



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN

"SCIENZE BIOMEDICHE"

CICLO XXIII

CÓORDINATORE Prof. Silvano Capitani

Caratterizzazione della corrente h in neuroni dopaminergici
della substantia nigra pars compacta

Settore Scientifico Disciplinare BIO/09

Dottorando

Dott.ssa Gambardella Cristina

Cristina Gambardella

Tutore

Prof. Belluzzi Ottorino

Ottorino Belluzzi

Anni 2008/2010

Indice

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUZIONE	5
1.1 CANALI HCN	5
1.1.1 Struttura dei canali HCN	
1.1.1.1 Segmenti transmembrana e sensori di voltaggio (transmembrane core)	
1.1.1.2 Cyclic Nucleotide Binding Domain e C-linker	
1.1.1.3 Dominio citosolico NH2 terminale	
1.2 HYPERPOLARIZATION-ACTIVATED CATION CURRENT	12
1.2.1 Apertura del canale mediante iperpolarizzazione di membrana	
1.2.2 Dipendenza dalla temperatura	
1.2.3 Selettività ionica	
1.2.4 Modulazione sostenuta dai nucleotidi ciclici	
1.2.5 Profilo farmacologico	
1.3 DIFFERENZE FUNZIONALI TRA I DIVERSI TIPI DI CANALI HCN	16
1.4 RUOLO FISIOLÓGICO DEI CANALI HCN NEI NEURONI	17
1.4.1 I_h e potenziale di membrana di riposo.	
1.4.2 Partecipazione della I_h nell'integrazione dendritica	
1.4.3 Ruolo della I_h nell'attività spontanea	
1.4.4 Funzione dei canali HCN nella trasmissione sinaptica	
1.5 NEURONI DOPAMINERGICI DELLA SUBSTANTIA NIGRA PARS COMPACTA E CORRENTE h	20
1.5.1 Substantia nigra	
1.5.2 Neuroni dopaminergici della substantia nigra, caratteristiche elettrofisiologiche	
1.5.3 Hyperpolarization-activated cation current nella substantia nigra pars compacta	
2 MATERIALI E METODI	28
2.1 ANIMALI	28
2.1.1 La Green Fluorescent Protein (GFP)	
2.1.1.1 Struttura	

2.1.2	Riconoscimento dei topi transgenici	
2.2	ISOLAMENTO DEL MESENCEFALO	31
2.2.1	Preparazione delle fettine	
2.3	SOLUZIONI E FARMACI	32
2.4	ELETTROFISIOLOGIA	33
2.4.1	Il patch-clamp	
2.4.2	Registrazioni elettrofisiologiche	
2.4.3	Il set up di elettrofisiologia	
2.4.4	Preparazione dei microelettrodi	
2.4.5	L'acquisizione e l'analisi dei dati	
3	RISULTATI	38
3.1	PROPRIETÀ CINETICHE DELLA I_h	38
3.1.1	Attivazione	
3.1.2	Deattivazione	
3.1.3	Potenziale di inversione	
3.2	EFFETTO DELLA TEMPERATURA	48
3.3	PROFILO FARMACOLOGICO	57
3.4	MODULAZIONE DELLA I_h AD OPERA DEL cAMP INTRACELLULARE	59
3.4.1	Forskolina	
3.4.2	Attivazione dei recettori dopaminergici D2	
3.4.3	Effetto della 5HT	
3.4.4	Effetto della noradrenalina	
3.5	RUOLO DELLA CORRENTE h SULL'AUTORITMICITÀ DEI NEURONI DOPAMINERGICI DELLA SNC	70
4	DISCUSSIONE	72
4.1	CAMBIAMENTO DEL PROFILO CINETICO DELLA CORRENTE h IN SEGUITO A VARIAZIONI TERMICHE	75
4.1.1	Profilo di attivazione della I_h	
4.1.2	Influenza delle condizioni termiche sulle costanti di tempo di attivazione	
4.1.3	Effetto della temperatura sul V_{50}	
4.1.4	Effetto della temperatura sul tempo di deattivazione	
4.2	MODULAZIONE DIRETTA DEL cAMP	78

4.3	EFFETTO DI ALCUNI NEUROTRASMETTITORI SULLA CORRENTE h	79
4.3.1	Attivazione dei recettori D2	
4.3.2	Effetto della 5HT	
4.3.3	Modulazione noradrenergica della I_h	
4.4	RUOLO DELLA CORRENTE h NELL'AUTORITMICITÀ DEI NEURONI DOPAMINERGICI DELLA SNc	82
5	CONCLUSIONI	84
6	BIBLIOGRAFIA	85

Indice delle abbreviazioni

4AP	4-aminopiridina
5HT	5-idrossi-triptamina, serotonina
AA	Aminoacidi
AADC	<i>L-Amino acid decarboxylase</i> , L-amino acido decarbossilasi
BBS	<i>Bicarbonate buffered saline</i> , soluzione salina tamponata con bicarbonato
cAMP	<i>3'-5'-cyclic adenosine monophosphate</i> , adenosina monofosfato ciclico
cGMP	<i>3'-5'-cyclic guanosine monophosphate</i> , guanosina monofosfato ciclico
CNBD	<i>Cyclic Nucleotide-Binding Domain</i> , dominio di legame ai nucleotidi ciclici
Ctrl	Controllo
D2	Recettore dopaminergico D2
DA	Dopamina, dopaminergico
DRG	<i>Dorsal root ganglion</i> , ganglio della radice dorsale
EPSPs	<i>Excitatory postsynaptic potential</i> , potenziali post sinaptici eccitatori
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HCN	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel</i> , canali ionici attivati dall'iperpolarizzazione del potenziale e regolati da nucleotidi ciclici
IBMX	<i>3-isobutyl-1-methylxanthine</i>
IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> , concentrazione necessaria per inibire il 50% dell'attività del canale
I_h	<i>Hyperpolarization activated cationic current</i> , corrente h
I_{Kir}	<i>Inwardly rectifying potassium current</i>
I_{inst}	Corrente istantanea
IPSPs	<i>Inhibitory postsynaptic potentials</i> , potenziali post sinaptici inibitori
I_{ss}	Corrente allo stato stazionario
NA	Noradrenalina
NE	Norepinefrina
PLC	<i>Phospholipase C</i> , fosfolipasi C
PIP2	<i>Phosphatidylinositol biphosphate</i> , fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato
Q10	Coefficiente di temperatura
SNC	Sistema nervoso centrale

SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
τ_{act}	Costante di tempo di attivazione
TEA	Tetraetilammonio
TH	<i>Tyrosine hydroxylase</i> , tirosina idrossilasi
TTX	Tetrodotossina
V_{50}	Potenziale a cui si raggiunge il 50% dell'attivazione massima
VMAT	<i>Vesicular Monoamine Transporter</i> , trasportatore vescicolare delle monoamine
V_{rest}	Potenziale di membrana di riposo
V_{rev}	Potenziale di inversione
VTA	<i>Ventral Tegmental Area</i> , area tegmentale ventrale

RIASSUNTO

1. Introduzione

I neuroni dopaminergici (DA) della substantia nigra pars compacta (SNc) sono tra i più studiati nel sistema nervoso centrale per la loro implicazione nella malattia del Parkinson. Essi presentano un ampio corredo di correnti voltaggio-dipendenti, tra le quali emerge una tipica corrente attivata da iperpolarizzazione, la I_h . Diversamente dalla maggior parte delle cellule nervose, i neuroni dopaminergici della SNc presentano una attività spontanea regolare dopo isolamento o riduzione degli input sinaptici, e non è, quindi, sorprendente che numerosi lavori abbiano indagato il ruolo della I_h nell'attività spontanea. Tuttavia il ruolo della I_h non è stato ancora ben compreso, dal momento che il blocco di questa corrente non sembra comportare nessuna alterazione significativa della frequenza di scarica.

Abbiamo, allora, riesaminato il problema studiando la corrente h , in fette sottili di cervello, in condizioni sperimentali che si differenziano dalla maggior parte degli studi precedenti per tre aspetti fondamentali:

- i) abbiamo utilizzato topi transgenici che esprimono una proteina reporter (GFP) sotto il promotore tirosina idrossilasi (TH), per identificare i neuroni DA della SNc;
- ii) abbiamo effettuato le registrazioni elettrofisiologiche a 37°C;
- iii) abbiamo eseguito la maggior parte degli esperimenti in condizioni di patch perforato al fine di lasciare inalterato l'ambiente fisiologico intracellulare.

2. Risultati

Il nostro primo obiettivo è stato quello di effettuare un'analisi dettagliata della dipendenza della cinetica e dell'ampiezza della I_h dalla temperatura. Il protocollo di attivazione della corrente h prevedeva una serie di comandi iperpolarizzanti della durata di 4s e le registrazioni erano effettuate a 27°C e 37°C. Abbiamo calcolato che il coefficiente di temperatura (Q10) per la variazione di ampiezza della corrente h è pari 3,73, mentre i valori di Q10 relativi alle velocità di attivazione e deattivazione sono rispettivamente pari a 10,8 e 3,17. Il V_{50} è di $-94,9 \pm 1,07$ mV a 27°C (n = 13) e $-84,2 \pm 1,31$ mV a 37°C (n = 18).

