezione di due residui di acido aspartico in posizione 894-895 (Δ 894-895). Le mutazioni erano entrambe localizzate a livello C-terminale rispettivamente nei domini regolatori per la conduttanza al K^+ RCK1 e RCK2. Per confermare la presenza delle mutazioni i costrutti sono stati sottoposti ad amplificazione per PCR e a sequenziamento con il metodo di Sanger.

Per quanto riguarda invece il costrutto codificante per il recettore di topo della leptina, che ci è stato cortesemente inviato dal gruppo del prof. Nisoli (Università degli Studi di Milano), è stato clonato nel vettore pcDNA3, a valle del promotore T7.

2.7 Registrazioni elettrofisiologiche

La caratterizzazione funzionale dei canali ionici, sia nativi che in sistemi di espressione eterologhi, rappresenta un importante strumento alla base della descrizione di fenomeni biologici e delle modalità attraverso cui i canali ionici influenzano processi cellulari. Lo studio delle relazioni struttura-funzione, nonché la caratterizzazione delle regioni di

canali ionici importanti per il gating, la selettività ionica o le interazioni tra subunità, è possibile grazie all'utilizzo della tecnica del patch clamp che permette, nella modalità di registrazione whole-cell, di registrare correnti di membrana generate in seguito alla conduzione di ioni da parte di una singola classe di canali ionici distribuiti su tutta la cellula. Le correnti generate, nell'ordine dei pico-ampere, possono essere rilevate da un amplificatore differenziale altamente sensibile attraverso un microelettrodo di vetro, contenente una soluzione elettrolitica, mentre un secondo elettrodo è immerso in una soluzione che bagna le cellule ed è utilizzato per settare il livello zero delle correnti. Il microelettrodo contenente la soluzione viene fatto aderire alla superficie di una singola cellula. Per favorire l'adesione tra l'elettrodo e la membrana cellulare, viene esercitata una pressione negativa, che porta alla formazione di un sigillo con un'alta resistenza nell'ordine dei giga-ohm che isola elettricamente quest'area di membrana. Nella modalità di registrazione whole-cell, dopo la formazione del sigillo, la membrana viene rotta da un'intensa e breve suzione per cui il contenuto della pipetta entra in continuità con il citoplasma e ciò fa sì che il flusso ionico attraverso i canali presenti sull'intera superficie cellulare sia rilevato dall'elettrodo d'argento cloridrato collegato all'amplificatore. Per prevenire alterazioni del potenziale di membrana, attraverso un meccanismo a feedback negativo, dall'amplificatore viene generata una corrente di compensazione che assomiglia al flusso di corrente che attraversa la membrana; il potenziale di membrana della cellula è dunque misurato e confrontato con il potenziale di comando e, se esistono differenze tra i due, la corrente di compensazione iniettata sarà registrata e ciò permette di trarre conclusioni circa la conduttanza della membrana (Fig.11). Nelle registrazioni whole-cell è possibile scegliere tra due diverse configurazioni, il voltage-clamp o il current-clamp: nel primo caso il voltaggio è mantenuto costante e la corrente è registrata, mentre nel secondo caso accade il contrario.

Le registrazioni elettrofisiologiche sono state effettuate sia su canali nativi in cellule Ea.hy926, che in un sistema di espressione eterologo sfruttando la linea HEK 293T. Nel primo caso le correnti sono state direttamente registrate il giorno successivo alla piastratura, mentre nel secondo caso le registrazioni sono state fatte 24-48 ore dopo la trasfezione di vettori plasmidici. In entrambi i casi è stata utilizzata la configurazione whole-cell e le misurazioni sono state eseguite utilizzando un amplificatore di patch-clamp EP9 con un transistor a basso rumore della compagnia HEKA Elektronik (Verbandsgemeinde Lambrecht, Germania) collegato ad un computer per l'acquisizione

e la digitalizzazione dei dati. Il software utilizzato per controllare l'amplificatore e analizzare i dati era PatchMaster della HEKA Elektronik.

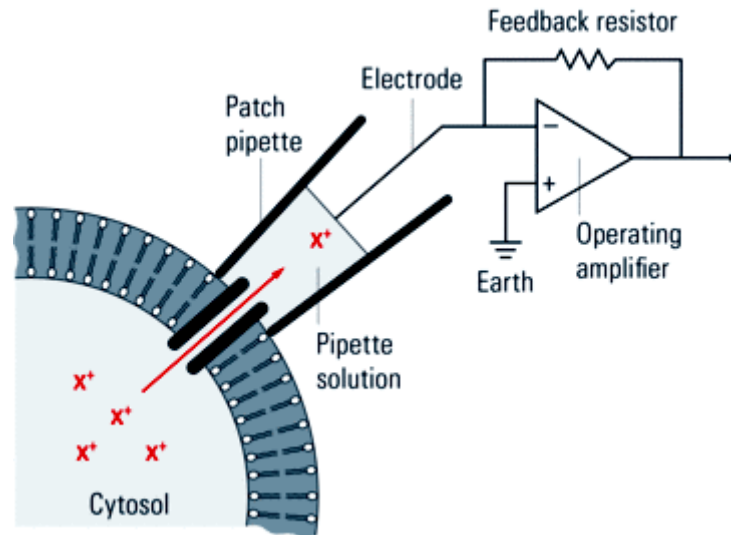


Fig.11. Principio generale delle registrazioni di patch-clamp. Una pipetta di vetro contenente la soluzione elettrolitica è sigillata in maniera stretta con la membrana cellulare così da isolare elettricamente una porzione della membrana. Le correnti che fluiscono attraverso i canali localizzati in tale area passano attraverso la pipette e in tal modo possono essere registrate da un elettrodo connesso ad un amplificatore differenziale altamente sensibile (da Leica Science Lab – Leica Microsystems; the Patch Clamp Technique).

Le misurazioni sono state fatte a temperatura ambiente (20-24°C), sul piano fisso di un microscopio invertito della Zeiss, modello Axiovert 100 (Jena, Germania), utilizzando un obiettivo con ingrandimento 20x. Il microscopio era piazzato su un tavolo anti-vibrazioni per evitare movimenti tra il microelettrodo e la membrana che potessero essere fatali per la compromissione del sigillo, e il microelettrodo era mosso con precisione mediante un micromanipolatore.

Le pipette che formavano i microelettrodi sono state fabbricate mediante riscaldamento e tiratura di capillari di vetro borosilicato su un puller orizzontale della Sutter Instrument Company (Novato, CA, USA). Le punte delle pipette sono state immerse in cera liquida e successivamente pulite al calore mediante una microforgia; questa operazione era necessaria per avere un'alta resistenza nel momento in cui si andava a formare il sigillo a livello della membrana cellulare. La resistenza delle pipette oscillava tra i 2-3 MΩ

quando queste erano riempite con una soluzione intracellulare contenente (in mM): 100 KF, 40 KCl, 10 HEPES, pH 7.4 aggiustato con KOH. La presenza di KF nella soluzione determinava un certo grado di precipitazione del calcio e studi precedenti riportavano che in presenza di 300 mM KF la quantità di Ca^{2+} misurata era <3 nM (Oberhauser *et al.*, 1988); nel nostro caso, considerando un certo grado di contaminazione da parte del Ca^{2+} presente nell'acqua e una minima quota di Ca^{2+} rilasciata dai depositi, la concentrazione di Ca^{2+} libero è stata assunta essere inferiore a 100 nM. Solitamente le correnti BK vengono rilevate utilizzando soluzioni intracellulari tamponate con il chelante del Ca^{2+} EGTA che causa un'attivazione più debole dei canali; l'utilizzo di KF, in alternativa ad EGTA, è tuttavia molto più vantaggioso in quanto in questo modo possono essere osservati segnali che attivano i canali BK attraverso il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari o l'ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare che potrebbero essere invece mascherati dall'impiego di un chelante.

Le soluzioni intracellulari senza Ca^{2+} , utilizzate per studiare il potenziale coinvolgimento di questo ione nell'attivazione dei canali BK indotta dalla leptina, contenevano (in mM): 140 KCl, 10 EGTA (oppure 10 BAPTA), 10 HEPES, pH 7.4 aggiustato con KOH.

La soluzione extracellulare in cui erano immerse le cellule durante la registrazione effettuate in presenza di Ca^{2+} extracellulare conteneva (in mM): 146 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES, pH 7.4 con NaOH.

Le correnti BK sono state indotte in seguito all'applicazione di un protocollo di registrazione che comprendeva diversi steps di depolarizzazione a diversi valori di potenziale (Fig.12). Il potenziale di membrana è stato mantenuto ad un valore di -80 mV all'inizio della registrazione e nell'intervallo compreso tra un'acquisizione e l'altra che aveva una durata di circa 4 secondi. Durante le acquisizioni, ognuna della durata di circa 1 secondo, il potenziale di membrana è stato mantenuto a -60 mV per 90 millisecondi (msec) e poi depolarizzato a 200 mV da una rampa di voltaggio (1.73 mV/msec); al termine della rampa, il potenziale è stato riportato a -60 mV per 40 msec e successivamente la membrana è stata nuovamente depolarizzata da impulsi a potenziali di membrana crescenti con un intervallo di 25 msec a -60 mV tra ogni impulso. I potenziali di depolarizzazione utilizzati sono stati: +20 mV (100 msec), +40 mV (90 msec), +60 mV (80 msec), +80 mV (70 msec), +100 mV (60 msec), +120 mV (50 msec), +200 mV (20 msec). La durata degli impulsi era gradualmente più breve a potenziali più depolarizzati e ciò era necessario a ridurre lo stress cellulare.

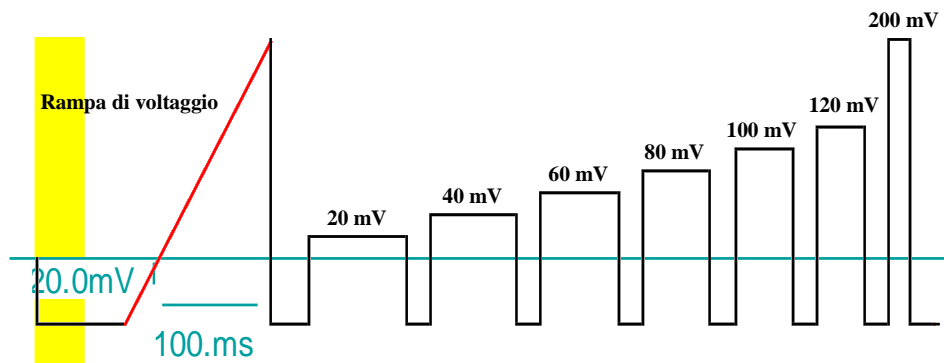


Fig.12. Protocollo di registrazione utilizzato per suscitare le correnti BK. Il protocollo è caratterizzato dalla presenza di una rampa di voltaggio che va da -60 a +200 mV e dalla successione di impulsi rettangolari a diversi valori di potenziale (+20, +40, +60, +80, +100, +120, +200 mV)

La leptina è stata diluita alla concentrazione desiderata utilizzando la soluzione extracellulare ed applicata localmente, mediante una pipetta soffiante, nelle strette vicinanze della cellula registrata solo dopo che le correnti BK avevano raggiunto valori stabili, ovvero cambiavano meno del 5%. Le correnti BK sono state registrate per tutta la durata dell'esposizione alla leptina che è stata incubata per un tempo di almeno 15 minuti. Ogni esperimento è stato eseguito almeno tre volte utilizzando differenti lotti di cellule.

I dati sono stati analizzati offline utilizzando IgorPro della WaveMetrics (Tigard, OR, USA), FitMaster della HEKA Elektronik, e il modulo Clampfit del software pClamp versione 10.2 della Molecular Device (Union City, CA, USA). In ogni esperimento gli effetti della leptina sull'incremento massimo delle correnti BK sono stati quantificati calcolando il rapporto tra i valori di corrente BK registrati dopo e prima dell'esposizione alla leptina al potenziale di +40 mV nelle cellule HEK 293T trasfettate con il canale hSlo1 wild-type e al potenziale di +60 mV nelle cellule Ea.hy926. Lo spostamento verso sinistra della soglia di attivazione delle correnti BK (ΔmV) indotto dalla leptina è stato calcolato come differenza tra il voltaggio a cui le correnti indotte dalla leptina avevano la stessa ampiezza delle correnti di controllo misurate a +40 mV (nel caso delle HEK 293T o a +60 mV nel caso delle cellule Ea.hy926), e il valore di voltaggio +40 mV (o +60 mV).

Nel caso dei canali mutanti espressi in cellule HEK 293T, a causa di uno spostamento verso destra di circa 20 mV nella voltaggio-dipendenza di attivazione dei canali BK, la stessa analisi è stata eseguita a +60 mV piuttosto che a +40 mV. Lo spostamento verso destra della voltaggio-dipendenza di attivazione dei canali BK mutanti era stato descritto per la prima volta da Schreiber e collaboratori (1997), che studiavano nel topo gli effetti della mutazione $\Delta 897-899$. In presenza di una concentrazione di Ca^{2+} pari a 4 μM , il gruppo osservava uno spostamento del voltaggio >50 mV che tuttavia svaniva in presenza di basse concentrazioni di Ca^{2+} . La mutazione studiata dal gruppo corrisponde alla mutazione umana $\Delta 894-896$, e la mutazione da noi presa in considerazione ($\Delta 894-895$) non differisce significativamente da quest'ultima; pertanto, considerate le diverse concentrazioni di Ca^{2+} utilizzate, lo spostamento del voltaggio da noi osservato è pari a 20 mV.

2.8 Studi di microfluorimetria

La microfluorimetria su singola cellula è la metodica di elezione utilizzata per seguire in tempo reale le variazioni delle $[\text{Ca}^{2+}]_i$ che insorgono in una cellula spontaneamente o in risposta a specifiche stimolazioni. La tecnica impiega indicatori del Ca^{2+} , ovvero molecole fluorescenti che, in seguito al legame dello ione Ca^{2+} , modificano le loro proprietà emettendo luce fluorescente quando eccitate a particolari lunghezze d'onda. La capacità chelante di tali indicatori si basa sulla presenza nella molecola del chelante BAPTA che ha alta selettività per il Ca^{2+} . I gruppi carbossilici delle sonde utilizzate sono solitamente mascherati da gruppi estere con lo scopo di rendere la molecola lipofila e facilitarne l'ingresso nella cellula; una volta che l'indicatore è entrato, grazie alla presenza di esterasi cellulari, i gruppi carbossilici sono resi disponibili e l'indicatore è capace di legare il Ca^{2+} . Il legame dello ione determina sia un aumento della resa quantica della fluorescenza che uno spostamento della lunghezza d'onda di emissione/eccitazione.

Gli esperimenti di Ca^{2+} -imaging sono stati condotti sia sui neuroni che sulle due linee cellulari utilizzate (cellule HEK 293T e cellule Ea.hy296) che a tal proposito sono stati piastrati su vetrini dal diametro di 18 mm che, solo nel caso dei neuroni, erano ricoperti di poli-D-lisina. Le cellule sono state caricate al buio con 1-[2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxyl]-2-(21-amino-51-methylphenoxy)-ethane-N,N,N1,N1-tetraacetic acid penta-acetoxymethyl ester (fura-2 AM) in una soluzione contenente (in

mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Glucosio, pH 7.4 aggiustato con NaOH e tenute incubate per 20-30 minuti a 37°C in un'atmosfera saturata per il 5% di CO₂. Al termine del periodo di incubazione le cellule sono state lavate per un paio di volte con la stessa soluzione e il vetrino è stato introdotto nella camera di registrazione sul piano di un microscopio invertito Axiovert 100 – Carl Zeiss, fornito di un obiettivo Neofluar ad ingrandimento 20x. Le cellule sono state mantenute nella stessa soluzione impiegata in precedenza per tutta la durata dell'esperimento e la leptina è stata aggiunta per mezzo di una pipetta dopo almeno 5 minuti dall'inizio della registrazione. I cambiamenti nell'intensità della fluorescenza sono stati misurati grazie alla combinazione di un monocromatore a scansione e di un fotomoltiplicatore Polychrome II della Till Photonics (Gräfelfing, Germania). Le immagini sono state acquisite con una telecamera raffreddata CCD della IMAGO (Kelheim, Germania) e digitalizzate utilizzando il software TILLvisION della Till Photonics. L'intensità della fluorescenza emessa dal Fura-2 è stata misurata ad intervalli di 1 secondo a due diverse lunghezze d'onda di eccitazione (340 e 380 nm) e, in un campo senza cellule, la fluorescenza di fondo è stata sottratta prima di calcolare per ogni cellula il rapporto di fluorescenza 340/380 nm. I valori di fluorescenza sono stati utilizzati per calcolare la [Ca²⁺]_i utilizzando una curva di calibrazione, come descritto da Grynkiewicz e collaboratori (1985).

2.10 Statistica

Tutti i dati ottenuti sono stati rappresentati come media \pm SEM (Standard Error of the Mean), e i confronti tra gruppi sono stati fatti utilizzando un test-*t* di Student accoppiato o non. La significatività tra gruppi sperimentali multipli è stata fatta mediante analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita da test di Newman-Keuls. Un valore *p* (*p*-value) <0.05, indicato nelle figure con un asterisco, è stato considerato come statisticamente significativo.

Tutti i calcoli sono stati fatti utilizzando il software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.11 Materiale utilizzato

Eagle's MEM, glutammina, HBSS, siero fetale bovino (FBS), siero di cavallo (HS), DynaBeads anti CD8 (Life Technologies, Milano, Italia)

Piastre per colture cellulari, sistemi filtranti con membrane porose, cuvette Kartell monouso per spettrofotometria (Thermo Fisher Scientific, Illkirch Cedex, Francia)

Dietilere, etanolo, isopropanolo, acido cloridrico, kit di trasfezione Rotifect (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germania)

Poli-D-lisina, citosina arabinofuranoside (Ara-C), N-Metil-D-Aspartato (NMDA), glicina, bicarbonato di sodio, glucosio, saccarosio, acido nitrico, acido borico, cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di magnesio, HEPES, cloruro di calcio, fluoruro di potassio, idrossido di sodio, idrossido di potassio, EGTA, BAPTA, paxillina, iberiotossina, NS1619, bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTI), ioduro di propidio (PI), fura-2 acetossimetilestere (Fura-2 AM), dimetilsolfossido (DMSO), pinzette Dumont e forbici per dissezione (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Leptina ricombinante umana (R&D System Inc, Minneapolis, MN, USA)

DMEM Ham's-F12, DMEM, PBS, tripsina (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)

Vetrini da microscopia, pipette di vetro Pasteur (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Germania)

Capillari di vetro borosilicato per patch-clamp (Kimble Glass, Vineland, NJ, USA)

Kit per estrazione DNA (Analytik Jena AG, Jena, Germania)

Vettore pCIneo, enzimi di restrizione, ligasi e materiale per amplificazione e separazione del DNA, kit per maxi-prep (Promega GmbH, Mannheim, Germania)

Primers per amplificazione genica (Primm srl, Milano, Italia)

RISULTATI

3.1 Tossicità di N-Metil-D-Aspartato e di glutammato su neuroni corticali di ratto

La morte neuronale eccitotossica è principalmente mediata dall'attivazione dei recettori NMDA per cui tale agonista, piuttosto che il glutammato capace di attivare le tre classi recettoriali AMPA, NMDA e kainato, è stato scelto per mettere a punto un modello di danno neuronale in cui la morte dipendesse dall'attivazione della sola classe di recettori NMDA e non da altri tipi recettoriali.

Il trattamento di neuroni corticali di ratto (E16, 12DIV) con concentrazioni relativamente basse di N-Metil-D-Aspartato (10, 30, 50 μM ; +10 μM glicina) per 24 ore, induceva una riduzione dose-dipendente della vitalità neuronale: la concentrazione più bassa utilizzata non induceva morte significativa se confrontata al controllo non trattato, mentre le % di sopravvivenza osservate ai dosaggi di 30 e 50 μM erano rispettivamente $52.7 \pm 2.7\%$ e $45.7 \pm 1.3\%$. L'effetto tossico osservato 24 ore dopo l'insulto, mediante saggio MTT, era completamente revertito dalla coesposizione ad un agonista non competitivo del recettore NMDA, MK801 (10 μM ; $p > 0.05$). L'esposizione a ionomicina (10 μM) è stata utilizzata come controllo di morte (Fig.13).

