

CONTROLLO NEURONALE DA REMOTO

(Nuovi approcci della ricerca sulla individuazione e monitoraggio dell'attività neuronale)

Va segnalato questo filone di ricerca che è stato introdotto presso i laboratori di biologia molecolare dell'Università di Berkeley e che ha aperto scenari nuovi, nel campo delle neuroscienze, per quanto definiscono (*ovviamente in prospettiva*) una tecnica che può consentire di individuare e controllare “da remoto” l'attività di specifiche famiglie neuronali.

Lo studio condotto dall'equipe del prof. Isacoff prevede l'impianto genetico di una proteina *artificiale*, sensibile alla luce, dentro i neuroni di un pesce zebra. Quando un raggio di luce, con una determinata lunghezza d'onda, illumina il pesce, questi *blocca* il suo normale riflesso di risposta al tocco fisico. Quando il pesce è illuminato da un secondo raggio di luce di lunghezza d'onda superiore, il riflesso di risposta al tatto viene ripristinato.

La proteina impiantata è stata chiamata *recettore del glutammato ionotropico a cancello luminoso* ed è stata creata in collaborazione con il chimico Dirk Trauner . Lo indicheremo in seguito come LiGluR (Light-gate ionotropic glutamate Receptor)

Il coordinatore dell'esperimento, il prof. Isacoff, ha dichiarato che con questa tecnica è possibile raggiungere tipi specifici di neuroni all'interno dei circuiti cerebrali come destinatari di una attivazione selettiva.

La capacità di stimolare selettivamente neuroni specifici, sia in tessuti isolati che in animali vivi, offre un grande vantaggio per i ricercatori per poter stabilire la esatta tipologia delle cellule neuronali che concorrono a determinare una particolare funzione cerebrale o un comportamento.

Fino ad ora, gli scienziati che hanno esplorato i legami tra le attività neuronali e le funzioni cerebrali si sono basati sugli studi anatomici delle reti neuronali, sia osservando ciò che accade quando le attività neuronali nelle aree locali risultano distrutte o bloccate, sia osservando l'attivazione dei neuroni in varie regioni associandola a funzioni specifiche.

Anche se tali approcci hanno dato modo di ricavare importanti informazioni sulle funzioni cerebrali, esse tuttavia richiedono analisi supplementari di *correlazione*. Sarebbe ora auspicabile che tali correlazioni fossero integrate da modelli in grado di evidenziare selettivamente l'attività dei neuroni specificatamente coinvolti.

La possibilità di manipolazione di tipi particolari di neuroni nel sistema nervoso ha presentato una sfida assai ardua. Ogni regione del cervello contiene circuiti complessi costituiti da *molte* specie diverse di neuroni, e mentre tecniche magnetiche o elettriche possono essere usate per stimolare singoli neuroni o gruppi locali di neuroni, tali tecniche sono incapaci di volgersi a tipi specifici di neuroni. Parimenti, *flash* di luce che attivano gruppi ristretti di neuroni possono velocemente liberare, in microsecondi, una esplosione di trasmettitori chimici, ma questi trasmettitori chimici sono generici per molte specie di neuroni

Per garantire quella selettività che è indispensabile per studiare il cervello, i ricercatori hanno avuto l'idea di introdurre nei neuroni un *recettore estraneo* o un canale controllabile da remoto. Un neurone è fondamentalmente un transistor che genera impulsi elettrici quando gli ioni attraversano la membrana cellulare in appositi canaletti. Isacoff e Trauner hanno adottato una combinazione di tecniche genetiche e chimiche per modificare un canale ionico di importanza cruciale per le neuroscienze – il recettore del glutammato ionotropico. Questo canale gioca una funzione essenziale nel consentire il passaggio dei segnali elettrochimici.

Isacoff e colleghi hanno aggiunto, al recettore del glutammato ionotropico, un cancelletto chimico attivabile dal mezzo luminoso, sintetizzato in laboratorio, che essi hanno soprannominato LiGluR. Una volta introdotto nel neurone o in altro tipo di cellula biologica, il recettore LiGluR funziona come un interruttore ottico, che può essere utilizzato per *accendere o spegnere una attività biologica specifica dentro la cellula*.