Abbiamo, successivamente, esaminato la modulazione da parte dei nucleotidi ciclici in condizioni di patch perforato a 37°C, in presenza di forskolina (10 μ M), un attivatore della adenilato ciclasi, e IBMX (0.1 mM), un inibitore delle fosfodiesterasi, i quali, insieme, inducono un

aumento della concentrazione intracellulare di adenosina monofosfato ciclico (cAMP). In queste condizioni abbiamo registrato un aumento dell'ampiezza I_h (da $-178,53 \pm 23,48$ pA in condizioni di controllo a $-227,01 \pm 34,17$ pA con forskolina a -130 mV, $n = 8$), uno spostamento del V_{50} di $+ 4,80 \pm 0,68$ mV ($n = 8$) e una riduzione delle costanti di tempo di attivazione di circa il 25%.

Dato che questa modulazione è il risultato di un'interazione diretta del cAMP con il canale, abbiamo studiato gli effetti sulla I_h di diversi neurotrasmettitori accoppiati a proteine Gi o Gs, in particolare abbiamo testato la dopamina, la serotonina (5-HT) e la noradrenalina (NA). Il quinpirolo, un agonista dei recettori dopaminergici D2 ($30 \mu\text{M}$, dopo 3 minuti di applicazione nel bagno), ha indotto una diminuzione dell'ampiezza della I_h del 15% a -130 mV ($n = 6$), mentre il sulpiride, un antagonista dei recettori dopaminergici D2 ($20 \mu\text{M}$), ne ha determinato un aumento ($n = 5$). L'effetto sulla I_h della 5HT ($100 \mu\text{M}$), dopo 3 minuti di applicazione nel bagno, è stato una riduzione dell'ampiezza del 20% ($n = 5$); al contrario, l'applicazione nel bagno della NA ($100 \mu\text{M}$), ne ha indotto un aumento di circa il 12% ($n = 8$).

Infine, abbiamo analizzato il ruolo della corrente h sull'autoritmicità. L'ivabradina ($10 \mu\text{M}$), bloccante del I_h , ha determinato una marcata iperpolarizzazione (circa -10 mV), che di fatto ha silenziato le cellule; tuttavia, questo effetto sull'attività spontanea era indiretto, poiché se la membrana era ripolarizzata, l'autoritmicità si ripristinava.

3. Conclusioni

Gli studi eseguiti a temperatura ambiente sul ruolo e le proprietà della corrente h nei neuroni dopaminergici della SNc sono scarsamente informativi perché, in queste condizioni sperimentali, la corrente è sottovalutata in ampiezza, velocità e, in ultima analisi, nella sua capacità di svolgere alcun ruolo a potenziali fisiologici. Le registrazioni elettrofisiologiche a 37°C , invece, restituiscono un profilo più accurato e veritiero della I_h .

La modulazione della corrente h ad opera di sistemi a secondo messaggero, un processo scarsamente esplorato nei neuroni dopaminergici della SNc, sembra essere rilevante, e suggerisce l'esistenza di diversi *pathways* importanti per il controllo dell'eccitabilità neuronale.

La corrente h è, in ultima analisi, molto importante nell'autoritmicità perché stabilizza il potenziale di membrana di riposo dei neuroni dopaminergici della SNc in uno stato depolarizzato, ma non ricopre un ruolo di principale nell'attività pacemaker.

Questi risultati sono interessanti perché aprono nuove prospettive sul ruolo del canale HCN nei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta.

ABSTRACT

1. Introduction

The substantia nigra pars compacta (SNc) dopaminergic neurons (DA) are among the best studied in the CNS for their implication in the Parkinson's disease. They present a complement of voltage-dependent currents, among which a typical hyperpolarization-activated current, I_h . Unlike most neurons in the brain, SNc dopaminergic neurons spontaneously produce repetitive regular activity after isolation or reduction of synaptic input, and it is therefore not surprising that numerous papers have investigated the role of I_h in the spontaneous activity. However, the role of I_h is still not well understood, since its block does not entail any significant alteration of firing frequency.

We have re-examined this problem studying the h-current in thin slices in experimental conditions that were different from most of the previous studies under three key aspects:

- i) we used transgenic mice expressing a reporter protein (GFP) under the tyrosine hydroxylase (TH) promoter to identify substantia nigra pars compacta DA neurons for a secure identification of the dopaminergic neurons;
- ii) we worked at 37°C;
- iii) most of the experiments were performed in perforated patch conditions, in order to avoid any alteration of the intracellular medium.

2. Results

Our first aim was to perform a detailed analysis of the dependence on temperature of the I_h kinetics and amplitude. The h-currents were elicited by 4 s hyperpolarizing pulses at 27°C and 37°C. The current amplitude showed temperature coefficients (Q_{10}) of 3.73, whereas the Q_{10} of fast activation and deactivation rates was 10.8 and 3.17, respectively. The V_{50} was -94.9 ± 1.07 mV at 27°C (n=13) and -84.2 ± 1.31 mV at 37°C (n=18).

We examined the modulation by cyclic nucleotides in perforated patch conditions at 37°C, in presence of forskolin 10 μ M, an activator of adenylate cyclase, and IBMX 0.1 mM, a phosphodiesterase inhibitor, leading to an increase in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentration. In these conditions we recorded an increase of the I_h amplitude (from -178.53 ± 23.48 pA in control conditions to -227.01 ± 34.17 pA with forskolin at -130 mV, n=8), a shift of V_{50} of $+ 4.80 \pm 0.68$ mV (n=8) and a decrease of the I_h activation time constant of about 25%.

As this modulation is known to result from a direct interaction cAMP with the channel, we investigated the effects on I_h of several Gi/Gs-protein-coupled neurotransmitters, and namely dopamine, serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA). Quinpirole, a dopaminergic D2 agonist (30 μ M, 3 min bath application), induced a 15 % decrease of the I_h amplitude at -130 mV (n=6), whereas sulpiride, a dopaminergic D2 antagonist (20 μ M), increased the current amplitude (n=5). The effect of 5HT (100 μ M, 3 min bath application) on I_h was a 20 % reduction of current amplitude (n=5), and bath application of NA (100 μ M) induced an increase of I_h amplitude of about 12 % (n=8).

Finally, we analyzed the influence of the h-current on autorhythmicity. Ivabradine 10 μ M, a blocker of I_h , induced a marked hyperpolarization (about -10 mV), which effectively silenced the cells, However, this effect on autorhythmicity was indirect, as if the membrane was re-polarized, the auto rhythmic pattern reappeared.

3. Conclusions

Studies on role and properties of the h-current in SNc dopaminergic neurons at room temperature are scarcely informative because, in these experimental conditions, the current is underestimated in amplitude, speed and, ultimately, in its ability to play any role at physiological potential. The electrophysiology recording at 37°C returns, however, a more realistic and accurate current profile.

The modulation of the h-current by second-messenger systems, a poorly explored process in SNc dopaminergic neurons, seems to be relevant, and suggests the existence of several important pathways for the control of neuronal excitability.

The h-current, finally, is very important for autorhythmicity because it maintains the SNc dopaminergic neurons in a depolarized state at rest, but it is not a primary player in the pacemaker process.

These results are interesting as they open new perspectives on the role of the HCN channel in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones.

1 INTRODUZIONE

La corrente h (da *hyperpolarization-activated*), è stata scoperta tra il 1970 e il 1980 dapprima nel nodo seno atriale (Yanagihara & Irisawa 1980, DiFrancesco et al. 1986, Brown et al. 1979) e successivamente in numerosi tipi di cellule nervose (Halliwell & Adams 1982, Maccaferri et al. 1993). Sin dalla sua identificazione, la I_h ha destato notevole interesse per le sue peculiari caratteristiche, in quanto si tratta di una corrente cationica mista, attivata da comandi iperpolarizzanti a potenziali più negativi di -50/-60 mV, e per il ruolo chiave che essa ricopre in molteplici funzioni fisiologiche, inclusa l'attività *pacemaker* cardiaca e neuronale, la determinazione del potenziale di membrana di riposo, la partecipazione ai processi di integrazione dendritica e trasmissione sinaptica, l'elaborazione dei segnali visivi nella retina.