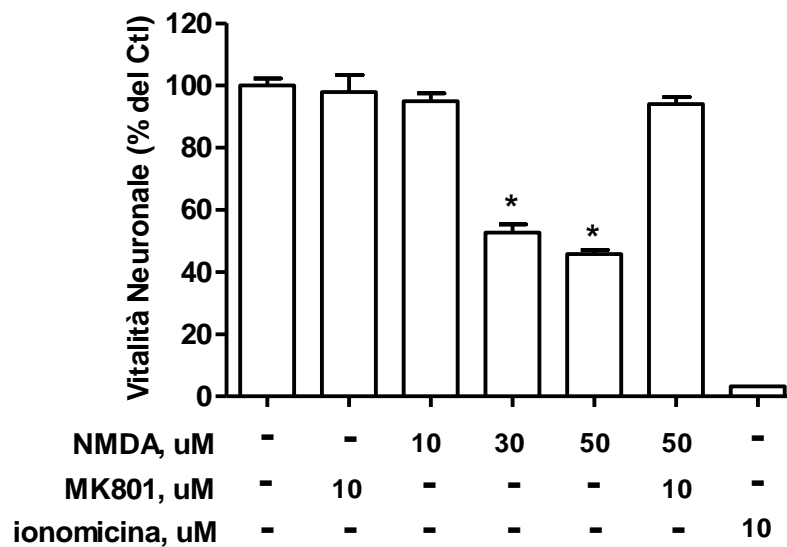


Fig.13. Effetti di NMDA su neuroni corticali di ratto esposti dopo 12 DIV all'insulto tossico per 24 ore. La vitalità neuronale, stimata mediante saggio MTT, risultava essere significativamente ridotta alle concentrazioni più alte di NMDA utilizzate ($n=3$, $p<0.05$ *versus* controllo), ma completamente revertita dalla coesposizione con l'antagonista non competitivo MK-801. La ionomicina è stata utilizzata per indurre la condizione di full-kill.

La somministrazione di concentrazioni leggermente più alte di NMDA (30-300 μ M; +10 μ M glicina) per tempi molto più brevi (15 minuti oppure 30 minuti), causava allo stesso modo una riduzione della vitalità neuronale che era sia concentrazione che tempo-dipendente: una morte superiore al 50% della popolazione totale era osservata anche a concentrazioni relativamente basse (30 μ M) di NMDA quando i neuroni erano trattati per 30 minuti, mentre una mortalità più blanda si osservava nei neuroni trattati per 15 minuti; in quest'ultimo caso la vitalità misurata alle concentrazioni di 30, 100 e 300 μ M era rispettivamente di $66.9\pm 3.2\%$, $59.6\pm 3.1\%$ e $54.8\pm 3.4\%$. Anche in tali condizioni sperimentali, la coesposizione all'antagonista MK801 (10 μ M) induceva una reversione totale della morte (Fig.14; $p>0.05$ *versus* controllo trattato solo con glicina) ad entrambi i tempi di somministrazione, a dimostrazione del fatto che il danno osservato era completamente dipendente dall'attivazione selettiva di questa particolare sottoclasse recettoriale e non era associato ad altri fenomeni.

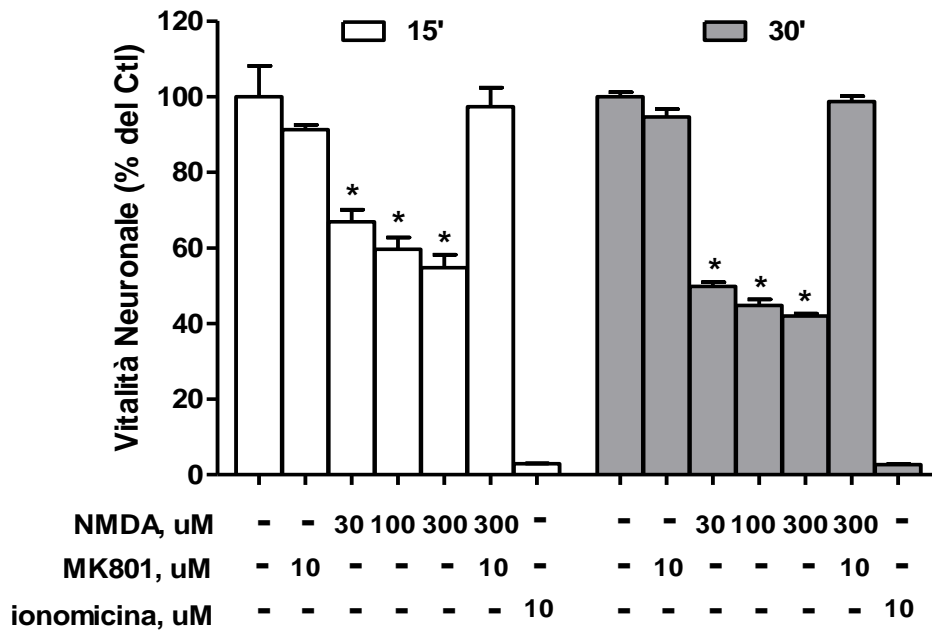


Fig.14. Sopravvivenza di neuroni corticali di ratto misurata mediante saggio MTT 24 ore dopo un'esposizione di 15 min o 30 min a differenti concentrazioni (30-300 uM) di NMDA in assenza o in presenza dell'antagonista MK-801 (10 uM). L'esposizione a 10 uM di ionomicina è stata utilizzata come controllo di mortalità. (n=3; p<0.05 *versus* rispettivi controlli)

Per avere infine una conferma della sovrapposibilità del danno indotto da NMDA e il danno indotto dall'agonista endogeno glutammato, i neuroni sono stati trattati per 15 minuti con concentrazioni crescenti di glutammato (30, 100, 300 μM) (Fig.15). La morte neuronale osservata manteneva lo stesso profilo percentuale di quella indotta dalle stesse concentrazioni di NMDA utilizzate per lo stesso tempo, senza differenze significative (p>0.05), dimostrando che i recettori di tipo NMDA sono la principale classe recettoriale che media la morte neuronale indotta dal glutammato.

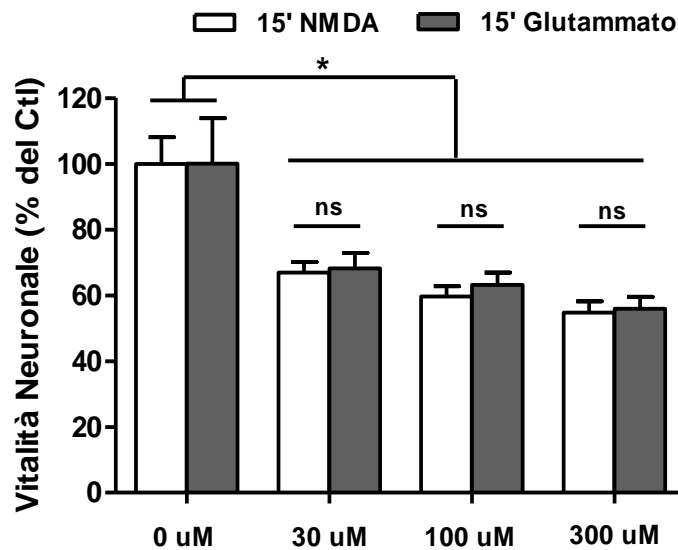


Fig.15. Confronto tra la mortalità neuronale osservata dopo esposizione a NMDA o a glutammato per 15 min. La vitalità misurata dopo 24 ore dalla fine dell'insulto tossico mediante saggio MTT non rivelava differenze significative tra i due stimoli utilizzati indicando che è l'attivazione dei recettori NMDA principalmente responsabile del danno neuronale eccitotossico (n=3; p<0.05 *versus* rispettivi controlli).

Il danno neuronale indotto da NMDA presenta sia una componente necrotica, che caratterizza i primi istanti successivi all'esposizione all'agonista del glutammato, che una componente apoptotica che insorge più tardivamente, fino a molte ore dopo la rimozione dello stimolo; inoltre concentrazioni basse di NMDA sono responsabili della morte apoptotica mentre dosaggi più elevati inducono una morte cellulare di tipo necrotico (Bonfoco *et al.*, 1995).

Per trovare dunque un compromesso che permettesse di includere entrambe le componenti (necrotica e apoptotica) della morte cellulare da eccitotossicità, il trattamento dalla durata di 15 minuti con la concentrazione 100 μ M di NMDA, che causava circa il 40% di riduzione della vitalità neuronale, è stato utilizzato per effettuare tutti gli esperimenti successivi di neuroprotezione con l'ormone leptina.

3.2 La leptina esercita neuroprotezione contro gli effetti eccitotossici di NMDA in neuroni corticali di ratto

Per testare gli effetti neuroprotettivi della leptina, i neuroni sono stati trattati con differenti concentrazioni dell'ormone umano (10, 30 e 100 ng/ml) (Fig.16 A) a cui i neuroni di ratto erano capaci di rispondere grazie all'elevata omologia di sequenza (83%) esistente tra la leptina delle due specie. La somministrazione simultanea della leptina con NMDA 100 μ M, non determinava nessuna riduzione significativa della morte neuronale; similmente, la somministrazione della leptina 15 minuti o 6 ore prima dell'insulto tossico induceva solo un piccolo ma non significativo miglioramento della vitalità ($p > 0.05$ *versus* vitalità neuronale misurata in neuroni corticali trattati solo con NMDA). Il pretrattamento con leptina per 2 ore, invece, preveniva significativamente il danno neuronale indotto da NMDA in maniera dose-dipendente: 10 ng/ml di leptina offrivano il minore effetto neuroprotettivo (la % di neuroprotezione osservata era 30.41 ± 13.58 ; $n=9$; $p < 0.05$ *versus* NMDA), mentre la maggiore neuroprotezione era osservata ad entrambe le concentrazioni più alte utilizzate, 30 ng/ml e 100 ng/ml; le percentuali di neuroprotezione osservate erano rispettivamente $51.5 \pm 14.2\%$ e $52.4 \pm 10.2\%$ ($p < 0.05$ *versus* NMDA). Nei neuroni non trattati con NMDA la leptina, da sola, quando incubata fino a sei ore, non aveva nessun effetto sulla vitalità cellulare (Fig.16 B; $p > 0.05$).

La concentrazione più bassa di leptina capace di esercitare il massimo effetto neuroprotettivo quando preincubata per 2 ore era 30 ng/ml; questa concentrazione è stata scelta per valutare il potenziale neuroprotettivo dell'ormone attraverso un metodo indipendente basato sulla capacità delle cellule vitali di escludere, e dunque non incorporare al proprio interno, il colorante fluorescente propidio di ioduro che è invece capace di attraversare la membrana di cellule morte o morenti e di intercalarsi al DNA marcando i nuclei cellulari. L'esposizione dei neuroni corticali a 100 μ M di NMDA per 15 minuti determinava una positività alla colorazione con ioduro di propidio (PI) in circa il 50% dei neuroni dopo 24 ore dalla fine dell'insulto tossico; il pretrattamento con la leptina per 2 ore, invece, riduceva significativamente la morte neuronale, valutata dopo 24 ore, e circa il 20% della popolazione mostrava positività alla colorazione ($p < 0.05$ *versus* % neuroni positivi al PI esposti solo ad NMDA). Anche in questa

tipologia di esperimenti, in assenza di stimoli neurotossici, la leptina non modificava in alcun modo la vitalità neuronale (Fig.17 A-B).

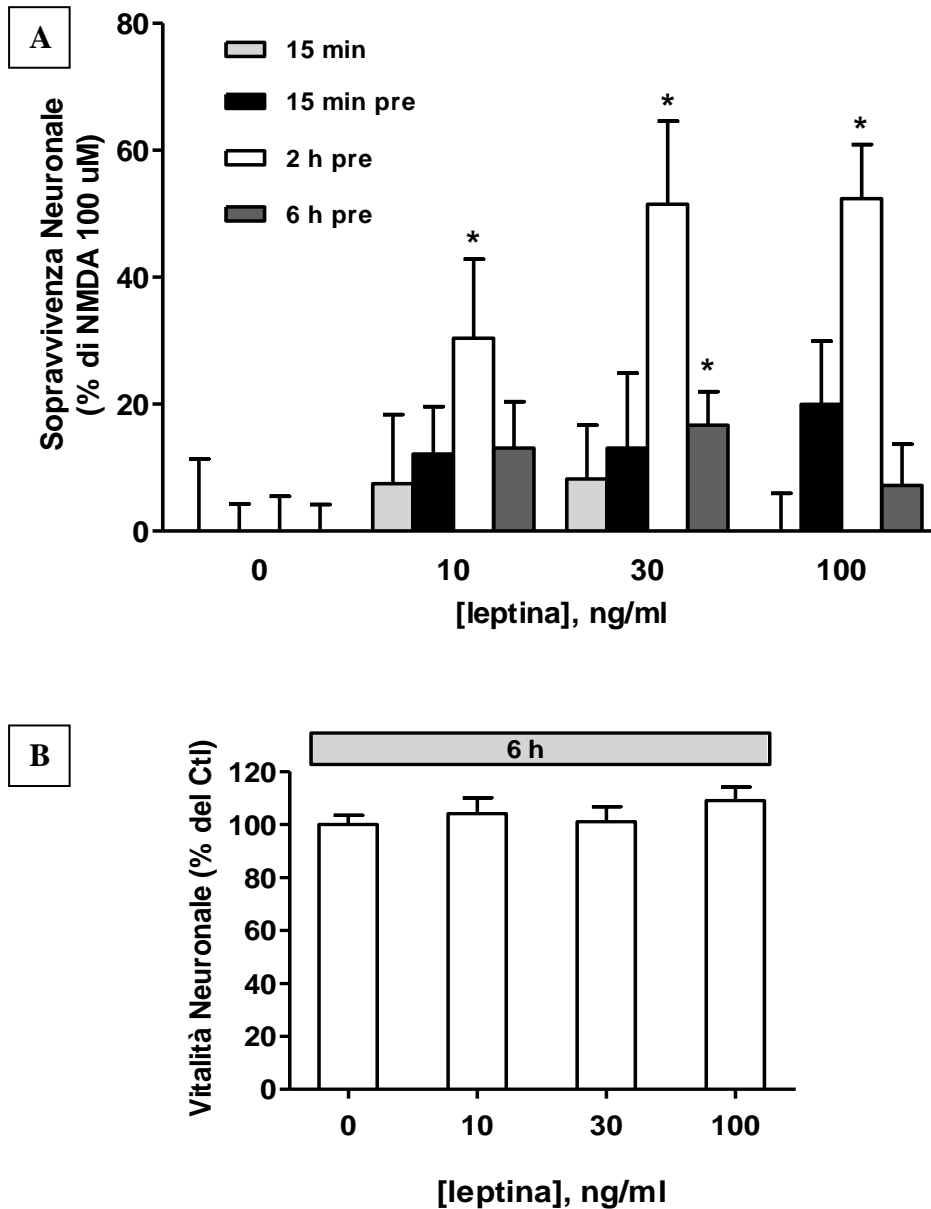


Fig.16. (A) Effetti della leptina utilizzata a diversi dosaggi (10, 30, 100 ng/ml) e per diversi tempi di incubazione sulla neurotossicità indotta da 100 uM NMDA in neuroni corticali di ratto. I dati sono espressi come percentuale della neuroprotezione indotta dalla leptina rispetto ai controlli (100 uM NMDA, nessun trattamento con leptina). (B) Effetti della leptina sulla vitalità neuronale di neuroni corticali di ratto trattati per 6h con l'ormone. Ogni barra rappresenta la media \pm S.E.M. di almeno tre saggi MTT indipendenti. Gli asterischi indicano valori statisticamente differenti dai rispettivi controlli ($p < 0.05$).

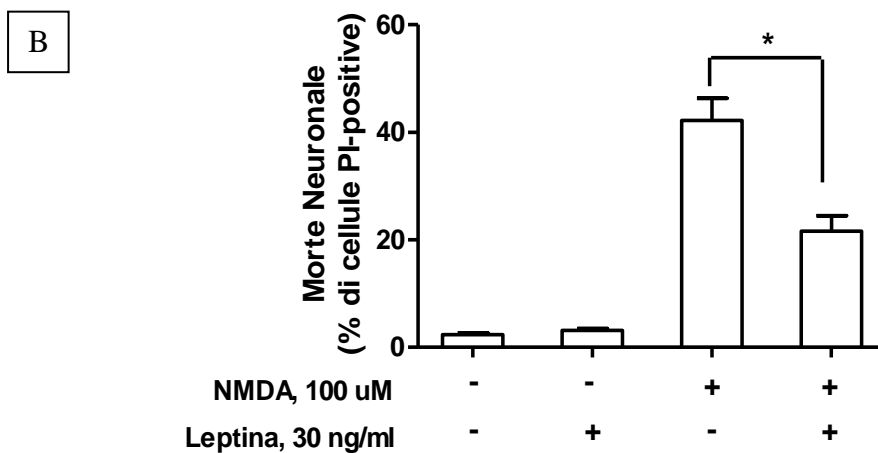
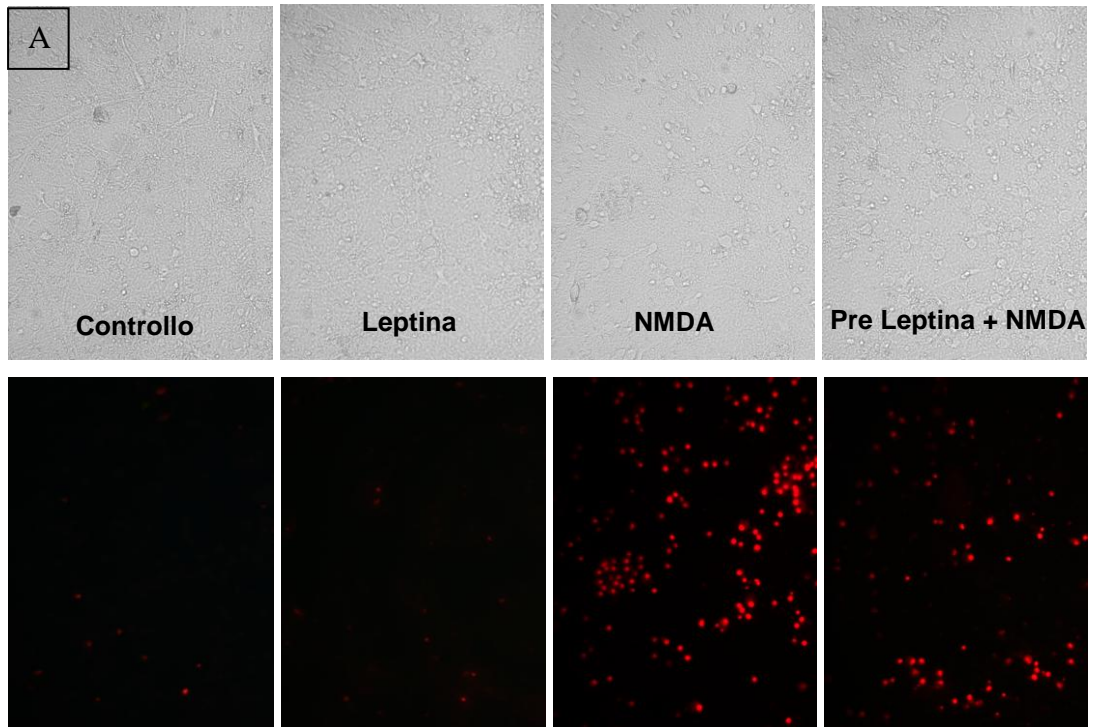


Fig.17. (A) Immagini di colture neuronali rappresentative (E16, 12DIV) dopo 24h di esposizione alle seguenti condizioni sperimentali: finto trattamento (controllo), leptina (30 ng/ml per 2h), NMDA (100 uM per 15 min), leptina (30 ng/ml per 2h) seguita da NMDA (100 uM per 15 min). *Sinistra*: campo chiaro; *destra*: corrispondente fluorescenza del PI. Tutte le microfotografie sono state scattate ad ingrandimento 20x. (B) Quantificazione della fluorescenza dello ioduro di propidio. Ogni set di dati rappresenta la media \pm S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti. Gli asterischi indicano valori statisticamente diversi dai rispettivi controlli ($p < 0.05$).