Gli interruttori ottici sono elementi particolarmente potenti nelle proteine, in quanto essi possono essere attivati da remoto con sistemi di controllo spaziali e temporali. Inoltre essi sono versatili, essendo applicabili in ogni contesto sperimentale ove sia possibile trasportare geni e luce.

Nella loro dimostrazione sulla efficacia della tecnologia dei recettori LiGluR sui neuroni, Isacoff e il suo gruppo per prima cosa hanno introdotto il gene che codificava il recettore del glutammato costruito in culture di neuroni dell'ippocampo. Poi essi hanno esposto le culture al processo di interruzione chimico-luminoso. Lampi di luce violetta di lunghezza d'onda pari a 380 nanometri della durata tra uno a cinque millisecondi – lo stesso periodo della attività neuronale nativa - sono stati usati per depolarizzare i neuroni così che il loro voltaggio diventasse ulteriormente positivo, provocando l'attivazione di potenziali d'azione. La depolarizzazione imitava i potenziali postsinaptici eccitatori evocati, normalmente generati dai neurotrasmettitori liberati da un altro neurone. Illuminando il neurone con una seconda somministrazione di luce blu, per una durata in termini di millisecondi, con la lunghezza d'onda di 488 nanometri, il neurone immediatamente si deattivava.

Il nuovo recettore LiGluR ha la singolare proprietà che, una volta attivato da un breve impulso luminoso, il canale rimarrà sempre aperto, nel buio, fino a quando non verrà rinchiuso da un successivo impulso luminoso. Questo fa sì che sarà possibile evocare una depolarizzazione a lungo termine (e sequenze di AP) con una minima esposizione alla luce – un altro vantaggio per le ricerche nel campo delle neuroscienze.

Dimostrare che il LiGluR è in grado anche fornire un controllo ottico sulla attività neuronale *in vivo* si è presentato come una ulteriore ardua sfida. Per prima cosa si poneva il problema di costruire un organismo transgenico in grado di esprimere LiGluR sufficiente da influenzare l'attività neuronale. Poi nascevano questioni del tipo se l'espressione di LiGluR potesse perturbare comportamenti e se potesse essere tossico per gli organismi viventi. Infine c'era il problema se l'interruttore chimico luminoso fosse in grado di trapassare l'animale e raggiungere correttamente i neuroni.

Isacoff ha scelto di lavorare con il pesce zebra, un pesciolino tropicale solitamente usato come modello per gli studi genetici dei vertebrati. Il gene del recettore LiGlu fu introdotto e la sua espressione fu poi pilotata in diversi set di neuroni nel cervello e nel midollo spinale mediante un programma di selettocoltura (cross-breeding).

Quando l'espressione del gene interessava neuroni preposti alla gestione delle sensazioni tattili, i ricercatori testarono la loro capacità di risposta al tocco, un comportamento riflessivo di retrazione stimolato da una pressione meccanica applicata sul corpo, sulla coda o sulle pinne del pesce. Il riflesso di ritrazione è essenziale per la sopravvivenza dell'organismo; è questo perciò il comportamento tra i più sensibili e geneticamente incorporati.

Dopo una illuminazione di circa 15 minuti con luce di una lampada a raggi ultravioletti – ultravioletti alla lunghezza d'onda di 365 nanometri – il comportamento di tutte le larve transgeniche si alterava. L'attivazione ottica dei recettori LiGlu *bloccava il riflesso di ritrazione* così che il pesce non rispondeva più se toccato con la punta di una pipetta. La risposta al tocco fu successivamente ripristinata con l'accensione di una luce blu per 30 secondi.

Per verificare che i transgeni non avessero alterato lo sviluppo o il sistema nervoso centrale del pesce zebra, Isacoff e colleghi testarono la capacità del pesce di nuotare liberamente – una abilità che presuppone l'integrità del sistema motorio, e la sua capacità di inseguire oggetti visibili, una risposta critica optomotoria. Tutto risultava nella norma.

Il recettore LiGlu è in grado di fornire analoghi controlli sulle risposte riflesse in gatti, ratti e altri animali. Per principio, questa tecnologia potrebbe dunque essere applicata su altri tipi di recettori inibitori ionotropici o su altre classi di neuroni. Futuri programmi di queste ricerche includono l'uso del recettore LiGlu per studiare la formazione di circuiti neuronali e per esplorare le basi neurologiche di determinati comportamenti.