La prima dettagliata caratterizzazione di questa corrente si deve a DiFrancesco e colleghi (DiFrancesco 1981, DiFrancesco et al. 1986, Brown & DiFrancesco 1980, Brown et al. 1979) che la denominarono I_f (*funny*), per sottolineare l'anomalo sviluppo di questa corrente che, a differenza di molte altre, era attivata dall'iperpolarizzazione. Le prime evidenze sulla presenza di una corrente equivalente nel sistema nervoso centrale furono riportate da Halliwell e Adams (Halliwell & Adams 1982) che la osservarono nelle cellule piramidali dell'ippocampo e la denominarono I_q da "*queer*". Da allora vari acronimi sono stati utilizzati anche se il termine I_h è ormai quello più largamente accettato per indicare la corrente a livello del sistema nervoso centrale.

I canali ionici responsabili della I_h sono gli HCN, il cui acronimo sta per "*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel*" (canali attivati da iperpolarizzazione e da nucleotidi ciclici) (Clapham 1998). Tale nome si riferisce alla particolare modalità di *gating* di questi canali, che si attivano a potenziali iperpolarizzanti e sono modulati dai nucleotidi ciclici presenti nell'ambiente cellulare.

1.1 Canali HCN

I geni che codificano per i canali HCN sono stati clonati da vertebrati e da alcuni invertebrati ma sono assenti in *Cænorhabditis elegans*, lieviti e procarioti.

Nei mammiferi, la famiglia dei canali HCN si compone di quattro membri (HCN1-HCN4).

Analisi effettuate sulle sequenze geniche suggeriscono che le varie isoforme HCN sono altamente conservate nelle loro regioni transmembrinarie e nel dominio di legame dei nucleotidi (identiche

per l'80 - 90%) (Santoro & Tibbs 1999, Kaupp & Seifert 2001). Tuttavia, i prodotti genici differiscono nelle loro regioni amino e carbossi-terminale.

1.1.1 Struttura dei canali HCN

I canali HCN sono complessi proteici costituiti da quattro subunità che si arrangiano a formare un poro centrale. La combinazione di queste subunità dà vita a quattro differenti omotetrameri (HCN1, HCN2, HCN3, HCN4) con distinte proprietà biofisiche (Ishii et al. 1999, Santoro et al. 1998). Esistono, tuttavia, evidenze che la varietà dei canali HCN sia maggiore in vivo a causa della formazione di eterotetrameri (Much et al. 2003, Altomare et al. 2003, Ulens & Tytgat 2001).

Ciascuna subunità dei canali HCN (figura 1) consiste di tre principali moduli strutturali:

- un *transmembrane core*,
- un dominio COOH terminale,
- un dominio citosolico NH₂ terminale.

1.1.1.1 Segmenti transmembrana e sensori di voltaggio (*transmembrane core*)

La struttura proteica quaternaria dei canali HCN è costituita da subunità, o monomeri, la cui disposizione tetramerica delinea il corpo del canale e delimita un poro centrale; questo assetto strutturale rappresenta un modello ubiquitario nella superfamiglia dei canali voltaggio-dipendenti (Gulbis et al. 1999, Ruta et al. 2003, Yu & Catterall 2003). Poiché i canali HCN, come tutte le altre tipologie di canali ionici, attraversano integralmente la membrana cellulare, le relative subunità presentano un'estesa regione transmembrana formata da aminoacidi idrofobici.

Il nucleo transmembranario delle subunità dei canali HCN è costituito da sei segmenti di α -elica (S1-S6). Questa topologia transmembrana è altamente omologa a quella presente nei canali K⁺ voltaggio-dipendenti, Na⁺ voltaggio-dipendenti e Ca²⁺ voltaggio-dipendenti.

La sensibilità dei canali HCN alle variazioni di potenziale, ed il conseguente meccanismo di apertura e di chiusura del canale, è direttamente correlato al movimento, sia traslazionale che rotazionale, dell' α -elica S4 attraverso lo spessore della membrana (Broomand et al. 2003). Il dominio S4 agisce come "sensore di voltaggio" essendo l'unico segmento transmembrana che contiene le cariche necessarie per produrre una tale sensibilità al voltaggio. Esso, infatti, presenta

il motivo tipico del sensore di potenziale costituito da 8 - 10 residui di Arg e Lys spazati regolarmente ogni tre posizioni.

Recentemente, Larsson e colleghi (Mannikko 2002) hanno utilizzato un metodo definito *Substituted cysteine accessibility* per dimostrare che il segmento S4 presente nel spHCN (canale HCN clonato dallo sperma di riccio di mare) effettivamente si muove in risposta all'iperpolarizzazione. Comandi iperpolarizzanti innescano un movimento verso l'interno del segmento S4, mentre comandi depolarizzanti ne determinano uno spostamento verso l'esterno provocando il traslocamento di residui di S4 attraverso la membrana, dalla superficie interna della membrana a potenziali iperpolarizzati ad una posizione esterna a potenziali depolarizzati.

Ciascuna subunità HCN contiene, inoltre, un *pore loop* tra S5 e S6 caratterizzato da una sequenza glicina (G), tirosina (Y), glicina (G) (Ludwig et al. 1999, Wahl-Schott & Biel 2009, MacKinnon 2004), che rappresenta il filtro di selettività. L'individuazione della tripletta GYG nei canali HCN, suscitò una notevole sorpresa tra i ricercatori, poiché questa stessa sequenza determina, nei canali potassio, la selettività per il solo ione K^+ . Infatti, studi elettrofisiologici, avevano già dimostrato che la corrente generata da questi canali era dovuta sia da ioni K^+ che da ioni Na^+ , e che, quindi, si trattava di una corrente cationica mista (Ho et al. 1994, Ludwig et al. 1998, Mayer & Westbrook 1983, Budde et al. 1994).

Gli studi di mutagenesi sito specifica, che miravano ad identificare i residui aminoacidici capaci di conferire queste uniche proprietà di permeazione, non hanno, allo stato attuale, portato a conclusioni certe.

Oltre all' α -elica S4 e all'ansa P, nella regione transmembrana si possono identificare altri elementi importanti per la corretta funzionalità dei canali HCN:

- una breve sequenza *S4-S5linker* (Chen et al. 2001), situata nel versante citoplasmatico del canale, che si ritiene abbia un ruolo cruciale nel definire la voltaggio-dipendenza del meccanismo di *gating* (Prole & Yellen 2006, Chen et al. 2001).
- Un residuo di istidina, His321, tra la fine dell' α -elica S4 e l'inizio del *S4-S5linker*, capace di legare un protone in seguito all'aumento del pH intracellulare e per tale motivo definito sensore del pH (Zong et al. 2001). Una variazione del pH intracellulare dal valore fisiologico ($pH_i = 7.2$) verso un valore più acido ($pH_i = 6.0$) o più alcalino ($pH_i = 9.0$), comporta uno spostamento della voltaggio-dipendenza d'attivazione dei canali HCN2 pari a circa 10 mV, rispettivamente, verso potenziali più negativi o più positivi, e comporta anche un'evidente modificazione della cinetica d'apertura del canale (Munsch & Pape 1999, Zong et al. 2001).

- Un residuo di asparagina altamente conservato, N380, posizionato tra il segmento S5 e l'elica del poro, che rappresenta il sito di glicosilazione del canale (Much et al. 2003). Questa modificazione post-traslazionale, si dimostra fondamentale per la corretta espressione dei canali HCN nella superficie cellulare (Much et al. 2003).

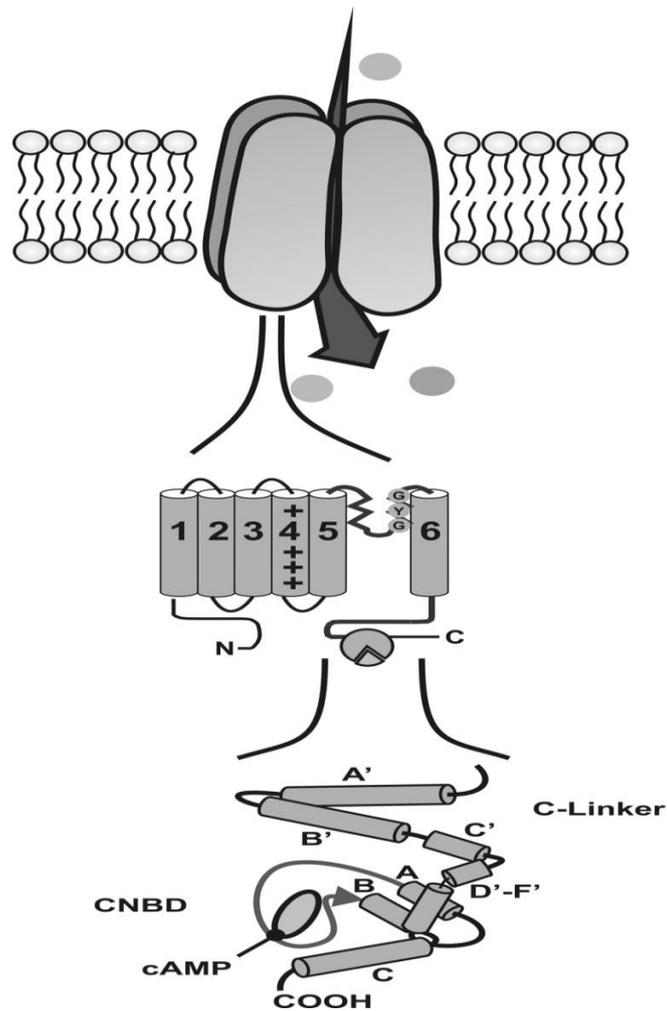


Figura 1: Struttura dei canali HCN (Tratta da C. Wahl-Schott and M. Biel; Cellular and Molecular Life Sciences 66 (2009) 470 – 494).