3.3 Il blocco farmacologico dei canali BK, nei neuroni corticali di ratto, previene gli effetti neuroprotettivi indotti dalla leptina dopo esposizione a NMDA

Per esaminare il ruolo dei canali BK nella neuroprotezione indotta dalla leptina, sono stati testati gli effetti di modulatori di tali canali ionici nel modello *in vitro* di tossicità utilizzato e consistente in colture di neuroni corticali di ratto esposte a NMDA.

I bloccanti dei canali BK utilizzati erano rappresentati dalle due tossine Paxillina e Iberiotossina, ben note per la loro capacità di legare selettivamente e con alta affinità questa classe di canali del K⁺ (Kaczorowski *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1996). La prima, un metabolita tremorigenico prodotto dal fungo *Penicillium paxilli*, è un composto alcaloide a nucleo indolico capace di attraversare la membrana cellulare e bloccare i canali del K⁺ di tipo BK dal versante intracellulare legando i moduli S5-P loop-S6; la seconda è invece una tossina peptidica di 37 aminoacidi sintetizzata dallo scorpione rosso *Buthus tamulus*, capace di legare i canali dal versante extracellulare e di inibire sia le correnti che la probabilità e il tempo di apertura dei canali.

Sia la Paxillina (0.01-1 µM) che l'Iberiotossina (1-100 nM) quando somministrate prima della leptina, completamente e in maniera concentrazione-dipendente, annullavano la neuroprotezione indotta dalla leptina (Fig.18 A-B) con valori di EC₅₀ che erano rispettivamente 37.6±10.1 nM e 5.4±2.4 nM (Fig.19); in entrambi i casi una concentrazione di tossina pari a 100 nM era capace di prevenire completamente gli effetti neuroprotettivi esercitati dalla leptina sui neuroni corticali esposti a 100 µM NMDA (p>005).

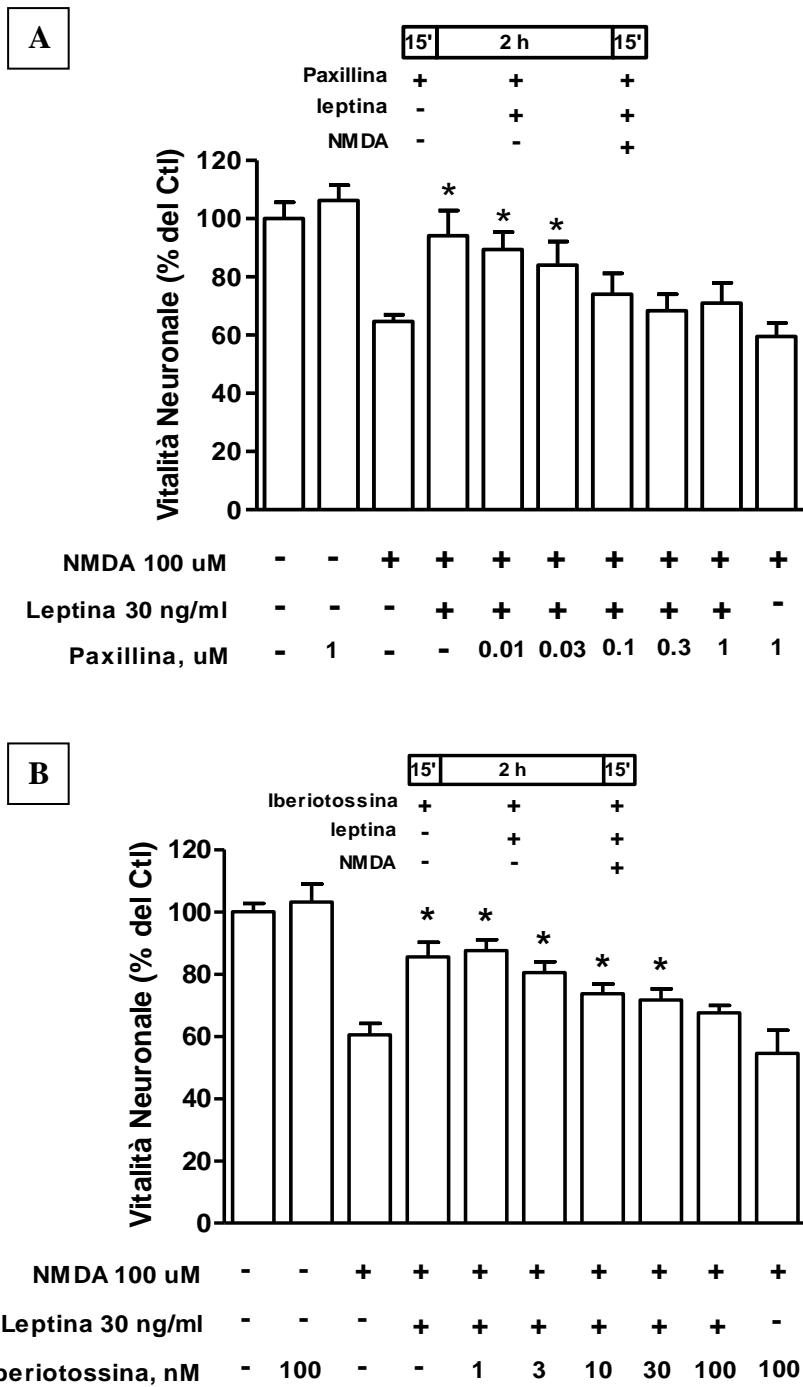


Fig.18. Effetti dei bloccanti dei canali BK paxillina (0.01-1 uM) (A) e iberiotossina (1-100 nM) (B) sulla neuroprotezione indotta dalla leptina di neuroni corticali di ratto esposti a 100 uM NMDA. Il riquadro in ciascun pannello indica il protocollo di esposizione ai farmaci. La vitalità neuronale è stata misurata 24h dopo l'insulto tossico mediante saggio MTT. I dati sono espressi come percentuale della vitalità di neuroni di controllo non trattati. Ogni punto sperimentale è dato dalla media \pm S.E.M. di cinque esperimenti indipendenti. Gli asterischi indicano valori statisticamente differenti dai rispettivi controlli ($p < 0.05$).

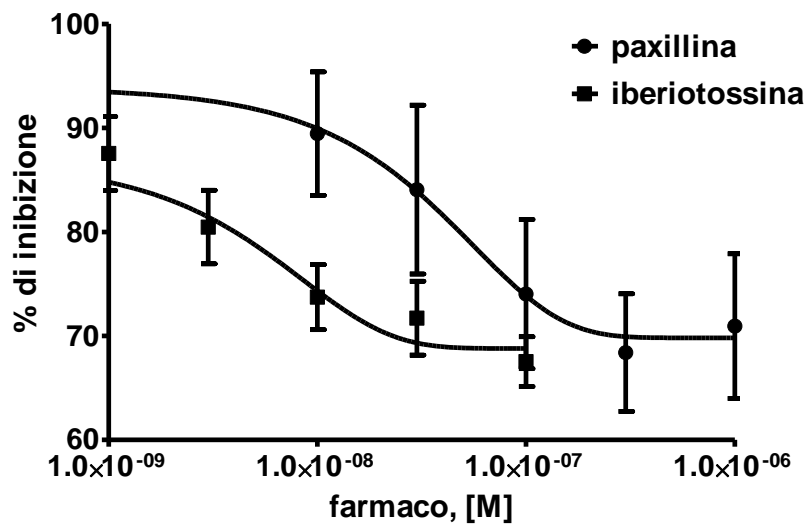


Fig.19. Curve concentrazione-effetto dei due bloccanti dei canali BK paxillina e iberiotoxina incubati 15 minuti prima dell'esposizione a leptina (2h, 30 ng/ml) e a NMDA (15 min, 100 μ M). Sull'asse delle ordinate è riportata la risposta ai farmaci in termini di percentuale di inibizione dei canali BK; dalle curve sono state calcolati i valori di EC_{50} di entrambi i bloccanti. Ciascun punto sperimentale rappresenta la media \pm S.E.M. di cinque esperimenti indipendenti.

Per testare l'assunto che l'attivazione dei canali BK fosse un evento fondamentale nei fenomeni di neuroprotezione contro il danno eccitotossico da NMDA, i neuroni sono stati trattati con l'attivatore NS1619 per 2 ore. Mentre l'esposizione a 100 μ M di NS1619 risultava essere tossica per la coltura, il trattamento con concentrazioni nell'intervallo 1-30 μ M induceva una protezione concentrazione-dipendente contro il danno eccitotossico da NMDA, e 30 μ M risultava essere la concentrazione associata al livello più alto di neuroprotezione osservato che era pari a circa il 15% [Fig.20].

Insieme questi risultati suggerivano che l'attivazione dei canali BK è un determinante molecolare cruciale per gli effetti neuroprotettivi della leptina.

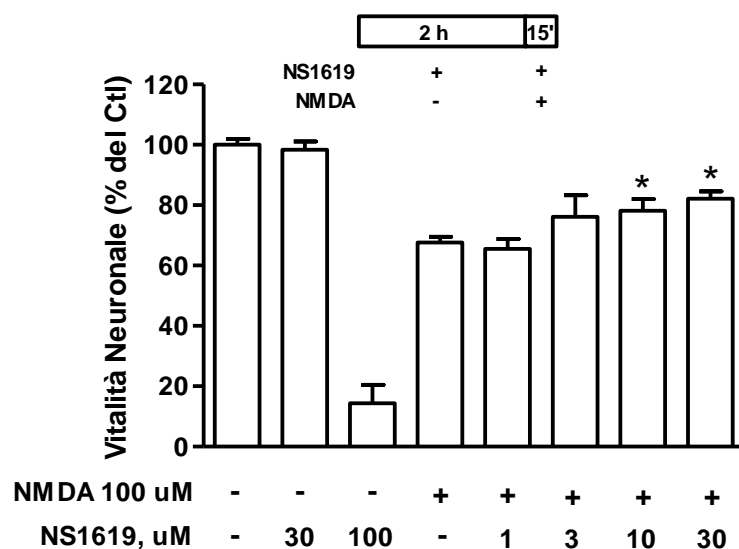


Fig.20. Effetto concentrazione dipendente del presunto attivatore dei canali BK NS1619 (1-100 uM), sulla neuroprotezione indotta dalla leptina di neuroni corticali di ratto esposti a NMDA. L'inserito in alto indica il protocollo di esposizione ai farmaci. La vitalità neuronale è stata misurata 24h dopo l'insulto tossico con NMDA, mediante saggio MTT. I dati sono espressi come percentuale della vitalità di neuroni di controllo non trattati. Ogni punto sperimentale è dato dalla media \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. Gli asterischi indicano valori statisticamente differenti dai rispettivi controlli ($p < 0.05$).

3.4 La leptina è inefficace nella neuroprotezione contro l'eccitotossicità indotta da NMDA in colture neuronali di topi $Slo1^{+/-}$ e $Slo1^{-/-}$

Per confermare ulteriormente il ruolo dei canali BK nella neuroprotezione mediata dalla leptina, gli effetti di tale adipochina sono stati studiati in neuroni corticali derivanti da topi eterozigoti oppure omozigoti per una delezione all'interno del gene *Slo1* codificante per la subunità α che forma il poro dei canali BK.

Ciascun embrione di topo è stato caratterizzato genotipicamente al fine di discriminare gli animali wild-type ($Slo1^{+/+}$) da quelli knockout eterozigoti ($Slo1^{+/-}$) e dai knockout omozigoti ($Slo1^{-/-}$). Le colture di neuroni corticali derivanti dunque da singoli cervelli sono state esposte a 100 μ M NMDA per 15 minuti con o senza preincubazione di leptina. La vitalità neuronale, valutata mediante saggio MTT, era simile tra i neuroni corticali di animali $Slo1^{+/+}$, $Slo1^{+/-}$ e $Slo1^{-/-}$ quando esposti solo a NMDA ($p > 0.05$),

tuttavia, mentre nelle colture di animali Slo1^{+/+}, 2 ore di pretrattamento con 30 ng/ml di leptina aumentavano significativamente la vitalità neuronale dopo esposizione a NMDA da 59 a 87%, la stessa concentrazione di leptina era invece inefficace in neuroni derivanti da animali Slo1^{+/-} e Slo1^{-/-} ($p > 0.05$ *versus* valori misurati in neuroni esposti solo a NMDA; Fig.21). Questi dati confermano che i canali BK sono mediatori cruciali della neuroprotezione indotta dalla leptina; inoltre, il fatto che una riduzione del 50% del numero dei canali BK funzionali (come predetto in animali eterozigoti Slo1^{+/-}) annulli completamente gli effetti della leptina, suggerisce che per la protezione neuronale mediata da tale ormone è richiesto un forte controllo della densità neuronale dei canali del K⁺ di tipo BK.

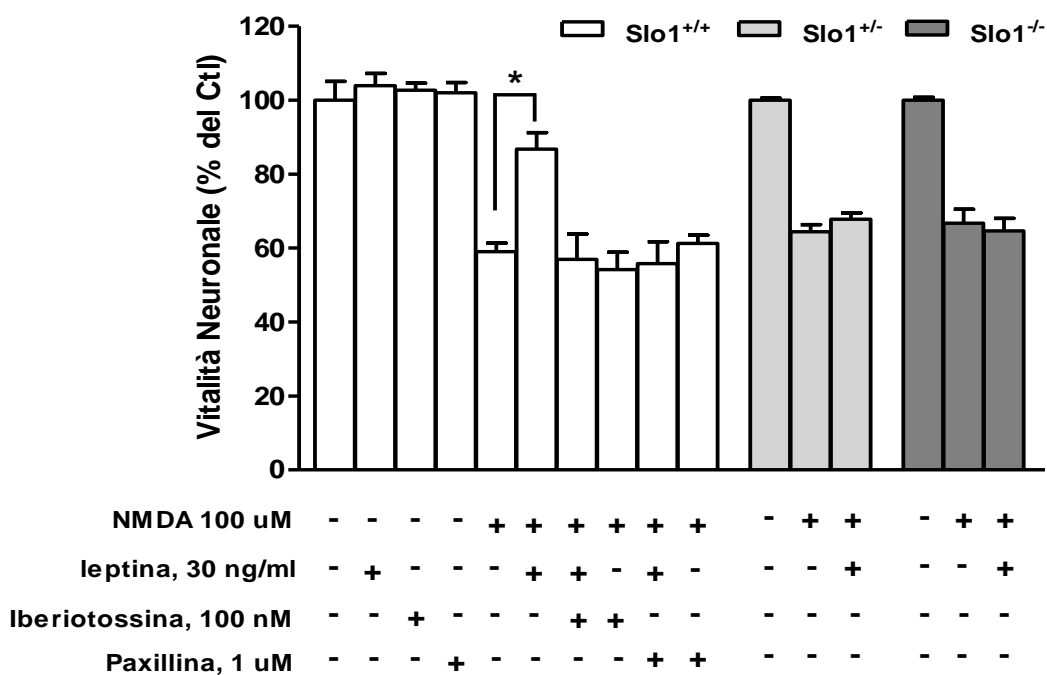


Fig.21. Vitalità di neuroni corticali di topo isolati da embrioni wild-type (Slo1^{+/+}, colonne bianca), eterozigoti (Slo1^{+/-}, colonne grigio chiaro), knockout (Slo1^{-/-}, colonne grigio scuro). I neuroni sono stati incubati con 30 ng/ml di leptina per 2h prima di un trattamento di 15 min con 100 μ M NMDA. La vitalità neuronale è stata misurata mediante saggio MTT 24h dopo l'insulto; i dati sono espressi come percentuali dei controlli (corrispondenti a neuroni non trattati di ciascun gruppo sperimentale) e rappresentano le medie \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. L'asterisco denota un valore statisticamente differente dal rispettivo controllo (NMDA da solo; $p < 0.05$).

3.5 La leptina induce l'attivazione delle correnti BK

Per testare la capacità della leptina di attivare le correnti BK, sono stati utilizzati sia un sistema di espressione eterologo rappresentato da cellule HEK 293T, che esprimevano transientemente il cDNA codificante per la subunità α del canale BK umano (hSlo1), che la linea di cellule endoteliali Ea.hy926 che esprime endogenamente canali BK privi della subunità β e caratterizzati anche in questo caso dalla presenza della subunità α . L'utilizzo di linee cellulari piuttosto che di neuroni è stato preferito considerata la loro elevata maneggevolezza; nel caso delle linee non solo le condizioni sperimentali potevano essere facilmente manipolate, ma la loro pronta disponibilità permetteva di eludere i tempi di gestazione degli animali e di maturazione delle colture neuronali, nonché di evitare il sacrificio di un notevole numero di cavie; inoltre, l'assenza nelle linee cellulari scelte della subunità β del canale BK, presente invece nei neuroni, permetteva di soffermarsi esclusivamente sugli effetti della leptina a livello della subunità α dalla cui alterazione dipendeva il mancato effetto neuroprotettivo esercitato dall'adipochina.

Per gli esperimenti di elettrofisiologia è stata utilizzata una concentrazione di leptina (160 ng/ml equivalenti a 10 nM) vicina alla concentrazione più alta impiegata negli esperimenti condotti sui neuroni corticali che induceva neuroprotezione.

I canali BK, in condizioni di controllo e in assenza di chelanti di calcio all'interno della pipetta di registrazione, nelle condizioni di registrazione utilizzate (soluzione contenente KF) sono attivati a valori di potenziali piuttosto depolarizzanti e solitamente ≥ 50 mV. L'esposizione sia di cellule HEK 293T, che esprimevano transientemente la subunità α del canale umano BK wild-type (hSlo1), che di cellule Ea.hy926 alla leptina, aumentava fortemente l'intensità delle correnti mediate dai canali a tutti i potenziali di depolarizzazione testati, sia quando le correnti erano attivate da una rampa di voltaggio, sia quando invece erano suscitate mediante impulsi rettangolari a voltaggi costanti (Fig.22).

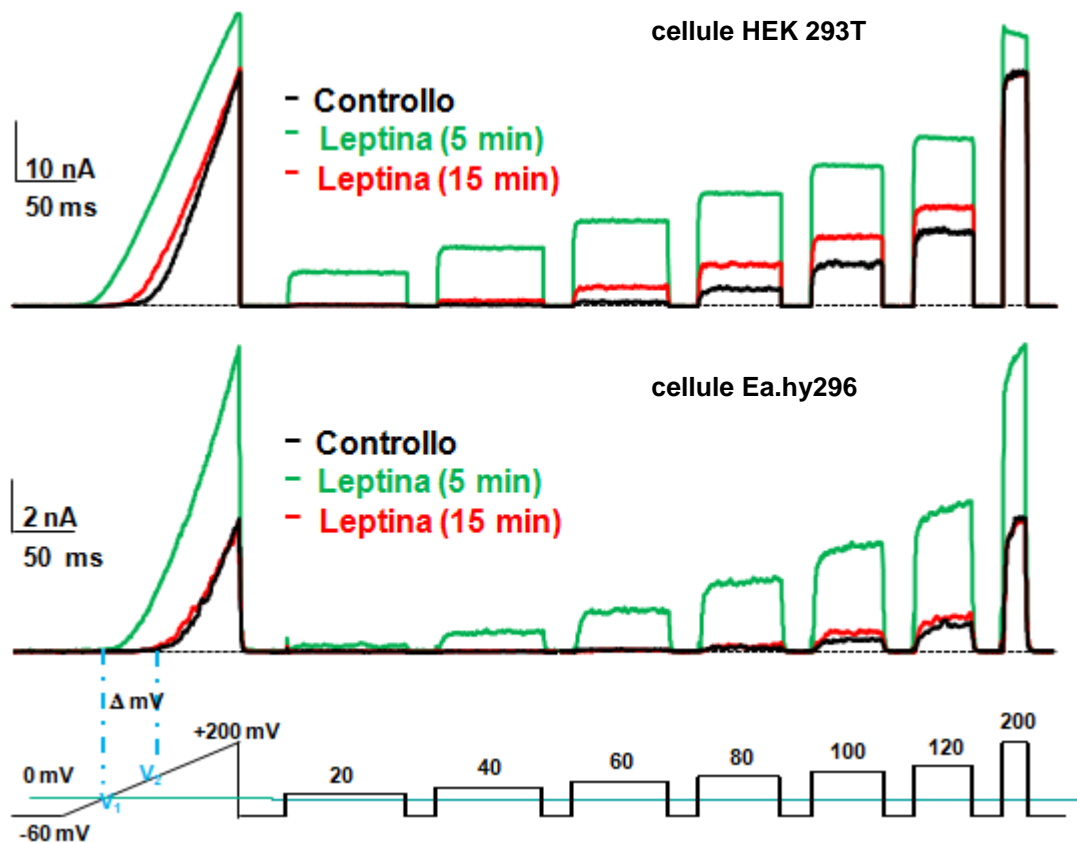


Fig.22. Correnti macroscopiche registrate da cellule HEK 293T, che esprimevano transientemente i canali BK, e da cellule Ea.hy926 in assenza (tracce nere) o in presenza (tracce verdi e rosse) di 10 nM leptina. Le correnti sono state attivate da una rampa di voltaggio (da -60 a +200 mV) o da impulsi rettangolari depolarizzanti a potenziali crescenti (+20-+200 mV). Le tracce nere indicano le correnti misurate prima dell'esposizione alla leptina, mentre quelle verdi e rosse indicano rispettivamente le correnti misurate dopo 5 minuti e 15 minuti di esposizione all'ormone. In basso è riportato il protocollo di registrazione utilizzato. V_1 e V_2 indicano i valori di voltaggio utilizzati per misurare lo spostamento a sinistra indotto dalla leptina nell'attivazione delle correnti BK.

L'aumento delle correnti BK mediato dalla leptina raggiungeva un picco dopo 5-10 minuti di esposizione al peptide, nel caso delle cellule HEK 293T, e dopo 5-15 minuti nel caso delle cellule Ea.hy926; in entrambi i sistemi cellulari analizzati le correnti tornavano vicine ai valori basali dopo 30-40 minuti di esposizione alla leptina e il fenomeno osservato era transiente (Fig.23).

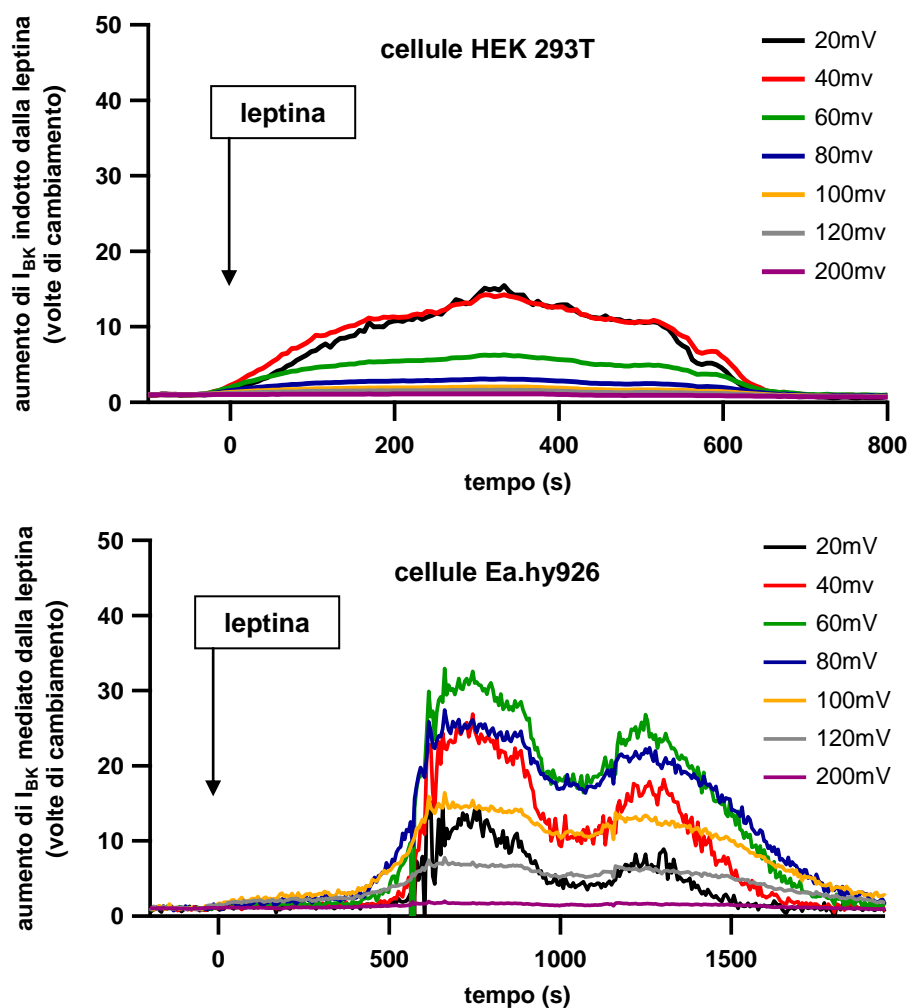


Fig.23. Time-course dell'aumento indotto dalla leptina (10 nM) delle correnti BK misurate ai potenziali indicati in cellule HEK 293T trasfettate transientemente con la forma wild-type del canale BK umano e in cellule endoteliali Ea.hy926. La freccia indicata sopra le tracce indica il momento di applicazione dell'ormone.

Quando gli effetti della leptina erano analizzati in maniera più dettagliata in funzione del voltaggio, era evidente che il maggiore incremento delle correnti BK si verificava intorno al valore di potenziale di soglia per l'attivazione del canale (circa +40 mV nelle cellule HEK 293T e +60 mV nelle cellule Ea.hy926). Le correnti erano aumentate nei due diversi tipi cellulari rispettivamente di circa 20 volte e di circa 40 volte (Fig.24; i dati ottenuti per le cellule HEK 293T derivavano dalla media di 7 cellule, mentre quelli ottenuti per le cellule Ea.hy926 erano il risultato di 12 registrazioni). Sebbene esista una differenza tra l'incremento massimo indotto dalla leptina nelle correnti BK misurate a

+40 mV nelle cellule HEK 293T e nelle correnti misurate a +60 mV nelle cellule Ea.hy926, tuttavia questa differenza non è statisticamente significativa ($p>0.05$). Per verificare se l'attivazione delle correnti BK fosse associata ai livelli di espressione dei recettori della leptina, sono state inoltre effettuate registrazioni su cellule HEK 293T cotrasfettate sia con il canale BK umano che con la forma murina del recettore per la leptina (mLepR). Le correnti mediate dai canali BK, quando misurate in seguito all'applicazione del protocollo di registrazione usato in precedenza, aumentavano di intensità dopo la somministrazione dell'ormone (Fig.24) ma, sebbene l'aumento osservato fosse di circa 10 volte superiore rispetto alle correnti misurate in cellule che esprimevano solo il canale del K^+ , la differenza osservata a tutti i potenziali testati non era statisticamente significativa ($p>0.05$) per cui la valutazione dell'attivazione delle correnti mediate dai canali BK nelle registrazioni successive è stata effettuata overesprimendo il solo canale del K^+ .

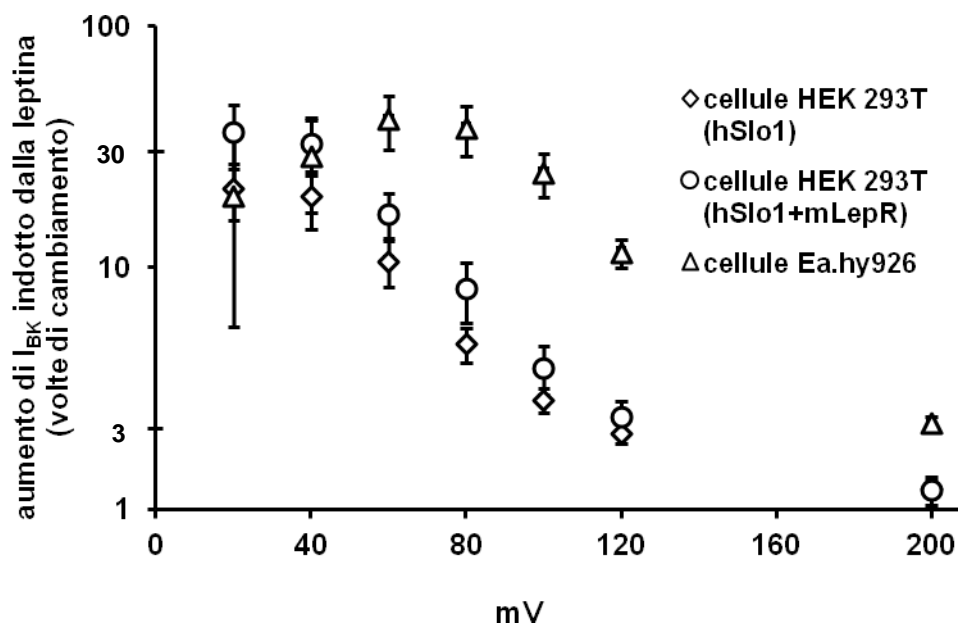


Fig.24. Voltaggio dipendenza dell'aumento delle correnti BK indotto dalla leptina ed espresso come rapporto delle correnti massime $I_{leptina}/I_{controllo}$ ai valori di potenziale indicati. Nel grafico è riportato l'aumento osservato in cellule HEK 293T trasfettate transientemente con la sola forma wild-type del canale BK umano o con quest'ultima e la forma murina del recettore della leptina. È descritto inoltre l'incremento osservato in cellule endoteliali Ea.hy926.

Gli effetti della leptina sulle correnti BK non si esaurivano solo nell'aumento delle stesse ma, come chiaramente osservato nelle rampe mostrate in Fig.22, la leptina induceva un robusto spostamento verso sinistra nella voltaggio dipendenza di attivazione dei canali BK, a valori di potenziale più bassi. Nelle cellule HEK 293T lo spostamento, pari a 47.4 ± 8.6 mV ($n=7$; $p < 0.05$ *versus* valori misurati nelle condizioni di controllo), è stato misurato come la differenza tra il voltaggio a cui le correnti indotte dalla leptina avevano la stessa ampiezza delle correnti di controllo a +40 mV (riferito come V_2 in Fig.22), e il voltaggio di controllo +40 mV (riferito come V_1 in Fig.22). Nelle cellule Ea.hy926 lo spostamento osservato era pari a 46.5 ± 5.9 mV ($n=12$; $p < 0.05$ *versus* valori misurati nelle condizioni di controllo) e, in questo caso, il voltaggio di controllo considerato era +60 mV.

Come accennato in precedenza, l'attivazione della corrente indotta dalla leptina era transiente a tutti i potenziali testati e in particolare, quando misurata a +40 mV nelle cellule HEK 293T, le correnti associate ai canali BK dopo 20-30 minuti dal picco di corrente massima registrata erano aumentate di 3.7 ± 1.1 volte quando confrontate con le correnti misurate prima dell'applicazione della leptina ($n=7$; $p > 0.05$); nel caso delle cellule Ea.hy926, quando misurate a +60 mV dopo 20-40 minuti dal picco, le correnti erano aumentate di 1.7 ± 0.4 volte quando confrontate con quelle misurate prima dell'esposizione delle cellule all'adipochina ($n=12$; $p > 0.05$).

Lo spostamento del voltaggio osservato è un fenomeno remnescente dell'effetto esercitato da aumenti della $[Ca^{2+}]_i$ sull'attivazione dei canali BK (Horrigan *et al.*, 2002), quindi sono state condotte registrazioni elettrofisiologiche per valutare se l'attivazione delle correnti BK indotte dalla leptina fosse dipendente dalle $[Ca^{2+}]_i$.

Per tale scopo le registrazioni sono state condotte in presenza di chelanti del Ca^{2+} , EGTA o BAPTA, aggiunti alla soluzione intracellulare.

La presenza di EGTA sopprimeva l'attivazione delle correnti BK indotta dalla leptina in cellule HEK 293T che esprimevano transientemente il canale BK umano (Fig.25 A); infatti, il rapporto tra le correnti BK misurate a +40 mV nelle cellule HEK 293T, in assenza o presenza di leptina era 0.8 ± 0.1 ($n=7$; $p > 0.05$ *versus* correnti di controllo; Fig.25 B). Inoltre il ΔmV tra le correnti misurate a +40 mV in assenza di leptina e quelle corrispondenti a +40 mV in presenza di leptina era -8.3 ± 2.9 , un valore che, sebbene significativo, corrispondeva a meno del 20% dello spostamento del voltaggio indotto

dalla leptina in condizioni di controllo ($n=7$; $p>0.05$ *versus* correnti di controllo; Fig.25 C). Risultati simili sono stati ottenuti quando la soluzione intracellulare conteneva il chelante del Ca^{2+} BAPTA (Fig.25 A); in questo caso il rapporto tra le correnti misurate a +40 mV in assenza e in presenza di leptina era 1.2 ± 0.1 ($n=7$; $p>0.05$ *versus* correnti di controllo; Fig.25 B) e il ΔmV indotto dalla leptina in presenza di BAPTA era 1.5 ± 3.6 ($n=7$; $p>0.05$ *versus* correnti di controllo; Fig.25 C).

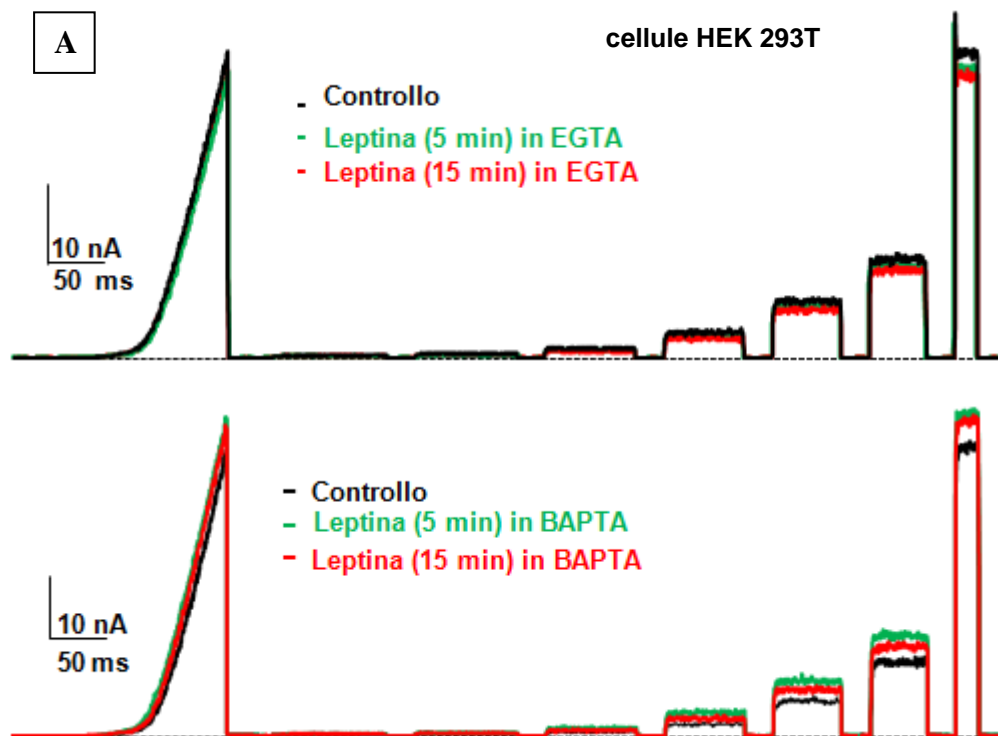


Fig.25. (A) Correnti macroscopiche registrate in presenza di EGTA (in alto) o BAPTA (in basso) all'interno della pipetta di registrazione in cellule HEK 293T esprimenti la forma wild-type del canale BK. Le tracce nere indicano le correnti misurate prima dell'applicazione delle leptina, mentre quelle verdi e rosse indicano rispettivamente le correnti registrate dopo 5 min e 15 min di esposizione all'ormone.

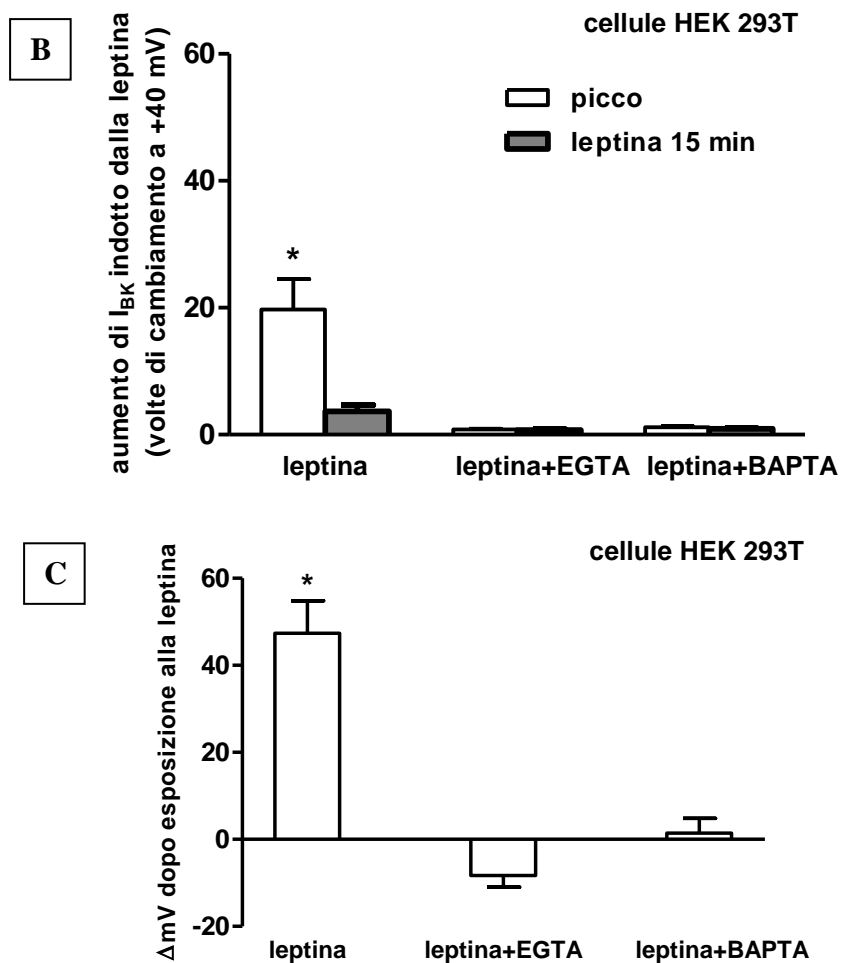


Fig.25. (B) Quantizzazione dell'aumento delle correnti BK indotto dalla leptina, registrate nelle medesime condizioni descritte sopra. La valutazione è stata effettuata al voltaggio di depolarizzazione che induceva il massimo incremento delle correnti (+40 mV); le volte di incremento sono state calcolate rispetto alle correnti di controllo misurate prima dell'esposizione a leptina, al momento del picco di corrente e dopo 15 min dall'inizio dell'esposizione all'ormone. (C) Valutazione dello spostamento della voltaggio dipendenza di attivazione dei canali BK (espresso come Δ mV) dopo esposizione a leptina in assenza o in presenza dei chelanti del Ca^{2+} EGTA o BAPTA. I dati rappresentano la media \pm S.E.M. di registrazioni effettuate in 7 cellule in ciascuna condizione sperimentale utilizzata; gli asterischi riportati nelle figure indicano valori statisticamente diversi dalle condizioni di controllo (correnti registrate prima dell'esposizione a leptina).