In alto: i canali HCN sono tetrameri. Un monomero è costituito da sei segmenti transmembrana (S1-S6), che includono il sensore di voltaggio (S4), il filtro di selettività e la regione del poro tra S5 e S6. Il tratto C-terminale del canale contiene il dominio di legame dei nucleotidi ciclici (CNBD, al centro).

In basso: il dominio C-terminale del canale è composto da due regioni: il dominio C-linker, costituito da sei α -eliche (A'-F') e il CNBD, che segue il dominio C-linker e si compone di 3 α -eliche (A-C) con un β -roll tra le eliche A e B-(freccia).

1.1.1.2 *Cyclic Nucleotide Binding Domain e C-linker*

La sensibilità ai nucleotidi ciclici dei canali HCN è mediata dalla porzione citosolica C-terminale.

Il dominio COOH terminale è composto da un *C-linker* e da *Cyclic Nucleotide-Binding Domain* (CNBD).

Il *C-linker* è costituito da 80 AA, che formano sei α -eliche (A'-F'), e rappresenta il punto di connessione tra l'estremità carbossilica dell'elica S6 e il dominio CNBD.

Il dominio di legame dei nucleotidi ciclici è una sequenza di 120 aminoacidi, altamente conservata, costituita da una prima α -elica (elica A), seguita da un β -roll costituito da otto foglietti β antiparalleli (otto *stranded antiparallel β -roll*) (β 1- β 8), una breve elica B e una lunga elica C. Le tre α -eliche e le otto catene a β -roll, costituiscono una struttura a forma di "tasca" (figura 2).

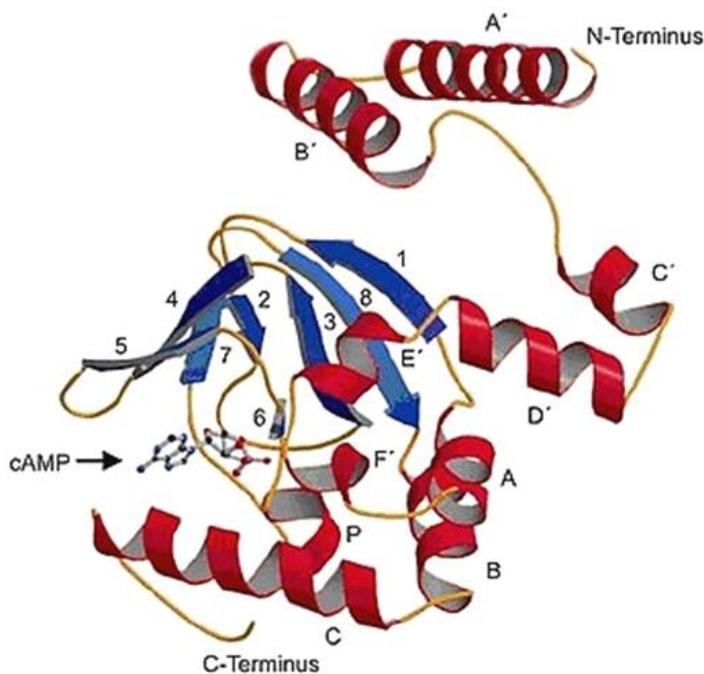


Figura 2: Struttura proteica del complesso C-linker – CNBD. Le sei α -eliche del tratto C-linker (A'-F') e le tre α -eliche del dominio CNBD (A-C) sono rappresentate in rosso, le otto catene antiparallele, con conformazione a β -roll, sono evidenziate in blu. Il sito di legame dei nucleotidi ciclici, presente nel dominio CNBD, è indicato da una freccia..

La tasca in cui si lega il cAMP è formata da un piccolo numero di residui disposti nell'interfaccia tra il β -roll e l'elica C. Tecniche cristallografiche hanno fornito immagini ad alta risoluzione del complesso *C-linker* – CNBD dei canali HCN2, nella forma legata al cAMP ed al cGMP (Zagotta et al. 2003, Flynn et al. 2007) e da esse è emerso che il sito di legame del cAMP o del cGMP, consiste in una struttura a forma di "tasca" situata tra il tratto β -roll e l' α -elica C del dominio CNBD, in cui sono presenti sette residui AA che interagiscono con il ligando. Tre di essi sono localizzati nel tratto β -roll (R591, T592, E582) e quattro nella α -elica C (R632, R635, I636, K638) (Zhou & Siegelbaum 2007). Tra questi residui solo R632, appartenente all'elica C, si ritiene che svolga un

ruolo chiave nel modulare l'efficacia con cui i nucleotidi ciclici destabilizzano lo stato chiuso, rendendo l'attivazione del canale più favorita energeticamente (Zhou & Siegelbaum 2007).

Esperimenti di delezione dell'elica C (Wainger et al. 2001) hanno evidenziato non solo l'indispensabile ruolo della stessa nel legame dei nucleotidi ciclici (figura 3), ma anche che, pur essendo uno solo dei quattro residui dell'elica (R632) a determinare l'efficienza con cui i nucleotidi ciclici facilitano l'apertura del canale, alla loro simultanea presenza si deve la maggiore affinità nei confronti di cAMP piuttosto che di cGMP. Infatti, cAMP e cGMP si legano in modo sostanzialmente identico al dominio CNBD, l'unica differenza consiste nella conformazione sin-anti, che i due nucleotidi ciclici presentano una volta legati al dominio: il cAMP si lega in conformazione anti e il cGMP in sin.

Al fine di identificare il ruolo del CNBD sono stati condotti degli esperimenti di delezione di tale dominio (Wainger et al. 2001) (figura 3), da essi è emerso che il CNBD è un dominio autoinibitorio. La sua eliminazione mima gli effetti di concentrazioni saturanti di cAMP (slittamento della voltaggio dipendenza verso potenziali più positivi). Ciò indica che il legame dei nucleotidi ciclici stimola l'attivazione del canale rimuovendo l'azione inibitoria del Dominio di legame, motivo per il quale in assenza di cAMP si ha uno spostamento della curva di attivazione verso potenziali molto negativi.

L'esatta sequenza degli eventi molecolari che portano alla modulazione del *gating*, non è stata ancora totalmente chiarita. Esperimenti di modellizzazione molecolare e cristallografia (Zagotta et al. 2003) della subunità citoplasmatica dei canali HCN, hanno suggerito che tra il dominio CNBD ed il tratto C-linker vi sia un continuo condizionamento strutturale, che rende possibile la propagazione delle modificazioni conformazionali che originano nel dominio CNBD. Il legame del cAMP o del cGMP con il dominio CNBD, determina in quest'ultimo una modificazione strutturale, che si propaga dal C-linker al segmento transmembrana S6, che delimita il poro permeativo. Una variazione conformazionale del C-linker si riflette, quindi, in una diversa disposizione del segmento S6, ed in generale, si traduce in un riarrangiamento del modulo permeativo del canale che passa da una conformazione *compatta* a una conformazione *rilassata*, in cui le α -eliche A' e B' sono rivolte verso il poro, e quindi in una maggiore propensione al meccanismo di apertura voltaggio-dipendente (Craven et al. 2008).

Wainger e collaboratori (2001) hanno anche dimostrato che alla base del diverso profilo di attivazione voltaggio dipendente e di risposta a cAMP, riscontrati tra HCN1 e HCN2 vi è il potere inibitorio del CNBD che è maggiore nel secondo rispetto al primo. Di conseguenza il *gating* di

HCN2 è spostato di 20 mV in senso iperpolarizzante rispetto a quello di HCN1, e le curve di attivazione in presenza di cAMP si spostano di +20 mV in HCN2 e di +5 mV in HCN1.