Nelle cellule Ea.hy926, dopo esposizione alla leptina in presenza di EGTA si osservava allo stesso modo una soppressione delle correnti (Fig.26 A) e il rapporto tra le correnti a +60 mV in assenza o i presenza di leptina era 1.2 ± 0.2 ($n=12$; $p>0.05$ *versus* correnti di

controllo) (Fig.26 B); inoltre il ΔmV tra le correnti era solo -2.1 ± 3.5 , un valore che corrispondeva a meno del 5% dello spostamento del voltaggio indotto dalla leptina osservato in condizioni di controllo ($n=12$; $p>0.05$ *versus* correnti di controllo) (Fig.26 C). Anche in questo caso risultati simili sono stati ottenuti quando le correnti sono state registrate in presenza del chelante del Ca^{2+} BAPTA contenuto nella soluzione intracellulare (Fig.26 A); infatti, il rapporto tra le correnti BK a +60 mV, in assenza e in presenza di leptina, era 1.1 ± 0.1 (Fig.26 B; $n=12$; $p>0.05$ *versus* correnti di controllo). Inoltre, il ΔmV indotto dalla leptina a +60 mV in presenza di tale chelante era -1.28 ± 2.6 ($n=12$; $p>0.05$ *versus* correnti di controllo) (Fig.26 C).

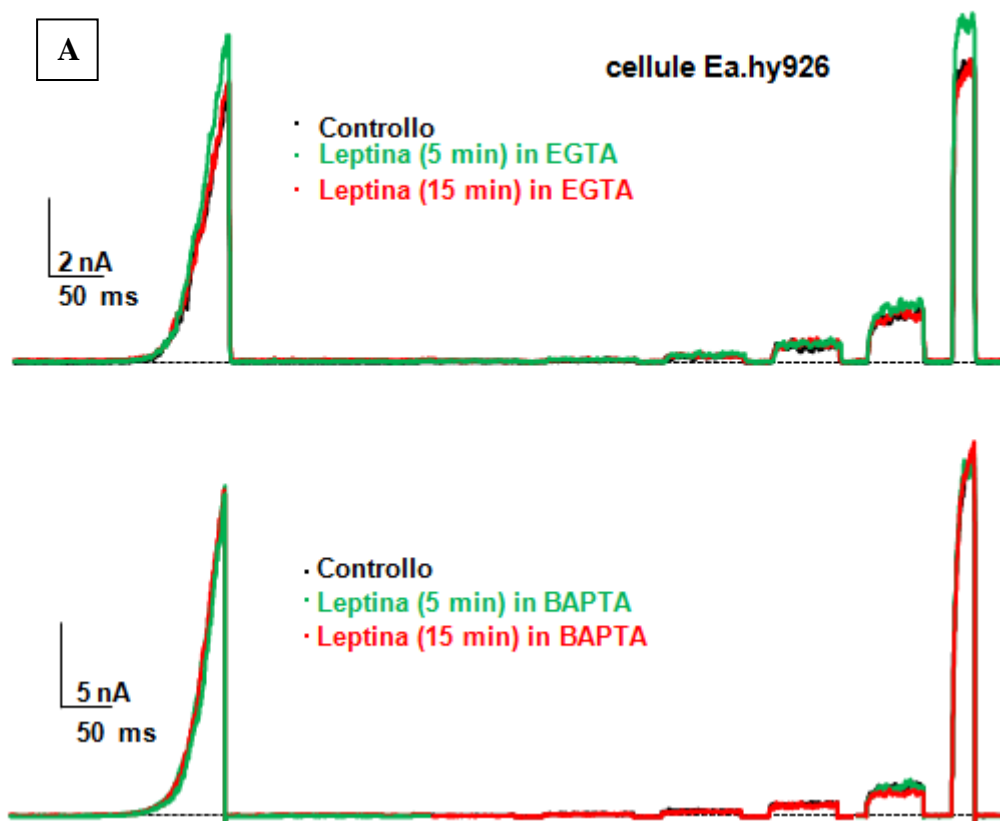


Fig.26. (A) Correnti macroscopiche registrate in presenza di EGTA (in alto) o BAPTA (in basso) all'interno della pipetta di registrazione in cellule Ea.hy926. Le tracce nere indicano le correnti misurate prima dell'applicazione delle leptina, mentre quelle verdi e rosse indicano rispettivamente le correnti registrate dopo 5 min e 15 min di esposizione all'ormone.

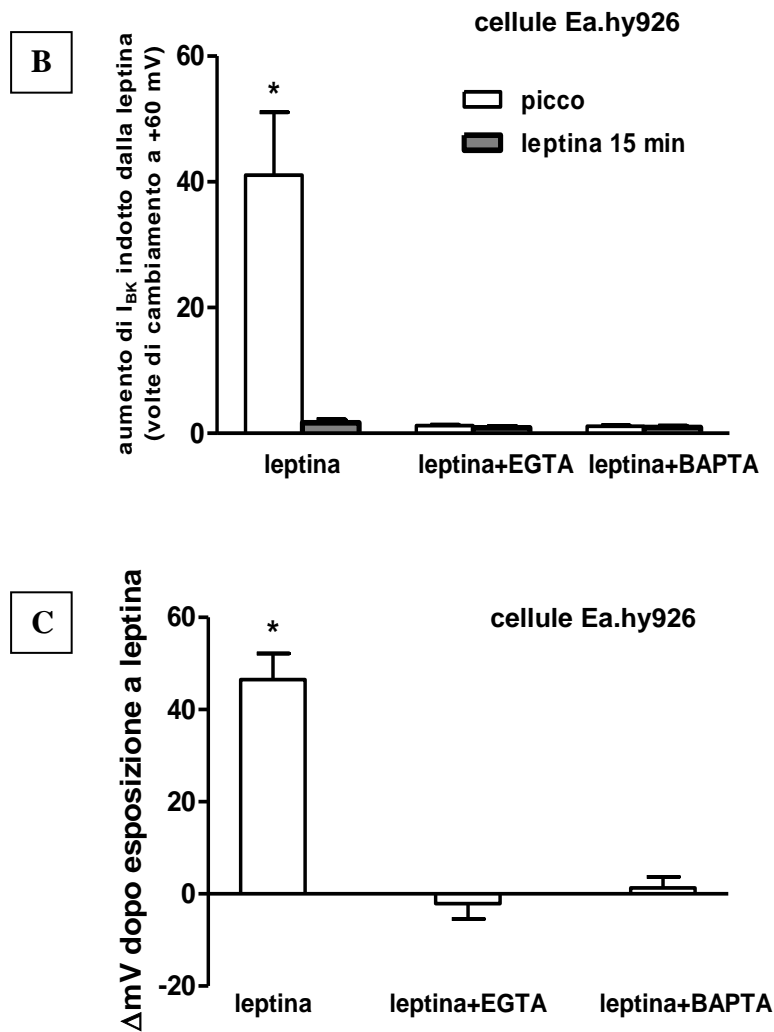


Fig.26. (B) Quantizzazione dell'aumento delle correnti BK indotto dalla leptina, registrate nelle medesime condizioni descritte sopra. La valutazione è stata effettuata al voltaggio di depolarizzazione che induceva il massimo incremento delle correnti (+60 mV); le volte di incremento sono state calcolate rispetto alle correnti di controllo misurate prima dell'esposizione a leptina, al momento del picco di corrente e dopo 15 min dall'inizio dell'esposizione all'ormone. (C) Valutazione dello spostamento della voltaggio dipendenza di attivazione dei canali BK (espresso come ΔmV) dopo esposizione a leptina in assenza o in presenza dei chelanti del Ca^{2+} EGTA o BAPTA. I dati rappresentano la media \pm S.E.M. di registrazioni effettuate in 12 cellule in ciascuna condizione sperimentale utilizzata; gli asterischi riportati nelle figure indicano valori statisticamente diversi dalle condizioni di controllo (correnti registrate prima dell'esposizione a leptina).

Insieme questi dati dimostravano che l'aggiunta di chelanti del Ca^{2+} all'interno della pipetta di registrazione smorzava sensibilmente l'attivazione delle correnti BK indotta

dalla leptina, suggerendo che è strettamente necessaria una completa regolazione dei canali BK da parte del Ca^{2+} per aumentare le correnti mediate da tali canali.

Per confermare ulteriormente questa ipotesi, gli effetti della leptina sono stati studiati su cellule HEK 293T che esprimevano una subunità α del canale BK che rendeva il canale completamente insensibile al Ca^{2+} a causa della presenza di due mutazioni a livello della regione intracellulare C-terminale; le mutazioni E535A e Δ 894-895, erano rispettivamente localizzate nei domini RCK1 e RCK2 responsabili della regolazione della conduttanza dello ione K^+ . La presenza di tali mutazioni faceva sì che quando le cellule erano registrate in condizioni di controllo, senza la presenza di nessun chelante del Ca^{2+} all'interno della pipetta, i canali fossero attivati a voltaggi più depolarizzanti e si osservava uno spostamento a destra nella voltaggio dipendenza di attivazione del canale di circa 20 mV (Schreiber *et al.*, 1997).

L'esposizione delle cellule a 10 nM di leptina non induceva un incremento significativo delle correnti mediate dalla forma mutata dei canali BK (Fig.27 A).

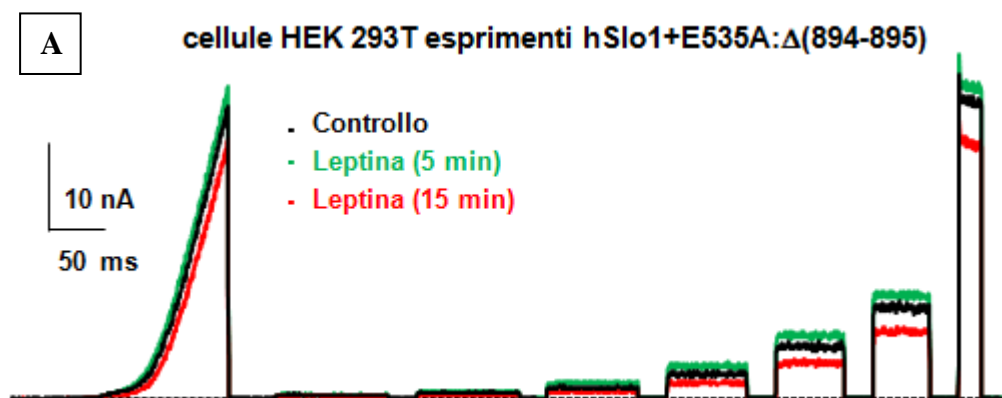


Fig.27. (A) Correnti macroscopiche registrate in cellule HEK 293T esprimenti canali BK mutati totalmente insensibili al Ca^{2+} . Le tracce nere indicano le correnti in condizioni di controllo, prima dell'esposizione alla leptina; le tracce verdi e rosse indicano le correnti registrate dopo 5 min e 15 min di esposizione all'ormone.

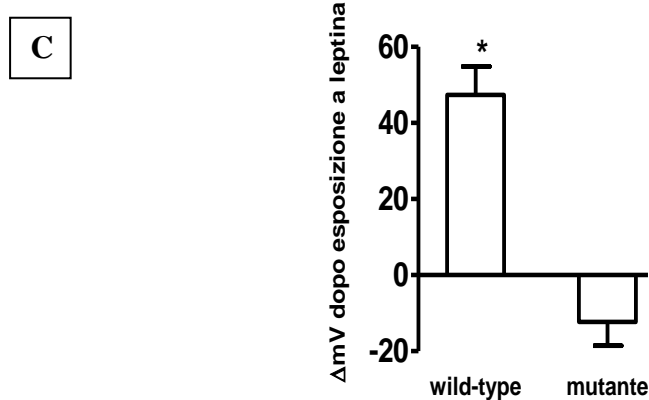
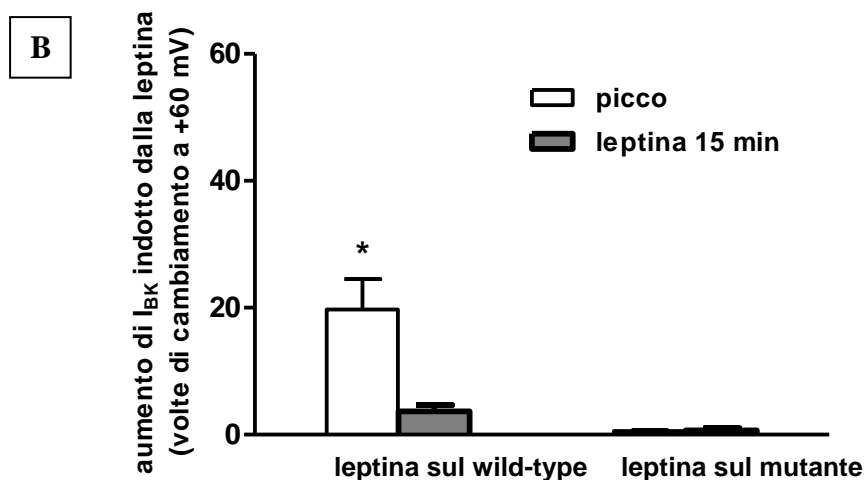


Fig.27. (B) Quantizzazione dell'aumento delle correnti BK indotto dalla leptina effettuata al voltaggio di depolarizzazione che induceva il massimo incremento delle correnti (+60 mV); le volte di incremento sono state calcolate rispetto alle correnti di controllo misurate prima dell'esposizione a leptina, al momento del picco di corrente e dopo 15 min dall'inizio dell'esposizione all'ormone. (C) Valutazione dello spostamento della voltaggio dipendenza di attivazione dei canali BK (espresso come ΔmV) dopo esposizione a leptina. I dati rappresentano la media \pm S.E.M. di registrazioni effettuate in 6 cellule; gli asterischi riportati nelle figure indicano valori statisticamente diversi dalle condizioni di controllo (correnti registrate prima dell'esposizione a leptina).

Il rapporto tra le correnti associate all'attivazione dei canali BK al voltaggio di +60 mV (calcolato sommando il voltaggio a cui si verificava l'attivazione massima indotta dalla leptina nelle cellule HEK 293T e lo spostamento di +20 mV nel voltaggio di attivazione, che caratterizza il canale mutante), in assenza e in presenza di leptina era 0.6 ± 0.1 (n=6;

$p > 0.05$ *versus* correnti di controllo; Fig.27 B); inoltre, il ΔmV tra le correnti misurate in assenza e in presenza dell'ormone era -12.3 ± 6.8 ($n=6$; $p < 0.05$ *versus* lo spostamento osservato nei canali BK wild-type; Fig.27 C).

3.6 Aumento indotto dalla leptina delle $[Ca^{2+}]_i$ in neuroni corticali e in linee cellulari

La dipendenza di attivazione dei canali BK dallo ione Ca^{2+} , ha spinto a chiarire il ruolo della leptina nella regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} . A tale scopo è stata valutata la capacità della leptina di indurre aumenti nelle $[Ca^{2+}]_i$ attraverso indagini microfluorimetriche basate sull'utilizzo dell'indicatore fluorescente Fura-2AM. Il monitoraggio delle $[Ca^{2+}]_i$ è stato effettuato prima e dopo esposizione alla leptina sia in neuroni corticali di topo che nelle due linee cellulari HEK 293T e Ea.hy926.

L'esposizione dei neuroni a leptina 10 nM induceva un aumento transiente nelle $[Ca^{2+}]_i$ in circa il 70% della popolazione (70/114), nella maggior parte dei casi entro 2 minuti dall'esposizione all'ormone ma, talvolta, anche a distanza di intervalli di tempo più prolungati; inoltre circa la metà delle cellule rispondenti mostrava ulteriori incrementi transienti di Ca^{2+} nel tempo successivo e, complessivamente, l'aumento dei livelli di Ca^{2+} indotto dalla leptina andava dal valore basale di 56 ± 5 nM al valore di 469 ± 75 nM al momento del picco ($p < 0.05$; Fig.28 A). In entrambe le due linee cellulari, invece, la risposta alla leptina si verificava in circa il 30% della popolazione cellulare (51/195 HEK 293T e 53/194 Ea.hy926) e il tempo necessario a raggiungere un picco transiente di Ca^{2+} era 8-15 minuti. Nelle cellule HEK 293T i livelli di Ca^{2+}_i andavano da 62 ± 3 nM (livello basale) a 262 ± 35 nM (picco) ($p < 0.05$; Fig.28 B), mentre nelle cellule Ea.hy926 le $[Ca^{2+}]_i$ aumentavano da 85 ± 3 nM (livello basale) a 296 ± 14 nM (picco) ($p < 0.05$; Fig.28 C).

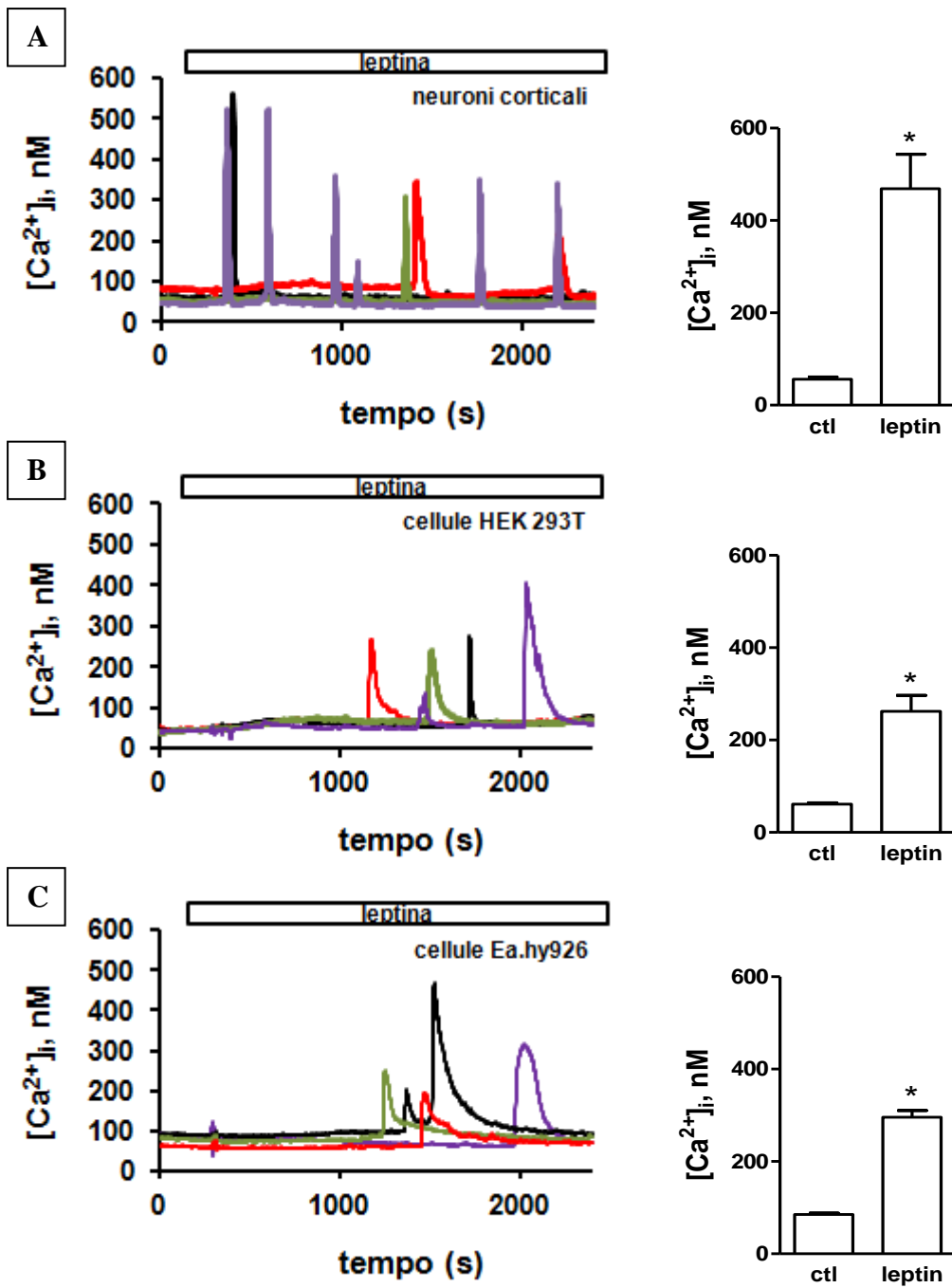


Fig.28. Cambiamenti indotti dalla leptina nelle $[Ca^{2+}]_i$ misurate mediante Fura-2 AM in neuroni corticali di topo (A), in cellule HEK 293T (B) e in cellule Ea.hy926 (C). I rettangoli presenti nelle figure indicano la durata di esposizione alla leptina. Le tracce mostrate sono rappresentative di dati ottenuti da 70 neuroni, 51 cellule HEK 293T e 53 cellule Ea.hy926 registrate in tre sessioni sperimentali differenti. I pannelli a destra mostrano le quantizzazioni degli incrementi nelle $[Ca^{2+}]_i$; gli asterischi indicano valori statisticamente differenti dai rispettivi controlli.