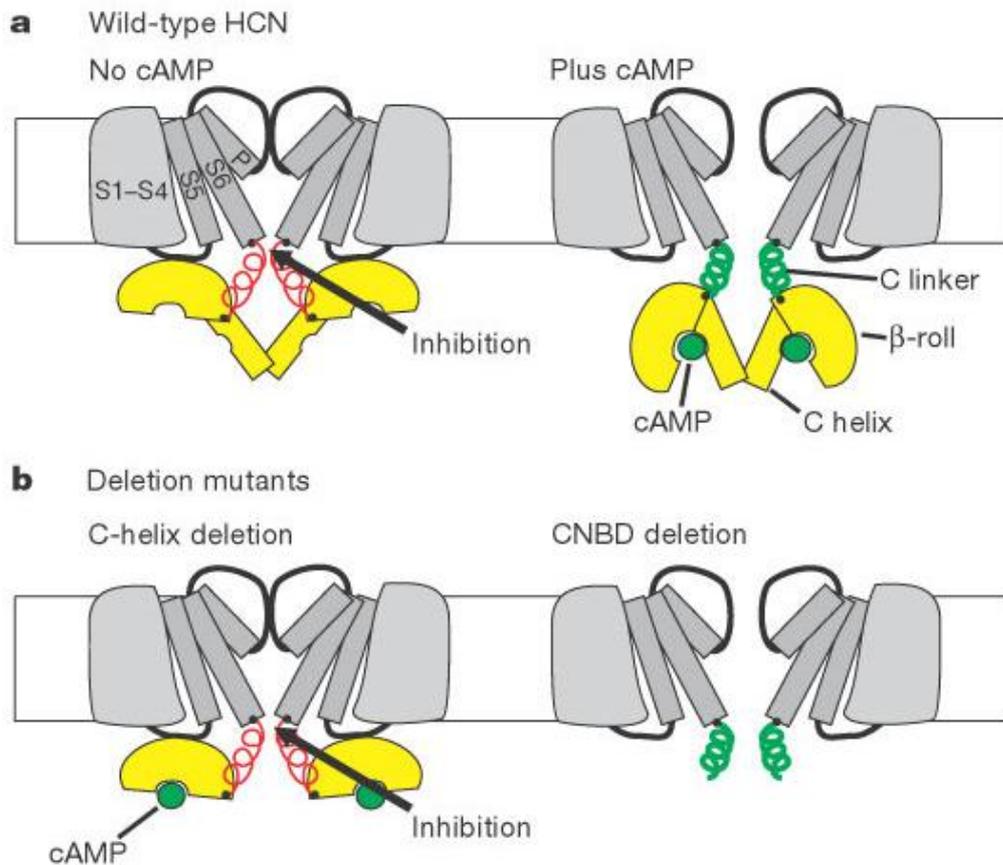


Figura 3: Modello della modulazione cAMP-dipendente dell'attivazione dei canali HCN (tratta da Wainger et al. 2001).

a, Effetto del cAMP sul canale HCN wild-type. La figura illustra due (adiacenti) delle quattro subunità che costituiscono un canale HCN omodimerico. Il nucleo transmembranario (S1 - S6) è indicato in grigio. Le spirali rappresentano il C linker citoplasmatico che lega il segmento transmembrana S6 al dominio di legame dei nucleotidi ciclici (CNBD), costituito da un sottodominio β -roll (regione gialla semicircolare) e C elica (cilindro giallo). A sinistra, in assenza di cAMP, il sottodominio β -roll inibisce il gating del nucleo transmembranario. A destra, in presenza di cAMP (cerchio verde), un cambiamento conformazionale della CNBD porta a una diminuzione della tensione sul C-linker (indicato in verde), che promuove l'apertura del canale.

b, Sinistra, l'eliminazione dell'elica C impedisce al cAMP di provocare il cambiamento conformazionale del CNBD. A destra, la delezione dell'intero CNBD blocca l'inibizione del gating.

1.1.1.3 Dominio citosolico NH₂ terminale

La sequenza aminoacidica del dominio citosolico NH₂ terminale varia enormemente tra i vari tipi di canali HCN.

Da studi di allineamento (Tran 2002) della sequenza AA del dominio amino terminale delle diverse isoforme di canali HCN è emerso che esiste una sequenza di 52 AA con una percentuale di identità del 90% collocata in posizione immediatamente adiacente al dominio transmembrana S1 che sembrerebbe essere importante per il co-assemblaggio delle varie subunità del canale.

1.2 *Hyperpolarization-activated cation current*

I canali (HCN), presentano quattro principali caratteristiche:

- sono attivati da iperpolarizzazione,
- sono influenzati dalle condizioni termiche,
- sono permeabili sia a ioni sodio (Na^+) che potassio (K^+),
- la loro attivazione è facilitata dalla diretta interazione del cAMP,
- hanno uno specifico profilo farmacologico.

1.2.1 **Apertura del canale mediante iperpolarizzazione di membrana**

Generalmente la I_h è attivata da comandi iperpolarizzanti a potenziali più negativi di -50/-60 mV e non presenta un'inattivazione voltaggio-dipendente.

Le cinetiche di attivazione e deattivazione sono abbastanza complesse. L'apertura del canale può essere empiricamente descritta da una funzione esponenziale singola o doppia, a seconda del tipo di cellula. La cinetica esponenziale risulta variare molto da tipo a tipo cellulare. Ad esempio nel cuore l'andamento temporale di attivazione è piuttosto lento, richiede, infatti, alcuni secondi per raggiungere uno stato stazionario. Nei neuroni dell'ippocampo CA1, invece, la cinetica di attivazione è molto rapida, con costanti di tempo di attivazione (τ_{act}) dell'ordine di 30-60 ms (Robinson & Siegelbaum 2003, Pape 1996).

La ragione di tale diversità è attribuibile a numerosi fattori: in primis riflette le proprietà intrinseche di attivazione delle differenti isoforme di HCN (Paragrafo 1.3) presenti in cellule dissimili; in secondo luogo la I_h è molto sensibile alle condizioni sperimentali (pH, temperatura, concentrazione ionica delle soluzioni, configurazione di patch) e al microambiente cellulare (concentrazione di fattori intracellulari).

La cinetica di attivazione voltaggio dipendente è descritta da una sigmoide, che può essere interpolata con una funzione di Boltzmann, da cui si ricava il valore di potenziale al quale si raggiunge il 50% dell'attivazione massima (V_{50}), che è compreso in un *range* da -70 a -100mV, e la ripidezza della relazione corrente - voltaggio (*slope*). Si tratta in ogni caso di parametri non raffrontabili tra i vari tipi cellulari.

1.2.2 Dipendenza dalla temperatura

L'attività funzionale di un certo numero di canali ionici è molto sensibile alle variazioni termiche.

In particolare, effetti importanti della temperatura sono stati documentati per un certo numero di canali ionici, quali gli Shaker (K^+), canali cloro CLC-0, canali calcio di tipo L e canali TRP (*transient receptor potential*) (Rodriguez et al. 1998, Allen & Mikala 1998, Pusch et al. 1997, Voets et al. 2004).

Per descrivere la dipendenza di una variabile di processo dalla temperatura si calcola il coefficiente di temperatura Q10, che è una misura della variazione della grandezza considerata per un aumento di temperatura di 10 ° C.

Il fattore Q10 è pari a $(R_2/R_1)^{10/(T_2-T_1)}$, dove R è la variabile di processo (una costante di tempo, o una ampiezza, o un potenziale di metà attivazione, ecc..) e T è la temperatura in gradi Celsius o kelvin.

La misura quantitativa degli effetti della temperatura su un determinato canale è, quindi, spesso descritta dal Q10, che denota la variazione di grandezza di una determinata variabile di processo per una variazione di temperatura di dieci gradi centigradi.

E' stato dimostrato che anche la I_h è modificata dalle condizioni termiche. Cuevas (1997) ha illustrato che, nei neuroni dei gangli cardiaci, l'ampiezza e la costante di tempo della I_h sono sensibili alla temperatura con un Q10 rispettivamente di 2.2 e 3 (Cuevas et al. 1997).

Studi sulla corrente h effettuati su muscolatura liscia di budello hanno rivelato che con l'aumento della temperatura si verifica uno spostamento in senso depolarizzante della relazione corrente-voltaggio. Il coefficiente di temperatura (Q10), per tale fenomeno è compreso in un intervallo di 2-4 (Yanagida et al. 2000). Nei neuroni dei gangli della radice dorsale DRG il Q10 della I_h per la conduttanza assoluta è 1.32 ± 0.01 (Pena et al. 2006).

Anche nei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta è stato dimostrato che i cambiamenti di temperatura hanno effetti sulla cinetica di attivazione della I_h (Watts et al. 1996).

E' quindi innegabile che la temperatura alla quale sono eseguiti gli esperimenti rappresenti uno dei fattori limitanti nella comparazione dei risultati, dal momento che tale parametro modifica la cinetica della I_h .

1.2.3 Selettività ionica

I canali HCN hanno un'insolita selettività ionica, conducono, infatti, sia ioni Na^+ che K^+ nelle normali condizioni fisiologiche.

Il rapporto di permeabilità del canale, $P_{\text{K}}:P_{\text{Na}}$ varia all'interno di un intervallo compreso tra 3:1 e 5:1, determinando valori del potenziale di inversione tra -25 e -40 mV (Ho et al. 1994, Ludwig et al. 1998, DiFrancesco 1981, Robinson & Siegelbaum 2003, Budde et al. 1994).

Un'altra caratteristica insolita del canale è che sia l'ampiezza di corrente che il rapporto $P_{\text{K}}:P_{\text{Na}}$ sono molto sensibili alla concentrazione extracellulare del K^+ . La sua riduzione, oltre i normali livelli extracellulari (2-4 mM), può comportare una drastica diminuzione dell'ampiezza di corrente, mentre un aumento della concentrazione extracellulare di K^+ causa un forte incremento dell'ampiezza di corrente e una selettività leggermente ridotta per il K^+ verso il Na^+ (Frace et al. 1992, DiFrancesco 1982). L'interdipendenza della permeazione tra Na^+ e K^+ è dimostrata anche dalla constatazione che il canale HCN conduce poco se vi è solo Na^+ , in assenza di K^+ (Bader & Bertrand 1984). Per contro, in seguito alla riduzione dei livelli extracellulari di Na^+ , la modificazione della corrente è semplicemente il risultato dell'alterata *driving force* (DiFrancesco 1981, Pape 1996).

La sensibilità alla concentrazione extracellulare di K^+ fornisce un importante mezzo in quanto la caratterizzazione di tale corrente è spesso ostacolata dalla sua piccola ampiezza e dalla sovrapposizione della stessa a correnti ioniche che si attivano nello stesso *range* di potenziali (*inward rectifying potassium current, persistent voltage-gated sodium current, ecc.*).

Ci sono recenti evidenze di una piccola ma significativa permeabilità al calcio di questi canali (Yu et al. 2004, Yu et al. 2007), la cui rilevanza funzionale non è ancora stata chiarita.

1.2.4 Modulazione sostenuta dai nucleotidi ciclici

Un carattere distintivo della I_h è la forte influenza che i nucleotidi ciclici esercitano su essa. Ormoni e neurotrasmettitori che elevano i livelli di cAMP facilitano l'attivazione della I_h mediante uno spostamento della curva di attivazione verso potenziali depolarizzati (Bobker & Williams 1989, Garratt et al. 1993, Larkman et al. 1995, Larkman & Kelly 1992, Larkman & Kelly 1997, McCormick & Pape 1990, Pape & McCormick 1989, Brown et al. 1979, DiFrancesco & Tortora 1991). Come risultato di ciò, la I_h si attiva in modo più completo e più rapidamente. Al contrario,

neurotrasmettitori che riducono la concentrazione di cAMP deprimono l'attivazione della I_h , causando uno spostamento della sua curva di attivazione verso potenziali ancora più negativi.

A DiFrancesco e Tortora (DiFrancesco & Tortora 1991) si deve la sorprendente scoperta che l'effetto stimolante dei nucleotidi ciclici sulla I_h non richiede la fosforilazione di una proteina ma è causato da una interazione diretta del nucleotide ad un sito di legame presente sulla faccia citoplasmatica del canale (CNBD).

La I_h può essere anche modulata da cGMP, ma l'affinità di questo nucleotide ciclico per il sito di legame è 10 - 100 volte inferiore rispetto a quella del cAMP (Ludwig et al. 1998).

1.2.5 Profilo farmacologico

La corrente h è sensibile a basse concentrazioni di cesio (1-2 mM) ma è insensibile al bario e al tetraetilammonio (TEA).

Esistono un certo numero di composti organici capaci di bloccare in maniera specifica tale corrente: ZD7288 (Gasparini & DiFrancesco 1997) e S-16257 (ivabradina) (Bucchi et al. 2002, Bucchi et al. 2006).

Recentemente, l'ivabradina (S16257, prodotta da Servier, nome commerciale di Procoralan) è stata introdotta in uso clinico come il primo bloccante terapeutico della I_h . L'ivabradina blocca la I_h cardiaca a concentrazioni micromolari, ed è stata approvata anche per il trattamento dell'angina pectoris cronica. Gli studi elettrofisiologici hanno rivelato che l'ivabradina agisce accedendo ai canali HCN dalla parte intracellulare ed esercitando un blocco della corrente uso-dipendente (Bucchi et al. 2002). Il meccanismo del blocco del canale da parte dell'ivabradina è stato esaminato in sistemi eterologhi di espressione dei canali HCN (Bucchi et al. 2006, Thollon et al. 2007). S-16257 blocca i canali HCN4 e HCN1 con una concentrazione IC_{50} di circa 1-2 μ M. È interessante notare che l'ivabradina agisce come bloccante del canale aperto in HCN4, mentre il blocco di HCN1 richiede che i canali siano chiusi o in un stato di transizione tra configurazione aperta e chiusa (Bucchi et al. 2006). Le determinanti strutturali alla base di questa differenza sono ancora sconosciute.

ZD7288 è, probabilmente, il bloccante sperimentalmente più usato. ZD7288 blocca il canale dal sito intracellulare (Shin et al. 2001) ma il blocco è uso indipendente (BoSmith et al. 1993). Di recente, sono stati individuati due residui aminoacidici nell'elica S6 di HCN2 (A425 e I432) che conferiscono alta affinità di legame a ZD7288 (Cheng et al. 2007).

Fatta eccezione per l'ivabradina, antagonisti dei canali HCN non sono stati introdotti in terapia. Il notevole ostacolo al loro utilizzo è dato dalla non sufficiente specificità per i canali del nodo senoatriale (soprattutto HCN4); molti di essi possono, infatti, bloccare anche la I_h neuronale in diverse regioni del sistema nervoso. Per esempio, per diversi di questi farmaci sono stati segnalati disturbi visivi che derivano dal blocco della I_h retinica (Cervetto et al. 2007, Demontis et al. 2009). Inoltre, alcuni dei bloccanti possono interagire con altri canali ionici: recentemente è stato dimostrato che ZD7288 inibisce la corrente calcio di tipo T nei neuroni piramidali ippocampali di ratto (Sanchez-Alonso et al. 2008).

Considerato, però, il ruolo fondamentale dei canali HCN nel pacemaker cardiaco, essi rappresentano importanti bersagli per lo sviluppo di farmaci da utilizzare nel trattamento delle aritmie cardiache e della cardiopatia ischemica.

1.3 Differenze funzionali tra i diversi tipi di canali HCN

E' possibile distinguere le quattro isoforme pure (omotetrameri) dei canali HCN in base a:

- costanti di tempo di attivazione (τ_{act}),
- voltaggio dipendenza dello stato stazionario,
- modulazione da parte dei nucleotidi ciclici.

Nonostante non sia possibile una classificazione rigida e assoluta dei quattro canali HCN, in quanto le differenze riportate, in una più che ampia letteratura, potrebbero essere attribuite a condizioni sperimentali, sistemi di espressione e tipi cellulari diversi, si può comunque delineare un profilo di massima di questi canali.

HCN1 è il sottotipo con la cinetica più veloce, la sua τ_{act} è compresa tra 30 e 300 ms da -140 a -95 mV (Ishii et al. 2001, Santoro et al. 2000) e dei quattro sottotipi è quello con V_{50} più positivo (range da -70 a -90 mV) (Baruscotti et al. 2005, Stieber et al. 2005). In presenza di una concentrazione saturante di cAMP si verifica in questo canale solo un lieve *shifting* nella curva di attivazione (da +2 a +7 mV) (Stieber et al. 2005, Wainger et al. 2001, Wang et al. 2001).

HCN2 occupa una posizione intermedia con una costante di tempo compresa tra 150 e 1000 ms e un valore di V_{50} che si colloca in un range da -70 a -100 mV (Chen et al. 2001).

HCN4 è il canale con la cinetica di apertura più lenta, la sua τ_{act} a -140 mV è di alcune migliaia di ms (Seifert et al. 1999, Ludwig et al. 1999) e il V_{50} è compreso tra -70 e -100 mV. In presenza di cAMP sia per HCN2 che per HCN4 si verifica uno spostamento della curva di attivazione di 10 - 25 mV in

senso depolarizzante (Seifert et al. 1999, Wainger et al. 2001, Wang et al. 2001, Zagotta et al. 2003).

Minori sono le informazioni relative ai canali HCN3. La costante di tempo di attivazione di questo canale è dell'ordine di alcune centinaia di millisecondi (range 250 - 400 ms) e il V_{50} è compreso tra -80 e -95 mV (Stieber et al. 2005, Mistrik et al. 2005).

I nucleotidi ciclici non sembrano indurre uno spostamento in senso depolarizzante della curva di attivazione, e addirittura ci sono evidenze che dimostrano come la forma murina di HCN3 sia leggermente inibita dai nucleotidi ciclici (slittamento V_{50} pari a circa -5 mV) (Mistrik et al. 2005).

Da esperimenti di sostituzione del CNBD, è emerso che il dominio di legame dei nucleotidi ciclici di HCN3 è sostanzialmente in grado di legare cAMP e potenzialmente in grado di modulare il gating del canale (Stieber et al. 2005, Biel et al. 2009). Dunque, nei canali HCN3 il dominio CNBD potrebbe essere funzionalmente silenziato, attraverso un diverso arrangiamento delle strutture che propagano le variazioni conformazionali dal sito di legame del cAMP al poro (Stieber et al. 2005, Biel et al. 2009).