3.7 La fosfoinositolo-3-chinasi (PI3K) partecipa all'aumento delle correnti BK mediato dalla leptina

La cascata della PI3K è una delle principali vie di segnalazione a valle del recettore della leptina, e alcuni studi hanno in precedenza dimostrato il coinvolgimento di tale chinasi nell'attivazione dei canali BK mediata dall'adipochina (Shanley *et al.*, 2002a; Yang *et al.*, 2010).

Per confermare se la leptina attiva i canali BK attraverso l'induzione della PI3K, è stato utilizzato l'inibitore selettivo wortmannina. Le cellule endoteliali Ea.hy926 sono state pretrattate con 20 nM wortmannina per circa 20 minuti e l'aumento delle correnti BK indotto da 10 nM leptina è stato successivamente misurato mediante whole-cell patch clamp. Quando le cellule erano pretrattate con l'inibitore la leptina era incapace di indurre un incremento delle correnti e il rapporto tra le correnti BK misurate a +60 mV, in assenza e in presenza di leptina, era 2.6 ± 1.2 ($n=6$; $p > 0.05$ *versus* correnti di controllo); inoltre lo spostamento del voltaggio misurato come differenza tra il voltaggio a cui le correnti indotte dalla leptina avevano la stessa ampiezza delle correnti di controllo a +60 mV era -2.9 ± 0.5 ($n=6$; $p > 0.05$ *versus* correnti di controllo; Fig.29).

Le PI3Ks di classe I si presentano in forma eterodimerica e consistono di una singola subunità regolatoria di 85 kDa (p85 α o p85 β) che si assembla con una singola subunità catalitica di 110 kDa (p110 α , p110 β , p110 γ o p110 δ). Un recente studio suggerisce che gli effetti acuti della leptina siano dipendenti dall'attivazione delle subunità p110 α e/o p110 β (Al-Qassab *et al.*, 2009) quindi, per valutare quale subunità fosse effettivamente coinvolta nel processo di attivazione dei canali BK, sono stati studiati gli effetti della leptina sulle singole subunità che costituiscono la chinasi.

Sebbene la wortmannina sia un inibitore selettivo della PI3K, tuttavia non è capace di discriminare tra le diverse subunità catalitiche e pertanto, per bloccare ciascuna singola subunità p110, sono stati utilizzati i bloccanti specifici A66S, TGX221, AS605240 e IC87114 che inibiscono rispettivamente le subunità α , β , γ e δ .

L'effetto della leptina sull'incremento delle correnti BK è stato valutato dopo un periodo di preincubazione di ciascun bloccante di circa 20-30 minuti, e quando le cellule erano esposte all'ormone il rapporto tra le correnti BK a +60 mV in assenza e in presenza della leptina era 6.8 ± 4.1 quando si utilizzava il bloccante A66S (inibitore di

p110 α) (n=9; p>0.05 *versus* correnti di controllo), 22.9 \pm 7.1 quando si utilizzava il bloccante TGX221 (inibitore di p110 β) (n=9; p<0.05 *versus* correnti di controllo), 3.9 \pm 0.9 in presenza di AS605240 (inibitore di p110 γ) (n=8; p>0.05 *versus* correnti di controllo), e 11.1 \pm 4.6 in presenza di IC87114 (inibitore di p110 δ) (n=10; p<0.05 *versus* correnti di controllo) (Fig.29 A). Quando era analizzato anche lo spostamento della voltaggio-dipendenza di attivazione dei canali BK indotto dalla leptina (Fig.29 B), si osservava una variazione solo nelle cellule che erano state preincubate con i bloccanti A66S e IC87114 e successivamente esposte a leptina; i Δ mV tra le correnti misurate in assenza o in presenza di leptina corrispondenti a quelli misurati a +60 mV erano rispettivamente 34.5 \pm 5.7 (n=9; p<0.05 *versus* correnti di controllo) e 14.9 \pm 7.1 (n=10; p<0.05 *versus* correnti di controllo). In presenza dei bloccanti delle subunità α e γ , invece, la leptina era incapace di spostare significativamente la voltaggio-dipendenza di attivazione dei canali BK verso potenziali meno depolarizzati e i valori di Δ mV erano 5.9 \pm 7.1 in presenza di A66S (n=9; p>0.05 *versus* correnti di controllo), e 3.9 \pm 3.4 in presenza di AS605240 (n=8; p<0.05 *versus* correnti di controllo).

Questi dati suggerivano un ruolo dominante per le subunità α e γ nell'attivazione mediata dalla leptina delle correnti BK in quanto il blocco farmacologico di tali subunità antagonizzava le risposte cellulari all'ormone leptina prevenendo l'iperpolarizzazione derivante dall'attivazione dei canali al K⁺.

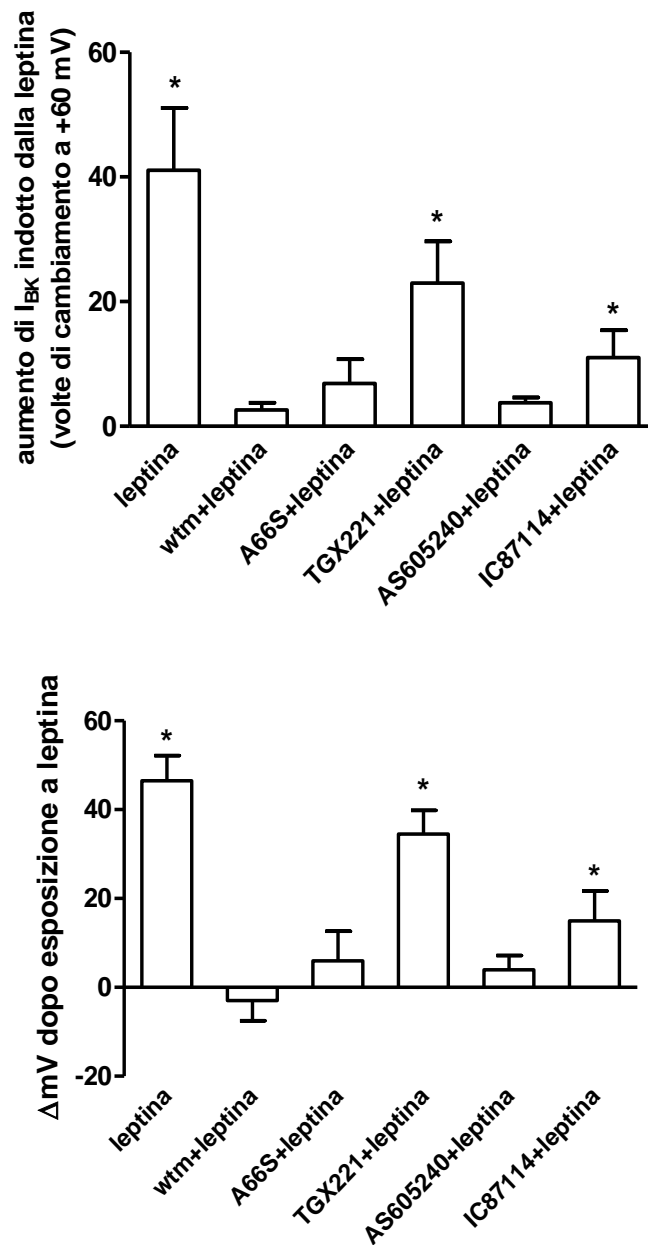


Fig.29. (A) Quantizzazione dell'aumento delle correnti BK indotto dalla leptina, registrate in cellule endoteliali in presenza del bloccante della PI3K wortmannina o di bloccanti selettivi delle singole subunità della chinasi. La valutazione dell'incremento delle correnti è stata effettuata a +60 mV; le volte di incremento sono state calcolate al momento del picco dopo l'esposizione all'ormone. (B) Valutazione dello spostamento della voltaggio dipendenza di attivazione dei canali BK (espresso come ΔmV) dopo esposizione a leptina in assenza o in presenza dei bloccanti delle subunità della PI3K. I dati rappresentano la media \pm S.E.M. di registrazioni effettuate in 12 cellule in ciascuna condizione sperimentale utilizzata; gli asterischi riportati nelle figure indicano valori statisticamente diversi dalle condizioni di controllo (correnti registrate prima dell'esposizione a leptina).

DISCUSSIONE

È saldamente affermato che la leptina, attraverso l'attivazione dei suoi recettori a livello ipotalamico, svolge un ruolo cruciale nel promuovere la soppressione dell'appetito e la spesa energetica regolando in maniera sofisticata il peso corporeo. Dalla sua mancanza di effetti derivano condizioni patologiche come l'obesità che è caratterizzata da un eccesso di tessuto adiposo bianco che nonostante produca una quantità abnorme di leptina, quest'ultima risulta essere inefficace causando una condizione nota come leptino-resistenza che è associata ad un progressivo aumento dei livelli serici dell'ormone che è incapace di attraversare la barriera ematoencefalica per raggiungere le aree cerebrali perché trattenuto all'interno del circolo sanguigno dall'eccesso di trigliceridi (Banks *et al.*, 2004). Negli ultimi anni, tra l'altro, alcuni studi hanno riportato il fatto che esiste una stretta correlazione tra l'obesità e l'insorgenza di malattie neurodegenerative, come lo stroke ischemico (Terao *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 1996; Rexrode *et al.*, 1997), nonché tra obesità e declino cognitivo associato all'età, incluso la malattia di Alzheimer, in cui insorgono anomalie assonali e/o mieliniche e si assiste ad una riduzione del volume cerebrale con perdita di materia grigia che potrebbe riflettere perdita di neuroni (Pannacciulli *et al.*, 2006). Negli ultimi anni, oltre al controllo del comportamento alimentare e alle relazioni esistenti tra obesità e disturbi cognitivi, sono state messe in evidenza le capacità neuroprotettive della leptina in numerosi modelli di neurotossicità *in vitro* ed *in vivo*, incluso deprivazione di ossigeno e glucosio, ipossia, ischemia, deprivazione di fattori neurotrofici, e stimoli eccitotossici ed ossidativi a livello di diverse popolazioni neuronali in diverse aree cerebrali (Signore *et al.*, 2008).

Nel presente studio è stata dimostrata la capacità della leptina di esercitare neuroprotezione in un modello *in vitro* di eccitotossicità indotta dall'esposizione di neuroni corticali di ratto e di topo all'agonista dei recettori ionotropici del glutammato N-Metil-D-Aspartato, un classico insulto eccitotossico. Le azioni neuroprotettive della leptina sembrano essere fortemente dipendenti dalle concentrazioni e dal tempo di esposizione; infatti, gli effetti neuroprotettivi erano osservati solo quando l'ormone era somministrato due ore prima dell'insulto tossico, mentre nessuna neuroprotezione era osservata per tempi di incubazione più brevi o più lunghi suggerendo l'esistenza di una finestra temporale piuttosto stretta all'interno del modello di tossicità utilizzato. Simili

effetti neuroprotettivi della leptina erano stati osservati in neuroni corticali *in vitro* esposti a deprivazione di ossigeno e glucosio quando 100 ng/ml di leptina erano applicati 15 minuti prima o 180 minuti dopo lo stimolo neurotossico (Valerio *et al.*, 2009), suggerendo che i meccanismi neuroprotettivi innescati dalla leptina durante l'OGD o durante l'esposizione a NMDA mostrano una diversa dipendenza temporale. Studi precedenti (Zhang *et al.*, 2007) avevano dimostrato la capacità della leptina di inibire l'apoptosi di cellule neuronali sottoposte a OGD attraverso l'upregolazione dell'espressione di geni come Bcl2 e Bcl-xL, che ritardavano il taglio proteolitico e quindi l'attivazione delle caspasi; nel presente studio, invece, sebbene non sia stata valutata l'espressione di geni codificanti per proteine anti-apoptotiche, è evidente che la leptina intervenga nella prevenzione del processo di necrosi considerata la sua capacità di ridurre in maniera significativa la positività dei neuroni alla colorazione con ioduro di propidio che è capace di attraversare le membrane di cellule danneggiate e quindi necrotiche.

Interessante notare che la paxillina e l'iberiotossina, due ben noti inibitori dei canali del K^+ di tipo BK, contrastavano completamente la neuroprotezione indotta dalla leptina suggerendo che l'attivazione dei canali BK è un meccanismo cruciale per la neuroprotezione durante l'esposizione a NMDA. In conformità a ciò, l'attivatore dei canali BK, NS1619, similmente alla leptina, promuoveva ugualmente effetti neuroprotettivi e quando somministrato in concomitanza con l'ormone e ciascuno dei due bloccanti, si assisteva ad un ripristino totale della neuroprotezione; dosaggi bassi dell'attivatore erano sufficienti a contrastare gli effetti dell'iberiotossina mentre concentrazioni più alte erano necessarie per annullare gli effetti della paxillina suggerendo che il blocco dei canali BK da parte di quest'ultimo inibitore era più efficiente e che probabilmente le subunità β dei canali BK maggiormente sensibili all'iberiotossina erano espresse in minore quantità a livello dei neuroni utilizzati. Sebbene i dati ottenuti lascerebbero pensare che NS1619 mimasse gli effetti della leptina la selettività di tale composto per i canali BK è stata fortemente messa in discussione (Gáspár *et al.*, 2007) e altri meccanismi molecolari, quali l'inibizione dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (Sheldon *et al.*, 1997), dei canali del K^+ voltaggio-dipendenti, e dei canali K_{ATP} (Edwards *et al.*, 1994) sono stati chiamati in campo per spiegare la neuroprotezione indotta da questo attivatore.

Un altro attivatore dei canali BK e dei canali del K⁺ voltaggio dipendenti K_{v7} (Schröder *et al.*, 2001; Schröder *et al.*, 2003; Dupuis *et al.*, 2002), mostrava allo stesso modo forti effetti neuroprotettivi in modelli animali di ischemia cerebrale (Gribkoff *et al.*, 2001), e attenuava l'edema cerebrale e il danno motorio neurologico dopo lesioni cerebrali traumatiche (Cheney *et al.*, 2001); tuttavia tale molecola, quando era somministrata in pazienti con ictus acuto e confrontata con un placebo, era incapace di mostrare un'efficacia superiore (Jensen, 2002). In linea con il ruolo neuroprotettivo dei canali BK, molecole bloccanti di tali canali ionici peggioravano il danno neuronale ischemico in colture organotipiche ippocampali (Rundén-Pran *et al.*, 2002).

I canali BK sono tetrameri di subunità α , codificate dal gene *Kcnma1*, che si organizzano a formare il poro del canale. Tali subunità, in maniera tessuto specifica, possono assemblarsi con distinte subunità β ausiliarie ($\beta 1$ - $\beta 4$) e tale associazione modifica significativamente le proprietà biofisiche e farmacologiche dei canali BK (Lu *et al.*, 2006; King *et al.*, 2006; Ghatta *et al.*, 2006). Per validare ulteriormente il coinvolgimento dei canali BK negli effetti mediati dalla leptina, le azioni neuroprotettive di tale ormone sono state studiate in neuroni di topi che portavano una delezione dell'esone 1 del locus *Kcnma1* (Meredith *et al.*, 2004). I risultati ottenuti mostravano che la leptina forniva una forte neuroprotezione solo in neuroni corticali di animali wild-type, mentre i topi omozigoti knockout per il gene *Slo1* erano totalmente resistenti agli effetti della leptina; in maniera interessante, anche i neuroni corticali derivanti da animali *Slo1* eterozigoti erano insensibili all'ormone. Questi dati confermano che i canali BK sono dei mediatori cruciali della neuroprotezione indotta dalla leptina e il fatto che anche una parziale riduzione dei canali BK funzionali, come è predetto verificarsi negli animali *Slo1*^{+/-} eterozigoti, annulli gli effetti dell'ormone, suggerisce che è richiesto uno stretto controllo della densità dei canali BK per la neuroprotezione da parte di questa adipochina. Interessante notare che in questi esperimenti, nonostante la differenza significativa nella sensibilità alla leptina, il trattamento con NMDA non induceva una tossicità più elevata in neuroni corticali di animali *Slo1*^{-/-} e *Slo1*^{+/-} quando confrontati con animali wild-type *Slo1*^{+/+}, un risultato coerente con la mancanza di potenziamento da parte dei bloccanti dei canali BK della tossicità indotta da NMDA in colture derivanti da animali wild-type. Questi risultati suggeriscono che i canali BK, sebbene coinvolti nella protezione indotta dalla leptina, non mediano il danno indotto da NMDA; al contrario Liao e collaboratori (2010), quando confrontavano topi *Slo1*^{-/-} e topi *Slo1*^{+/-},

osservavano una maggiore neurotossicità in seguito all'iniezione intracerebrale di NMDA, tuttavia, è da mettere in evidenza il fatto che nel modello *in vitro* utilizzato in questo studio le concentrazioni di glutammato endogeno difficilmente raggiungono i livelli neurotossici osservati *in vivo* in tessuti intatti durante la neurodegenerazione indotta da NMDA.

Negli esperimenti effettuati, l'attivazione dei canali BK indotta dalla leptina è stata sia ricostituita in un sistema di espressione eterologo che osservata in una linea cellulare endoteliale esprimente canali BK nativi caratterizzati dalla presenza della sola subunità α . Registrazioni elettrofisiologiche in HEK 293T, che esprimevano transientemente il cDNA codificante per il recettore umano del canale hSlo1, o in cellule endoteliali Ea.hy926, mostravano un robusto potenziamento delle correnti BK indotto dalla leptina, suggerendo che la subunità α dei canali BK era il target preferenziale per l'ormone. L'attivazione delle correnti indotta dalla leptina era fortemente dipendente sia dal tempo di esposizione all'ormone che dal voltaggio di depolarizzazione utilizzato: i tempi di attivazione dei canali BK nativi erano leggermente più lunghi se confrontati a quelli di canali BK trasfettati in cellule HEK 293T e i voltaggi a cui l'attivazione delle correnti era maggiormente evidente erano in entrambi i casi bassi, ma meno positivi nel caso di canali BK trasfettati. Per quanto riguarda invece i tempi di ritorno delle correnti ai livelli basali, si osservava una riduzione graduale che rendeva dunque il processo transiente; svariati meccanismi potrebbero spiegare tale fenomeno incluso una desensibilizzazione dei recettori per la leptina, nonché la precipitazione del Ca^{2+} e/o l'uscita del Ca^{2+} citosolico dalla pipetta di registrazione che effettivamente porterebbero le $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ad un livello meno efficace per attivare i canali BK.

In entrambe le linee cellulari utilizzate, inoltre, l'incremento delle correnti era impedito in presenza di chelanti del Ca^{2+} all'interno della pipetta di registrazione e, in cellule HEK 293T che esprimevano canali BK mutati insensibili al Ca^{2+} non si osservava nessuna risposta alla leptina, suggerendo che l'attivazione dei canali BK indotta dall'ormone è mediata da cambiamenti nella disponibilità di Ca^{2+} intracellulare.