1.4 Ruolo fisiologico dei canali HCN nei neuroni

Nel cervello dei mammiferi sono espresse tutte le isoforme di HCN (Santoro et al. 2000, Monteggia et al. 2000, Notomi & Shigemoto 2004).

HCN1 è presente nella neocorteccia, nell'ippocampo, nella corteccia cerebrale, nel tronco spinale (Moosmang et al. 1999, Notomi & Shigemoto 2004, Santoro et al. 2000) e nel midollo spinale.

HCN2 è distribuito in maniera pressoché ubiquitaria nella maggior parte delle regioni cerebrali e tocca picchi di espressione nel talamo e nel nucleo del tronco encefalico (Moosmang et al. 1999, Notomi & Shigemoto 2004, Santoro et al. 2000).

L'isoforma HCN3 è quella che presenta i livelli di espressione più bassi nel sistema nervoso centrale, ma è moderatamente espressa nel bulbo olfattivo e in alcuni nuclei ipotalamici (Moosmang et al. 1999, Notomi & Shigemoto 2004).

HCN4 è altamente presente in alcuni nuclei talamici e nello strato delle cellule mitrali del bulbo olfattivo (Moosmang et al. 1999, Notomi & Shigemoto 2004, Santoro et al. 2000). Mentre in altre regioni cerebrali i suoi livelli di espressione sono molto bassi.

Esiste una cospicua letteratura che indaga il ruolo fisiologico della *hyperpolarization-activated cation current* nelle cellule nervose. Tale corrente è coinvolta nel controllo di una varietà di

funzioni neuronali, compresa la determinazione del potenziale di membrana di riposo, l'attività pacemaker di alcuni tipi neuronali, l'integrazione dendritica e la trasmissione sinaptica.

1.4.1 I_h e potenziale di membrana di riposo.

I canali HCN sono costitutivamente aperti a potenziali prossimi al potenziale di riposo della cellula. Essendo parzialmente aperti al potenziale di riposo, abbassano la resistenza di membrana (R_m), che è definita come il rapporto tra la variazione del potenziale di membrana e la corrente richiesta. Pertanto, in presenza di canali HCN aperti, ogni input di corrente evoca un cambiamento minore del potenziale di membrana rispetto a quello che si avrebbe in sua assenza.

I canali responsabili della corrente h possiedono, inoltre, un intrinseco *feedback*-negativo perché la loro attivazione e deattivazione voltaggio-dipendente si oppongono a deviazioni del potenziale di membrana da quello di riposo. In questo modo la I_h smorza attivamente gli stimoli eccitatori e inibitori in arrivo da altre cellule.

La I_h , quindi, in un certo senso, funziona come un *voltage clamp* che tende a stabilizzare il potenziale di membrana.

1.4.2 Partecipazione della I_h nell'integrazione dendritica

L'integrazione dendritica è un processo fondamentale per l'elaborazione del segnale nella maggior parte dei neuroni; infatti, la generazione del potenziale d'azione nel soma richiede, di solito, l'integrazione di molteplici *input* sinaptici.

L'integrazione dei potenziali post sinaptici eccitatori (EPSPs), deve essere strettamente controllata sia nello spazio che nel tempo.

Esistono evidenze che i canali HCN1 abbiano un ruolo importante nell'integrazione dendritica dei neuroni CA1 ippocampali e dei neuroni piramidali neocorticali (Magee 1998).

Come conseguenza delle proprietà passive dei dendriti di attenuare l'ampiezza e rallentare la cinetica di un EPSPs, l'ascesa e il decadimento di un EPSPs somatico sarà più lenta se esso viene generato in dendriti distali rispetto ai prossimali. Per effetto del "*dendritic filtering*" ci si aspetterebbe che EPSPs ripetitivi, derivanti da più sinapsi distali si debbano sommare in misura maggiore e con un decorso temporale più lungo rispetto agli EPSPs generati nei dendriti prossimali.

Tuttavia, in molti neuroni, tra cui CA1, ciò non avviene. Il fenomeno è probabilmente da attribuire a un gradiente di canali HCN, la cui densità aumenta progressivamente, di più di sei volte, con la distanza dal soma. Questo gradiente contrasta efficacemente il “*dendritic filtering*”.

Durante la fase ascendente degli EPSPs, i canali HCN si deattivano rapidamente, determinando una effettiva corrente uscente che iperpolarizza la membrana, accelera la fase discendente di ciascun EPSPs e ne aumenta l’ampiezza.

Poiché la densità dei canali I_h è maggiore nelle porzioni più distali dei dendriti, EPSPs distali decadono più velocemente e sono più brevi e, di conseguenza, dopo la propagazione, la sommatoria temporale degli input distali risulta maggiormente smorzata rispetto a quella degli input prossimali.

Come conseguenza la sommatoria temporale di tutti gli input che raggiungono il soma è pressoché uguale. Questi dati hanno suggerito che il ruolo della I_h nella integrazione dendritica dipenda da un crescente gradiente somato-dendritico della I_h .

1.4.3 Ruolo della I_h nell’attività spontanea

Nel sistema nervoso centrale, la I_h gioca tre ruoli distinti nella generazione di attività spontanea.

In alcune cellule, quali i neuroni relè talamo-corticali, la I_h agisce da corrente *pacemaker* primaria per cui il suo blocco con Cs arresta completamente il pacemaker biologico o rallenta notevolmente il ritmo di scarica neuronale.

In altri neuroni, come le cellule del Purkinje del cervelletto, si pensa che la I_h agisca modulando l’attività spontanea generata da altre correnti. Questi neuroni normalmente hanno un’elevata frequenza di scarica, intorno a 40-50 Hz. Anche se l’inibizione della I_h ha scarso o nessun effetto sulla frequenza di scarica durante i periodi di attività, il blocco da ZD-7288 determina nella cellula di Purkinje transizioni spontanee da prolungati periodi di attività spontanea (a livello normale) a lunghi periodi di quiescenza (Williams et al. 2002). Di conseguenza, una rapida raffica di potenziali post sinaptici inibitori (IPSPs), che normalmente produce una breve iperpolarizzazione in grado di spegnere solo transitoriamente l’attività spontanea, in presenza di un blocco dei canali HCN è capace di produrre una più stabile e duratura iperpolarizzazione che inibisce i potenziali d’azione spontanei per decine di secondi. Quindi la I_h in queste cellule mantiene il potenziale di membrana in un ambito di potenziale che consente il funzionamento del pacemaker dovuto all’azione di altri canali.

Infine, in altre cellule, la I_h supporta oscillazioni sottosoglia. Neuronni della corteccia entorinale generano oscillazioni sottosoglia soprattutto in risposta alle iniezioni di corrente depolarizzante. È stato, anche, dimostrato che la I_h svolge un ruolo critico nel generare le oscillazioni delle cellule stellate (Dickson et al. 2000).

1.4.4 Funzione dei canali HCN nella trasmissione sinaptica.

La presenza della I_h in diversi terminali presinaptici, tra cui la giunzione neuromuscolare dei crostacei (Beaumont & Zucker 2000) e il ganglio ciliare degli uccelli (Fletcher & Chiappinelli 1992), ha suggerito che un ruolo importante di questa corrente consista nel controllare la trasmissione sinaptica. A sostegno di questa ipotesi, vi è la facilitazione della trasmissione sinaptica nelle terminazioni motorie dei crostacei che ha luogo in seguito ad una *upregulation* cAMP-dipendente della I_h . Il meccanismo non è ancora noto. Tuttavia, ci sono prove iniziali che i canali HCN possano direttamente intervenire sui meccanismi di rilascio (Beaumont et al. 2002, Beaumont & Zucker 2000).

1.5 Neuronni dopaminergici della substantia nigra pars compacta e corrente h

I neuronni dopaminergici (DA) mesencefalici rappresentano la maggiore risorsa di dopamina del sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi e la loro perdita è associata all'insorgenza di disordini mentali e neurologici.

Il sistema dopaminergico mesencefalico è coinvolto in molteplici funzioni fisiologiche tra cui: il controllo motorio, la modulazione degli stati affettivi ed emotivi, i meccanismi di ricompensa ed alcune funzioni cognitive superiori.

I neuronni dopaminergici mesencefalici mostrano un ampio corredo di correnti voltaggio dipendenti tra cui una marcata I_h (Lacey et al. 1988, Lacey et al. 1989, Hainsworth et al. 1991, Yung et al. 1991), che ne modula l'eccitabilità cellulare, e il cui ruolo non è stato ancora completamente chiarito.

1.5.1 Substantia nigra

La substantia nigra rappresenta il più grande nucleo del mesencefalo. E' disposta tra il tegmento ed il peduncolo cerebrale, e la sua porzione più rostrale si estende nel diencefalo raggiungendo il globo pallido. In base a criteri citoarchitettonici, la substantia nigra può essere suddivisa in una pars compacta (SNc), dorsale, a maggiore densità cellulare e in una pars reticulata (SNr) ventrale a minore densità cellulare.