In accordo all'ipotesi che vede il Ca^{2+} come mediatore dell'attivazione delle correnti BK da parte della leptina, è stato osservato che l'ormone è capace di aumentare transientemente i livelli di Ca^{2+} sia nelle due linee cellulari utilizzate che in neuroni corticali di topo; quando confrontato con l'aumento che si verificava in entrambe le linee cellulari, l'incremento nelle $[\text{Ca}^{2+}]_i$ osservato nei neuroni era più intenso e nella

maggior parte delle cellule insorgeva in breve tempo dopo l'esposizione alla leptina. Differenze nella densità dei recettori della leptina, nei meccanismi di ingresso di Ca^{2+} , di rilascio dai depositi intracellulari, nonché di tamponamento e possibili altri meccanismi di trasduzione potrebbero spiegare le differenze tra i tipi cellulari utilizzati.

L'attivazione dei canali BK indotta dalla leptina nei neuroni è stata per la prima volta proposta da Shanley e collaboratori (2002a; b) per spiegare la capacità di tale ormone di inibire l'eccitabilità di neuroni ippocampali; tuttavia, in questi studi, nonostante l'osservazione di cinetiche lente simili e un apparente aumento nella sensibilità dei canali BK al Ca^{2+} , la leptina era incapace di aumentare i livelli intracellulari di tale ione ed era dunque successivamente proposto il coinvolgimento della PI3K nell'attivazione delle correnti BK da parte della leptina, un effetto conseguente alla capacità di questo enzima di alterare le dinamiche dei filamenti di actina e di raggruppare e attivare i canali BK a livello della membrana neuronale (O'Malley *et al.*, 2005).

Esperimenti effettuati in questo studio allo stesso modo hanno dimostrato un coinvolgimento indiretto della PI3K nell'attivazione delle correnti BK che erano totalmente abolite in presenza del bloccante wortmannina o in presenza degli inibitori selettivi delle subunità α e γ della PI3K; il coinvolgimento di quest'ultima subunità nell'attivazione della PI3K mediata dalla leptina non era stato tra l'altro in precedenza dimostrato ed era stato piuttosto descritto il coinvolgimento delle subunità α e β .

I cambiamenti nelle $[Ca^{2+}]_i$ indotti dalla leptina sono stati descritti anche in cellule somatotrope (Glavaski-Joksimovic *et al.*, 2004) e in astrociti ipotalamici di topo (Hsuchou *et al.*, 2009). Effetti sia stimolatori che inibitori della leptina sulle $[Ca^{2+}]_i$ sono stati riportati in neuroni ippocampali (Shanley *et al.*, 2001) e in cellule granulari cerebellari, ma mentre gli effetti stimolatori sono stati collegati alla capacità della leptina di facilitare l'influsso di Ca^{2+} mediato dal recettore NMDA (Irving *et al.*, 2006), le azioni inibitorie sono state largamente ascritte all'inibizione dei canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti (Jo *et al.*, 2005). L'attivazione della PI3K indotta dalla leptina e i cambiamenti nelle $[Ca^{2+}]_i$ non appaiono come fenomeni mutualmente esclusivi; nei macrofagi di topo la leptina induce la migrazione promuovendo la liberazione del Ca^{2+} intracellulare e attivando le vie JAK/STAT, MAPK e PI3K (Gruen *et al.*, 2007); al contrario, nelle cellule HEK 293 che esprimono stabilmente il recettore della leptina (Ob-Rb), la leptina inibisce la mobilitazione del Ca^{2+} intracellulare indotta dall'acido lisofosfatidico e tale effetto è annullato da inibitori della PI3K.

I risultati derivanti da questo studio suggeriscono che la via della fosfoinositolo-3-chinasi è una delle vie di trasduzione del segnale utilizzate dalla leptina e che in qualche modo dall'attivazione di tale enzima potrebbe dipendere l'attivazione di proteine permeabili al Ca^{2+} o di trasportatori, nonché il rilascio di tale ione dai depositi intracellulari.

In conclusione, i risultati nel complesso dimostrano che l'attivazione dei canali BK, attraverso cambiamenti nelle $[\text{Ca}^{2+}]_i$, è un evento fondamentale nella neuroprotezione da parte della leptina contro la degenerazione neuronale corticale indotta dall'esposizione a NMDA. Questo meccanismo cellulare sembra rendere i neuroni più tolleranti ad un insulto neurotossico, per cui, nonostante l'esistenza di una rigida finestra temporale per la neuroprotezione indotta dalla leptina si potrebbe speculare dicendo che gli effetti cellulari indotti dall'ormone potrebbero agire come un evento preconditionante duraturo.

PROSPETTIVE FUTURE

Sebbene sia stato dimostrato il coinvolgimento dell'attivazione dei canali BK nei meccanismi neuroprotettivi mediati dalla leptina, i meccanismi molecolari alla base di tale fenomeno restano tuttavia ancora parzialmente elusivi.

Il coinvolgimento dello ione Ca^{2+} quale induttore dell'attivazione dei canali BK mediata dalla leptina lascia aperto l'interrogativo sulle vie di liberazione di tale ione nell'ambiente intracellulare, nonché sui meccanismi molecolari alla base di tale evento: il Ca^{2+} potrebbe sia derivare dall'ambiente extracellulare che essere di provenienza intracellulare e, in quest'ultimo caso, questo potrebbe sia essere rilasciato dal reticolo endoplasmico che dagli altri stores intracellulari. La PI3K, dimostrata essere coinvolta nel signaling della leptina, potrebbe essere solo il primo intermediario di una via che coinvolge altre proteine tra cui, ad esempio, la fosfolipasi C (PLC). Tale lipasi, responsabile dell'idrolisi del fosfatidilinositolo-bisfosfato (PIP2) a diacilglicerolo (DAG) e inositotrilfosfato (IP3), liberando quest'ultimo, potrebbe mediare il rilascio degli ioni Ca^{2+} dal reticolo endoplasmico favorendo l'attivazione dei canali BK; sebbene questo meccanismo sembrerebbe plausibile, tuttavia è necessario trovare dei metodi alternativi all'utilizzo di U73122, bloccante della PLC, per verificare tale ipotesi in quanto il bloccante, agendo in maniera non selettiva, è capace di inibire anche i canali BK (Klose *et al.*, 2008). Poiché l'ipotesi formulata potrebbe inoltre non essere verificata ed altri meccanismi potrebbero sottendere alla liberazione di ioni Ca^{2+} , ulteriori studi sarebbero necessari per fare luce sul fenomeno.

L'incremento delle $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indotto dalla leptina, che insieme all'attivazione dei canali BK è alla base dell'induzione della tolleranza dei neuroni agli insulti neurotossici, potrebbe essere inoltre responsabile dell'attivazione di chinasi o fosfatasi che, agendo a livello di specifici residui aminoacidici, potrebbero cambiare lo stato di fosforilazione dei canali BK o di proteine adattatrici che si assemblano ad essi rinforzando in tal modo la capacità di tali canali di rispondere agli incrementi di Ca^{2+} ; a tale scopo, studi di mutagenesi sito-specifica potrebbero essere condotti per ulteriormente caratterizzare i meccanismi di gating dei canali BK dopo esposizione all'ormone leptina.

Infine lo studio sugli effetti neuroprotettivi della leptina e sul coinvolgimento dell'attivazione dei canali BK potrebbe essere esteso ad altri modelli di degenerazione neuronale quali deprivazione di ossigeno e glucosio, rimozione di fattori neurotrofici o

ischemia cerebrale *in vivo* sia su animali wild-type che su topi caratterizzati dalla mutazione nei canali BK; tali studi potrebbe confermare il ruolo dei canali BK nella neuroprotezione contro diversi insulti neurotossici e fissare su basi più solide il potenziale utilizzo della leptina nella prevenzione e/o nel trattamento di malattie neurodegenerative.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, Flier JS (1999) Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* 140(6):2755-62.
2. Allen M, Zou F, Chai HS, Younkin CS, Miles R, Nair AA, Crook JE, Pankratz VS, Carrasquillo MM, Rowley CN, Nguyen T, Ma L, Malphrus KG, Bisceglia G, Ortolaza AI, Palusak R, Middha S, Maharjan S, Georgescu C, Schultz D, Rakhshan F, Kolbert CP, Jen J, Sando SB, Aasly JO, Barcikowska M, Uitti RJ, Wszolek ZK, Ross OA, Petersen RC, Graff-Radford NR, Dickson DW, Younkin SG, Ertekin-Taner N (2012) Glutathione S-transferase omega genes in Alzheimer and Parkinson disease risk, age-at-diagnosis and brain gene expression: an association study with mechanistic implications. *Mol Neurodegener.* 7:13.
3. Al-Qassab H, Smith MA, Irvine EE, Guillermet-Guibert J, Claret M, Choudhury AI, Selman C, Piipari K, Clements M, Lingard S, Chandarana K, Bell JD, Barsh GS, Smith AJ, Batterham RL, Ashford ML, Vanhaesebroeck B, Withers DJ. (2009) Dominant role of the p110beta isoform of PI3K over p110alpha in energy homeostasis regulation by POMC and AgRP neurons. *Cell Metab.* 10(5):343-54.
4. Almong B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, Barkan D, Homburg R, Lessing JB, Nevo N, Gertler A, Amsterdam A (2001) Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Mol Cell Endocrinol.* 183:179-191.
5. Aras MA, Hartnett KA, Aizenman E. (2008) Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 7:Unit 7.18.
6. Atlante A, Valenti D, Gagliardi S, Passarella S (2000) A sensitive method to assay the xanthine oxidase activity in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res Brain Res Protoc.* 6(1-2):1-5.
7. Avraham Y, Davidi N, Lassri V, Vorobiev L, Kabesa M, Dayan M, Chernoguz D, Berry E, Leker RR (2011) Leptin induces neuroprotection neurogenesis and angiogenesis after stroke. *Curr Neurovasc Res* 8(4):313-22.

8. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* 394(6695):790-3.
9. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275(19):14563-72.
10. Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM (1996) Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17(2):305-11.
11. Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoka R, Morley JE (2004) Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53(5):1253-60.
12. Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L, Rizzuto R, Carafoli E, Nicotera P (2005) Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell*. 120(2):275-85.
13. Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA (1996) The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16):8374-8.
14. Behrens R, Nolting A, Reimann F, et al. (2000) hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett*. 474:99–106
15. Berdichevsky E, Riveros N, Sánchez-Armáss S, Orrego F (1983) Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neurosci Lett*. 36(1):75-80.
16. Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, et al. (2006) BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science* 314:615–620.
17. Bian K, Murad F (2003) Nitric oxide (NO)--biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. *Front Biosci*. 8:d264-78.
18. Bingham NC, Anderson KK, Reuter AL, Stallings NR, Parker KL. (2008) Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome, *Endocrinology* 149:2138–2148.
19. Bjørbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS (1998) Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*. 1(4):619-25.

20. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(16):7162-6.
21. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. (2004) Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304:108–110.
22. Brandon M, Baldi P, Wallace DC (2006) Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene.* 25(34):4647-62.
23. Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, et al. (2000) Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel β -subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem.* 275:6453–6461.
24. Brown JE, Dunmore SJ (2007) Leptin decreases apoptosis and alters BCL-2: Bax ratio in clonal rodent pancreatic beta-cells. *Diabetes Metab Res Rev.* 23:497-502.
25. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR. (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction, *Science* 289:2122–2125.
26. Cali T, Ottolini D, Brini M (2011) Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Biofactors.* 37(3):228-40.
27. Chang CP, Dworetzky SI, Wang J, et al. (1997) Differential expression of the alpha and beta subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. *Brain Res Mol Brain Res.* 45:33–40.
28. Chen H, Sun D (2005) The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia. *Neurol Res* 27:280–286
29. Chen HS, Lipton SA (2006) The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem.* 97(6):1611-26.
30. Cheney JA, Weisser JD, Bareyre FM, Laurer HL, Saatman KE, Raghupathi R, Gribkoff V, Starrett JE Jr, McIntosh TK (2001) The maxi-K channel opener BMS-204352 attenuates regional cerebral edema and neurologic motor impairment after experimental brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 21(4):396-403.
31. Cheung EC, Slack RS (2004) Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE* (251):PE45.

32. Choi DW. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623–634.
33. Choi DW. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7: 369–379.
34. Choi DW, Maulucci-Gedde M, and Kriegstein AR. (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7: 357–368.
35. Commins SP, Marsh DJ, Thomas SA, Watson PM, Padgett MA, Palmiter R, Gettys TW (1997) Norepinephrine is required for leptin effects on gene expression in brown and white adipose tissue. *Endocrinology* 140:4772–4778.
36. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411(6836):480-4.
37. Crowley JJ, Treistman SN, Dopico AM. (2003) Cholesterol antagonizes ethanol potentiation of human brain BK channels reconstituted into phospholipid bilayers. *Mol Pharmacol.* 64:365–373.
38. Dessi F, Charriaut-Marlangue C, Khrestchatisky M, Ben-Ari Y (1993) Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. *J Neurochem.* 60(5):1953-5.
39. Dhillon H., Zigman J.M., Ye C., Lee C.E., McGovern R.A., Tang V., Kenny C.D., Christiansen L.M., White R.D., Edelman E.A., Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua S Jr., Elmquist JK, Lowell BB. (2006) Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 49:191–203.
40. Díaz L, Meera P, Amigo J, et al. (1998) Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium sensitive potassium (hSlo) channel. *J Biol Chem.* 273:32430–32436.
41. Dicou E, Attoub S, Gressens P (2001) Neuroprotective effects of leptin in vivo and in vitro. *Neuroreport* 12(18):3974-51
42. Dichter MA. (1978) Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res.* 149(2):279-93.
43. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003) Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26:248–254.

44. Dunbar JC, Hu Y, Lu H (1997) Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes* 46:2040–2043.
45. Dupuis DS, Schröder RL, Jespersen T, Christensen JK, Christophersen P, Jensen BS, Olesen SP (2002) Activation of KCNQ5 channels stably expressed in HEK293 cells by BMS-204352. *Eur J Pharmacol* 437(3):129-37.
46. Durakoglugil M, Irving AJ, Harvey J (2005) Leptin induces a novel form of NMDA receptor-dependent long-term depression, *J. Neurochem.* 95:396–405.
47. Dworetzky SI, Boissard CG, Lum-Ragan JT, et al. (1996) Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J Neurosci.* 16:4543–4550.
48. Edwards G, Niederste-Hollenberg A, Schneider J, Noack T, Weston AH (1994) Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 113(4):1538-47.
49. Erbayat-Altay E, Yamada KA, Wong M, Thio LL (2006) Increased severity of pentylenetetrazol-induced seizures in leptin deficient ob/ob mice. *Epilepsia* 47:303-304.
50. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM (1997) Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):7001-5.
51. Foster AC, Fagg GE (1984) Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res.* 319(2):103-64.
52. Friedman JM, Halaas JL. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395(6704):763-70.
53. Friedman JM. (2009) Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *Am J Clin Nutr* 89(3):973S-979S
54. Fury M, Marx SO, Marks AR (2002) Molecular BKology: the study of splicing and dicing. *Sci STKE* 2002:PE12.
55. Gallardo N, Arribas C, Villar M, Ros M, Carrascosa JM, Martínez C, Andrés A (2005) ObRa and ObRe are differentially expressed in adipose tissue in aged

- food-restricted rats: effects on circulating soluble leptin receptor levels. *Endocrinology* 146(11):4934-42.
56. Gáspár T, Katakam P, Snipes JA, Kis B, Domoki F, Bari F, Busija DW (2007) Delayed neuronal preconditioning by NS1619 is independent of calcium activated potassium channels. *J Neurochem* 105(4):1115-28.
 57. Gavello D, Rojo-Ruiz J, Marcantoni A, Franchino C, Carbone E, Carabelli V (2012) Leptin counteracts the hypoxia-induced inhibition of spontaneously firing hippocampal neurons: a microelectrode array study. *PLoS One* 7(7):e41530.
 58. Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST (2006) Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110(1):103-16.
 59. Ginsberg MD. (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55: 363–389.
 60. Glavaski-Joksimovic A, Rowe EW, Jefciniya K, Scanes CG, Anderson LL, Jefciniya S (2004) Effects of leptin on intracellular calcium concentrations in isolated porcine somatotropes. *Neuroendocrinology* 80(2):73-82.
 61. Golden PL, Maccagnan TJ, Pardridge WM. (1997) Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest* 99(1):14-8.
 62. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE (2002) Leptin stimulates osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* 85:825-836.
 63. Gribkoff VK, Starrett JE Jr, Dworetzky SI, Hewawasam P, Boissard CG, Cook DA, Frantz SW, Heman K, Hibbard JR, Huston K, Johnson G, Krishnan BS, Kinney GG, Lombardo LA, Meanwell NA, Molinoff PB, Myers RA, Moon SL, Ortiz A, Pajor L, Pieschl RL, Post-Munson DJ, Signor LJ, Srinivas N, Taber MT, Thalody G, Tronjnacki JT, Wiener H, Yeleswaram K, Yeola SW (2001) Targeting acute ischemia stroke with calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels. *Nat Med* (4):471-7.
 64. Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG. (2002) Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 143:239–246.

65. Grill HJ. (2006) Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. *Obesity (Silver Spring)* 14:216S–221S.
66. Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Bruning JC. (2005) Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding, *Nat. Neurosci* 8(10):1289–1291.
67. Gruen ML, Hao M, Piston DW, Hasty AH. (2007) Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293(5):C1481-8.
68. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6):3440-50.
69. Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP (2008) Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK/STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem* 283(3):1754-63.
70. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269(5223):543-6.
71. Hardingham GE, Bading H. (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 11(10):682-96.
72. Henry BA, Goding JW, Tilbrook AJ, Dunshea FR, Clarke IJ (2001) Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight, *J. Endocrinol* 168:67–77.
73. Hoda MR, Keely SJ, Bertelsen LS, Junger WG, Dharmasena D, Barrett KE (2007) Leptin acts as a mitogenic and antiapoptotic factor for colonic cancer cells. *Br J Surg* 94:346-354.
74. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. (1997) Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20):11073-8.

75. Horrigan FT, Aldrich RW. (2002) Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channel. *J Gen Physiol.* 120:267–305.
76. Hou S, Xu R, Heinemann SH, et al. (2008) Reciprocal regulation of the Ca²⁺ and H⁺ sensitivity in the SLO1 BK channel conferred by the RCK1 domain. *Nat Struct Mol Biol.* 15:403–410.
77. Hou S, Xu R, Heinemann SH et al (2008) The RCK1 high-affinity Ca²⁺ sensor confers carbon monoxide sensitivity to Slo1 BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4039–4043.
78. Hsueh H, He Y, Kastin AJ, Tu H, Markadakis EN, Rogers RC, Fossier PB, Pan W (2009) Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain* 132(Pt 4):889-902.
79. Hu H, Shao LR, Chavoshy S et al (2001) Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci* 21:9585–9597.
80. Hu S, Labuda MZ, Pandolfo M, et al. (2003) Variants of the KCNM3 regulatory subunit of maxi BK channels affects channel inactivation. *Physiol Genomics.* 15:191–198.
81. Hwa JJ, Ghibaudi L, Compton D, Fawzi AB, Strader CD. (1996) Intracerebroventricular injection of leptin increases thermogenesis and mobilizes fat metabolism in ob/ob mice. *Horm Metab Res* 28(12):659-63.
82. Hwa JJ, Fawzi AB, Graziano MP, Ghibaudi L, Williams P, Van Heek M, Davis H, Rudinski M, Sybertz E, Strader CD (1997) Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice, *Am. J. Physiol* 272:R1204–R1209.
83. Ikonomidou C, Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol.* 1(6):383-6.
84. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD (1950) Obese, a new mutation in the house mouse. *J hered.* 41(12):317-8.
85. Irving AJ, Wallace L, Durakoglugil D, Harvey J (2006) Leptin enhances NR2B-mediated N-methyl-D-aspartate responses via a mitogen-activated protein kinase-dependent process in cerebellar granule cells, *Neuroscience* 138:1137–1148.

86. Isaacson JS, Murphy GJ. (2001) Glutamate-mediated extrasynaptic inhibition: direct coupling of NMDA receptors to Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Neuron*. 31:1027–1034.
87. Jensen BS (2002) BMS-204352: a potassium channel opener developed for the treatment of stroke. *CNS Drug Rev* 8:353–360
88. Jo YH, Chen YJ, Chua SC Jr, Talmage DA, Role LW (2005) Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* 48(6):1055-66.
89. Kaczorowski GJ, Garcia ML (1999) Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol* 3:448–458.
90. Kiedrowski L (2007) NCX and NCKX operation in ischemic neurons. *AnnNY Acad Sci* 1099:383–395
91. King JT, Lovell PV, Rishniw M et al (2006) Beta2 and beta4 subunits of BK channels confer differential sensitivity to acute modulation by steroid hormones. *J Neurophysiol* 95:2878–2888.
92. Klose A, Huth T, Alzheimer C. (2008) 1-[6-[[[(17beta)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione (U73122) selectively inhibits Kir3 and BK channels in a phospholipase C-independent fashion. *Mol Pharmacol*. 74(5):1203-14.
93. Knaus HG, Schwarzer C, Koch RO et al (1996) Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J Neurosci* 16:955–963.
94. Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T (2003) Ghrelin directly interacts with neuro peptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin, *Diabetes* 52:948–956.
95. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A (1998) Severe early onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans, *Nat. Genet.* 19:155–157
96. Kumar V, Naik RS, et al (2006) Effects of chloride flux modulators in an in vitro model of brain edema formation. *Brain Res* 1122:222–229

97. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT (2006) Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* (Bethesda) 21:69-78.
98. Lee JE, Kwak J, Suh C, et al. (2006) Dual effects of nitric oxide on the large conductance calcium-activated potassium channels of rat brain. *J Biochem Mol Biol.* 39:91–96.
99. Lee US, Cui J. (2009) β -subunit-specific modulations of BK channels function by a mutation associated with epilepsy and dyskinesia. *J Physiol.* 587:1481–1498.
100. Li XL, Aou S, Oomura Y, Hori N, Fukunaga K, Hori T (2002) Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 113:607–615.
101. Liao Y, Kristiansen AM, Oksvold CP, Tuvnes FA, Gu N, Rundén-Pran E, Ruth P, Sausbier M, Storm JF (2010) Neuronal Ca²⁺-activated K⁺ channels limit brain infarction and promote survival. *PLoS One* 5(12):e15601.
102. Lieb W, Beiser AS, Vasan RS, Tan ZS, Au R, Harris TB, Roubenoff R, Auerbach S, DeCarli C, Wolf PA, Seshadri S (2009) Association of plasma leptin levels with incident Alzheimer disease and MRI measures of brain aging. *JAMA.* 302(23):2565-7
103. Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79(4):1431-568.
104. Lipton SA (2008) NMDA receptor activity regulates transcription of antioxidant pathways. *Nat Neurosci.* 11(4):381-2.
105. Liu J, Vaithianathan T, Manivannan K, et al. (2008) Ethanol modulates BKCa channels by acting as an adjuvant of calcium. *Mol Pharmacol.* 74:628–640.
106. Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E, Toro L (2006) MaxiK channel partners: physiological impact. *J Physiol* 570(Pt 1):65-72.
107. Lui G, Niu X, Wu RS, et al. (2010) Location of modulatory β subunits in BK potassium channels. *J Gen Physiol.* 135:449–459.
108. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. (2005) NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310(5748):683–685.
109. Ma Z, Lou XJ, Horrigan FT. (2006) Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels. *J Gen Physiol.* 127:309–28.

110. Mansour E, Pereira FG, Araújo EP, Amaral ME, Morari J, Ferraroni NR, Ferreira DS, Lorand-Metze I, Velloso LA (2006) Leptin inhibits apoptosis in thymus through a janus kinase-2-independent, insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 147:5470-5479.
111. Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2(12):679-89.
112. Marroquí L, Gonzalez A, Neco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, Nadal A, Quesada I. (2012) Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 49(1):R9-17.
113. Matochik JA, London ED, Yildiz BO, Ozata M, Caglayan S, DePaoli AM, Wong ML, Licinio J (2005) Effect of leptin replacement on brain structure in genetically leptin-deficient adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:2851–2854.
114. Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF (2000) Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301:173–187
115. Mattson MP (2003) Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 3:65–94
116. McDonald JK, Lumpkin MD, DePaolo LV (1989) Neuropeptide-Y suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized rats: possible site of action. *Endocrinology* 125:86–191.
117. Meera P, Wallner M, Toro L. (2000) A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:5562–5567.
118. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996) Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387(2-3):113-6.
119. Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, Aldrich RW. (2004) Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *J Biol Chem.* 279(35):36746-52.

120. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. (2013) Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol.* 698(1-3):6-18.
121. Miller JP, Holcomb J, Al-Ramahi I, de Haro M, Gafni J, Zhang N, Kim E, Sanhueza M, Torcassi C, Kwak S, Botas J, Hughes RE, Ellerby LM (2010) Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron.* 67(2):199-212.
122. Misonou H, Menegola M, Buchwalder L et al (2006) Immunolocalization of the Ca(2+)-activated K(+) channel Slo1 in axons and nerve terminals of mammalian brain and cultured neurons. *J Comp Neurol* 496:289–302.
123. Mistrík P, Moreau F, Allen JM. (2004) BiaCore analysis of leptin-leptin receptor interaction: evidence for 1:1 stoichiometry. *Anal Biochem.* 327(2):271-7.
124. Mongin AA (2007) Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology* 14:183–193
125. Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E (1999) Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140(12):5995-8.
126. Niedowicz DM, Studzinski CM, Weidner AM, Platt TL, Kingry KN, Beckett TL, Bruce-Keller AJ, Keller JN, Murphy MP (2012) Leptin regulates amyloid β production via the γ -secretase complex. *Biochim Biophys Acta.* 1832(3):439-44.
127. Oberhauser A, Alvarez O, Latorre R. (1988) Activation by divalent cations of a Ca²⁺-activated K⁺ channel from skeletal muscle membrane. *J Gen Physiol.* 92(1):67-86.
128. Okada Y, Shimizu T, Maeno E, et al (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol* 209:21–29.
129. Okubo Y, Sekiya H, Namiki S, Sakamoto H, Inuma S, Yamasaki M, Watanabe M, Hirose K, Iino M. (2010) Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(14):6526-31.
130. Olney JW, and Sharpe LG. (1969) Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166: 386–388.
131. O'Malley D, Irving AJ, Harvey J (2005) Leptin-induced dynamic alterations in the actin cytoskeleton mediate the activation and synaptic clustering of BK channels, *FASEB J.* 19:1917–1919.

132. O'Malley D, MacDonald N, Mizielinska S, Connolly CN, Irving AJ, Harvey J (2007) Leptin promotes rapid dynamic changes in hippocampal dendritic morphology. *Mol. Cell. Neurosci* 35:559–572.
133. Pannacciulli N, Del Parigi A, Chen K, Le DS, Reiman EM, Tataranni PA (2006) Brain abnormalities in human obesity: a voxel-based morphometric study. *Neuroimage* 31(4):1419-25.
134. Pannacciulli N, Le DS, Chen K, Reiman EM, Krakoff J (2007) Relationships between plasma leptin concentrations and human brain structure: a voxel-based morphometric study. *Neurosci. Lett.* 412:248–253.
135. Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol.* 7(1):39-47.
136. Papassotiropoulos J, Köhler R, Prenen J, Krause H, Akbar M, Eggermont J, Paul M, Distler A, Nilius B, Hoyer J. (2000) Endothelial K(+) channel lacks the Ca(2+) sensitivity-regulating beta subunit. *FASEB J.* 14(7):885-94.
137. Paz-Filho GJ, Babikian T, Asarnow R, Esposito K, Erol HK, Wong ML, Licinio J (2008) Leptin replacement improves cognitive development, *PLoS ONE* 3:e3098.
138. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 269(5223):540-3.
139. Piwonska M, Wilczek E, Szewczyk A, et al. (2008) Differential distribution of Ca²⁺-activated potassium channel beta4 subunit in rat brain: immunolocalization in neuronal mitochondria. *Neuroscience.* 153:446–60.
140. Poolos NP, Johnston D. (1999) Calcium-activated potassium conductances contribute to action potential repolarization at the soma but not the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 19:5205–5212.
141. Popovic V, Svetel M, Djurovic M, Petrovic S, Doknic M, Pekic S, Miljic D, Milic N, Glodic J, Dieguez C, Casanueva FF, Kostic V (2004) Circulating and cerebrospinal fluid ghrelin and leptin: potential role in altered body weight in Huntington's disease. *Eur J Endocrinol* 151(4):451-5.
142. Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Carbone F, La Rocca C, Formisano L, Matarese G. (2013) Role of Adipokines Signaling in the Modulation of T Cells Function. *Front Immunol.* 4:332.

143. Purdham DM, Zou MX, Rajapurohitam V, Karmazyn M (2004) Rat heart is a site of leptin production and action. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(6):H2877-84
144. Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, Speizer FE, Manson JE (1997) A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA* 277(19):1539-45.
145. Riediger T, Bothe C, Becskei C, Lutz TA (2004) Peptide YY directly inhibits ghrelin activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression, *Neuroendocrinology* 79:317–326.
146. Rundén-Pran E, Haug FM, Storm JF, Ottersen OP (2002) BK channel activity determines the extent of cell degeneration after oxygen and glucose deprivation: a study in organotypical hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 112(2):277-88.
147. Russo VC, Metaxas S, Kobayashi K, Harris M, Werther GA. (2004) Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 145(9):4103-12
148. Sailer CA, Kaufmann WA, Kogler M, et al. (2006) Immunolocalization of BK channels in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci.* 24:442–454.
149. Sanabria ERG, Su H, Yaari Y. (2001) Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol.* 532:205–216.
150. Sanchez M, McManus OB (1996) Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the highconductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharm* 35:963–968.
151. Sausbier M, Hu H, Arntz C et al (2004) Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activatedK⁺channel deficiency. *Proc Natl Acad SciUSA* 101:9474–9478.
152. Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA (2004) Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 18:1612-1614.
153. Schreiber M, Salkoff I. (1997) A novel calcium-sensing domain of the BK channel. *Biophys J.* 73:1355–1363.

154. Schröder RL, Jespersen T, Christophersen P, Strøbaek D, Jensen BS, Olesen SP (2001) KCNQ4 channel activation by BMS-204352 and retigabine. *Neuropharmacology* 44(4):553.
155. Schröder RL, Strøbaek D, Olesen SP, Christophersen P (2003) Voltage-independent KCNQ4 currents induced by (+/-)BMS-204352. *Pflugers Arch* 446(5):607-16.
156. Schwab BL, Guerini D, Didszun C, Bano D, Ferrando-May E, Fava E, Tam J, Xu D, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Carafoli E, Nicotera P (2002) Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.* 9(8):818-31.
157. Schwartz-Bloom RD, Sah R (2001) gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem* 77:353–371
158. Shanley LJ, Irving AJ, Harvey J (2001) Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity, *J. Neurosci.* 21 RC186.
159. Shanley LJ, Irving AJ, Rae MG, Ashford ML, Harvey J (2002 a) Leptin inhibits rat hippocampal neurons via activation of large conductance calcium-activated K⁺ channels, *Nat. Neurosci.* 5:299–300.
160. Shanley LJ, O'Malley D, Irving AJ, Ashford ML, Harvey J (2002 b) Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurons via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J Physiol* 545(Pt 3):933-44.
161. Sheldon JH, Norton NW, Argentieri TM (1997) Inhibition of guinea pig detrusor contraction by NS-1619 is associated with activation of BKCa and inhibition of calcium currents. *J Pharmacol Exp Ther* 283(3):1193-200.
162. Shi J, Krishnamoorthy G, Yang Y, et al. (2002) Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature.* 418:876–880.
163. Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH (1997) Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:4637–4641.
164. Signore AP, Zhang F, Weng Z, Gao Y, Chen J. (2008) Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *J Neurochem* 106(5):1977-90.
165. Song X, Su W, Chen L, et al. (2010) Functional expression of large-conductance Ca²⁺-activated potassium channels in lateral globus pallidus neurons. *Neuroscience.* 169:1548–1556.

166. Soriano FX, Hardingham GE (2007) Compartmentalized NMDA receptor signalling to survival and death. *J Physiol.* 584(Pt 2):381-7.
167. Spano P, Carruba MO, Pizzi M, Nisoli E. (2009) Leptin is induced in the ischemic cerebral cortex and exerts neuroprotection through NF-kappaB/c-Rel-dependent transcription. *Stroke.* 40(2):610-7
168. Strobaek D, Christophersen P, Holm NR et al (1996) Modulation of the Ca(2+)-dependent K⁺ channel, *hsl*, by the substituted diphenylurea NS 1608, paxilline and internal Ca²⁺. *Neuropharm* 35:903–914.
169. Su W, Song X, Ji JJ. (2010) Functional expression of a large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in mouse substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons. *Neurosci Lett.* 471:1–5.
170. Sun X, Yao H, Zhou D, et al. (2008) Modulation of *hsl* BK current inactivation by fatty acid esters of CoA. *J Neurochem.* 104:1394–1403.
171. Taga T, Kishimoto T. (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15:797-819.
172. Takahashi A, Camacho P, et al (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev* 79:1089–1125
173. Tang BL (2008) Leptin as a neuroprotective agent. *Biochem Biophys Res Commun* 368(2):181-5.
174. Tang XD, Xu R, Reynolds MF et al (2003) Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature* 425:531–535.
175. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83(7):1263-71.
176. Terao S, Yilmaz G, Stokes KY, Ishikawa M, Kawase T, Granger DN (2008) Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice. *Stroke* 39(3):943-50.
177. Udagawa J, Nimura M, Kagohashi Y, Otani H (2006) Leptin deficiency causes pycnotic change in fetal cingulate cortical cells, *Congenit. Anom.* 46:16–20.
178. Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R, Otani H (2007) Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development, *Congenit. Anom.* 47:77–83.

179. Uebele VN, Laggrutta A, Wade T, et al. (2000) Cloning and functional expression of two families of β -subunits of the large conductance calcium-activated K⁺ channels. *J Biol Chem.* 275:23211–23218.
180. Valerio A, Ghisi V, Dossena M, Tonello C, Giordano A, Frontini A, Ferrario M, Pizzi M, Spano P, Carruba MO, Nisoli E (2006) Leptin increases axonal growth cone size in developing mouse cortical neurons by convergent signals inactivating glycogen synthase kinase-3 β . *J. Biol. Chem.* 281:12950–12958.
181. Valerio A, Dossena M, Bertolotti P, Boroni F, Sarnico I, Faraco G, Chiarugi A, Frontini A, Giordano A, Liou HC, De Simoni MG, Spano P, Carruba MO, Pizzi M, Nisoli E. (2009) Leptin is induced in the ischemic cerebral cortex and exerts neuroprotection through NF-kappaB/c-Rel-dependent transcription. *Stroke.* 40(2):610-7.
182. Valverde MA, Rojas P, Amigo J et al (1999) Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285:1929–1931.
183. Vincent P, Mulle C. (2009) Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience.* 158(1):309-23.
184. Walker CD, Long H, Williams S, Richard D (2007) Long-lasting effects of elevated neonatal leptin on rat hippocampal function, synaptic proteins and NMDA receptor subunits, *J. Neurosci. Res.* 85:816–828
185. Walker SP, Rimm EB, Ascherio A, Kawachi I, Stampfer MJ, Willett WC (1996) Body size and fat distribution as predictors of stroke among US men. *Am J Epidemiol.* 144(12):1143-50.
186. Wallner M, Meera P, Toro L. (1996) Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca²⁺-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N-terminus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:14922–14927.
187. Wallner M, Meera P, Toro L. (1999) Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:4137–4142.
188. Wang B, Rothberg BS, Brenner R. (2006) Mechanism of β 4 subunit modulation of BK channels. *J Gen Physiol.* 127:449–465.

189. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L (1998) A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393(6686):684-8.
190. Wang L, Sigworth FJ. (2009) Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy. *Nature*. 461:292–295.
191. Wauman J, De Smet AS, Catteuw D, Belsham D, Tavernier J (2008) Insulin receptor substrate 4 couples the leptin receptor to multiple signaling pathways. *Mol Endocrinol* 22(4):965-77.
192. Waxman EA, Lynch DR (2005) N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist*. 11(1):37-49.
193. Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin XM, Chen J. (2007) Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 282(47):34479-91.
194. Wollmuth LP, and Sobolevsky AI. (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 27: 321–328.
195. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ (2002) Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* 35:67–86
196. Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons, *Nature* 282:503–505.
197. Wu Y, Xiong Y, Wang S, et al. (2009) Intersubunit coupling in the pore of BK channels. *J Biol Chem*. 284:23353–23363
198. Wu Y, Yang Y, Ye S, et al. (2010) Structure of the gating ring from the human large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Nature*. 466:393–397.
199. Xia XM, Zeng X, Lingle CJ. (2002) Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*. 418:880–884.
200. Xion ZQ, Saggau P, Stringer JL. (2000) Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. *J Neurosci*. 20:1290–1296.
201. Xu L, Rensing N, Yang XF, Zhang HX, Thio LL, Rothman SM, Weisenfeld AE, Wong M, Yamada KA. (2008) Leptin inhibits 4-aminopyridine- and

- pentylentetrazole-induced seizures and AMPAR-mediated synaptic transmission in rodents. *J Clin Invest.* 118(1):272-80.
202. Yacoubian TA, Slone SR, Harrington AJ, Hamamichi S, Schieltz JM, Caldwell KA, Caldwell GA, Standaert DG (2010) Differential neuroprotective effects of 14-3-3 proteins in models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* 1:e2.
203. Yan J, Olsen JV, Park KS et al (2008) Profiling the phospho-status of the BKCa channel alpha subunit in rat brain reveals unexpected patterns and complexity. *Mol Cell Proteomics* 7:2188–2198
204. Yang MJ, Wang F, Wang JH, Wu WN, Hu ZL, Cheng J, Yu DF, Long LH, Fu H, Xie N, Chen JG. (2010) PI3K integrates the effects of insulin and leptin on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298(2):E193-201.
205. Yaswen Y, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U (1999) Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* 5:1066–1070.
206. Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL, Choi DW (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278(5335):114-7.
207. Yu SP, Yeh C, Strasser U, et al (1999) NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis. *Science* 284:336–339
208. Yu SP, Choi DW (2000) Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9360-2.
209. Yu SP (2003) Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol* 70(4):363-86.
210. Yu SY, Wu DC, Liu L, Ge Y, Wang YT (2008) Role of AMPA receptor trafficking in NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the rat lateral amygdala. *J Neurochem.* 106(2):889-99.
211. Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, et al. (2010) Structure of the human BK channel Ca²⁺-activated apparatus at 3.0 Å resolution. *Science.* 329:182–187.
212. Yusifov T, Savalli N, Gandhi CS, et al. (2008) The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:376–381.

213. Zhang F, Yin W, Chen J. (2004) Apoptosis in cerebral ischemia: executional and regulatory signaling mechanisms. *Neurol Res* 26(8):835-45.
214. Zhang F, Wang S, Signore AP, Chen J (2007) Neuroprotective effects of leptin against ischemic injury induced by oxygen-glucose deprivation and transient cerebral ischemia. *Stroke* 38(8):2329-36.
215. Zhang G, Huang SY, Yang J, et al. (2010) Ion sensing in the RCK1 domain of BK channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:18700–18705.
216. Zhang X, Solaro CR, Lingle CJ. (2001) Allosteric regulation of BK channel gating by Ca²⁺ and Mg²⁺ through a nonselective, low affinity divalent cation site. *J Gen Physiol*. 118:607–636.
217. Zhou XB, Wulfsen I, Utku E, et al. (2011) Dual role of protein kinase C on BK channels regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:8005–8010.

Grazie a quanti hanno creduto in me, mi hanno consigliata, aiutata e sostenuta.

A loro va tutta la mia riconoscenza, la mia stima e il mio affetto.