La suddivisione nelle due componenti è avvalorata dalla chemoarchitettura di questo complesso nucleare. La pars compacta è composta principalmente da grandi cellule pigmentate brune, che sintetizzano dopamina (il pigmento, neuromelanina è un prodotto del metabolismo delle catecolamine). Le cellule della pars reticulata sono più piccole di quelle della pars compacta e la maggior parte di esse è GABAergica.

Le cellule dopaminergiche della substantia nigra pars compacta, designate come gruppo A9 formano un continuum con altri gruppi di cellule dopaminergiche, A10 e A8. Il primo è accolto nell'area tegmentale ventrale e il secondo nel nucleo pigmentoso parabrachiale.

La pars compacta della substantia nigra è stata ulteriormente divisa in una fila dorsale e in una ventrale.

Le cellule nella fila dorsale sono disposte a bassa densità, presentano alberi dendritici orientati in direzione medio-laterale e medialmente si fondono con l'adiacente gruppo di cellule dopaminergiche dell'area tegmentale ventrale. Tutte le cellule della fila dorsale contengono calbindina, una proteina chelante il calcio. Al contrario, i neuroni della fila ventrale sono disposti ad elevata densità e sono privi di calbindina. I loro dendriti sono orientati in direzione dorsoventrale e penetrano nella sottostante pars reticulata.

I dendriti dei neuroni della pars compacta sono connessi da sinapsi dopaminergiche ma anche da *gap junction* elettrotoniche.

L'afferenza più importante, da un punto di vista quantitativo, diretta alla substantia nigra, proviene dallo striato e risulta composta da neuroni GABAergici, cellule di medie dimensioni provviste di spine inibitorie, che contengono anche Sostanza P. Questi assoni terminano nella pars reticulata, dove contraggono sinapsi sia con i neuroni locali che con i dendriti dei neuroni della pars compacta che si estendono ventralmente.

Le afferenze eccitatorie della substantia nigra originano dai neuroni glutammatergici del nucleo subtalamico e dai neuroni glutammatergici e colinergici del nucleo tegmentale peduncolo pontino.

1.5.2 Neuroni dopaminergici della substantia nigra, caratteristiche elettrofisiologiche

La dopamina è uno dei neurotrasmettitori più intensamente studiati nel cervello a causa del suo ruolo fondamentale nella regolazione di processi di base, quali il controllo di funzioni vegetative a livello del sistema nervoso autonomo e di funzioni motorie e psichiche più complesse.

I precursori della sintesi di dopamina nei neuroni dopaminergici sono gli aminoacidi tirosina e fenilalanina. All'interno del neurone, l'aminoacido L-fenilalanina viene trasformato in L-tirosina e, successivamente, ad opera dall'enzima tirosina idrossilasi (TH), viene convertito in L-3,4-diidrossifenilalanina (L-Dopa). L'ultimo passaggio che porta alla formazione della dopamina, consiste nella decarbossilazione della L-DOPA da parte dell'enzima DOPA decarbossilasi (AADC). La dopamina sintetizzata ex-novo, viene immagazzinata nelle vescicole sinaptiche mediante un trasportatore vescicolare (VMAT) e da qui rilasciata nello spazio sinaptico per esocitosi Ca^{++} -dipendente in seguito all'arrivo di stimoli eccitatori che depolarizzano il neurone (figura 4).

I recettori della dopamina, situati sulle membrane dei neuroni, nelle stazioni terminali delle vie dopaminergiche, appartengono a una grande famiglia di recettori di neurotrasmettitori e ormoni, caratterizzata dall'azione chimica specifica che si svolge nelle cellule post-sinaptiche. Infatti, essi non agiscono attraverso variazioni dirette della conduttanza ionica, ma, una volta legato il neurotrasmettitore, il complesso neurotrasmettitore-recettore interagisce con una proteina trasduttrice, la proteina G.

I recettori dopaminergici si distinguono in due tipi, D1 e D2, entrambi associati a proteine G (figura 4).

I recettori D1 (o *D1-like*), che comprendono i due sottotipi D1 e D5, sono solo postsinaptici e sono associati ad una proteina G stimolatoria (G_s), che attiva l'adenilato-ciclastasi inducendo la formazione di AMP-ciclico (cAMP), o ad una proteina G_q che attiva la fosfolipasi C (PLC) che, a sua volta, idrolizza il fosfatidilinositolo bifosfato (PIP2) provocando la mobilizzazione di calcio.

I recettori D2 (o *D2-like*), che includono i sottotipi D2, D3, D4, sono sia pre- che postsinaptici e la loro associazione ad una proteina G inibitoria (G_i) determina, in seguito al legame dell'agonista endogeno, una riduzione di cAMP, che causa apertura di canali del potassio e chiusura di quelli del calcio.

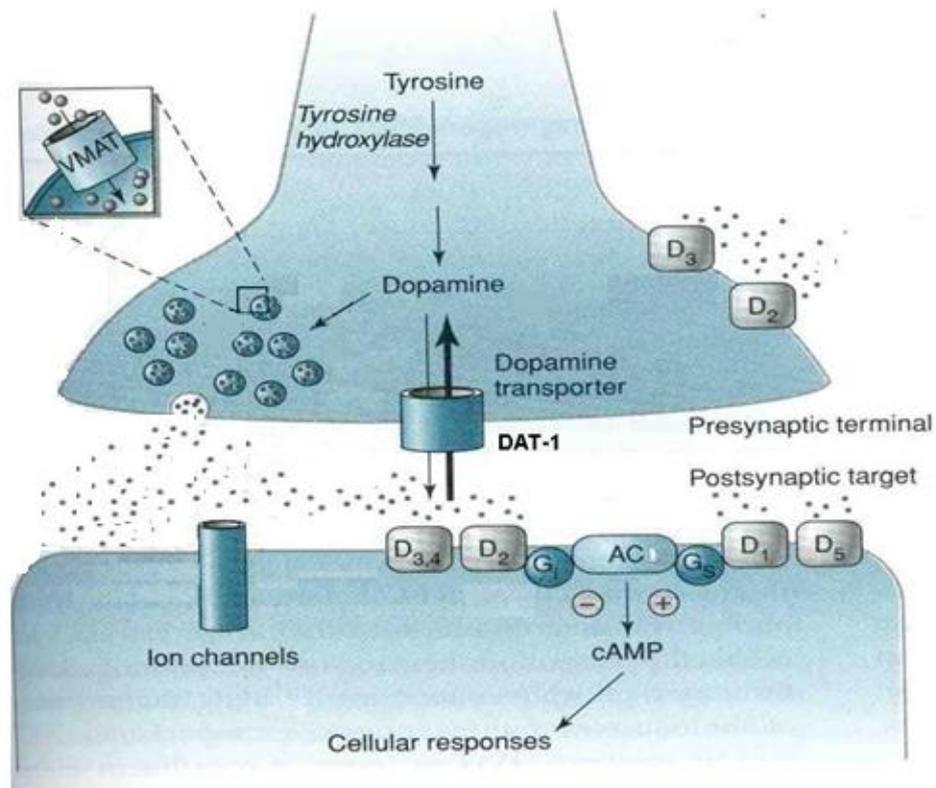


Figura 4: Pathway della dopamina

Il gruppo più importante di cellule dopaminergiche risiede nella parte ventrale del mesencefalo, che contiene circa il 90% della totalità delle cellule dopaminergiche cerebrali.

Anche se i neuroni dopaminergici ammontano a meno dell'1% del numero totale di neuroni del cervello, essi svolgono un ruolo importante nella regolazione di diverse funzioni cerebrali di base: comportamento motorio, motivazionale e meccanismi di ricompensa.

Il sistema dopaminergico mesencefalico è stato suddiviso in tre diversi sistemi (figura 5). Probabilmente, il più noto è il sistema nigrostriatale, che ha origine nella pars compacta della substantia nigra (SNc) ed estende le sue fibre nel caudato-putamen (noto anche come lo striato dorsale). Il nigrostriatale svolge un ruolo essenziale nel controllo del movimento motorio volontario.

In posizione più mediale si trovano i sistemi dopaminergici mesolimbico e mesocorticale, che derivano dalle cellule dopaminergiche presenti nell'area tegmentale ventrale (VTA). Le cellule della VTA che proiettano nel nucleo accumbens e nel tubercolo olfattivo innervando anche il setto, l'amigdala e l'ippocampo costituiscono il sottoinsieme di proiezioni noto come sistema mesolimbico dopaminergico. I neuroni della parte mediale della VTA che proiettano alla corteccia

prefrontale, cingolata e peririnale formano il sistema dopaminergico mesocorticale. Questi sistemi dopaminergici sono coinvolti nei comportamento emotivi.

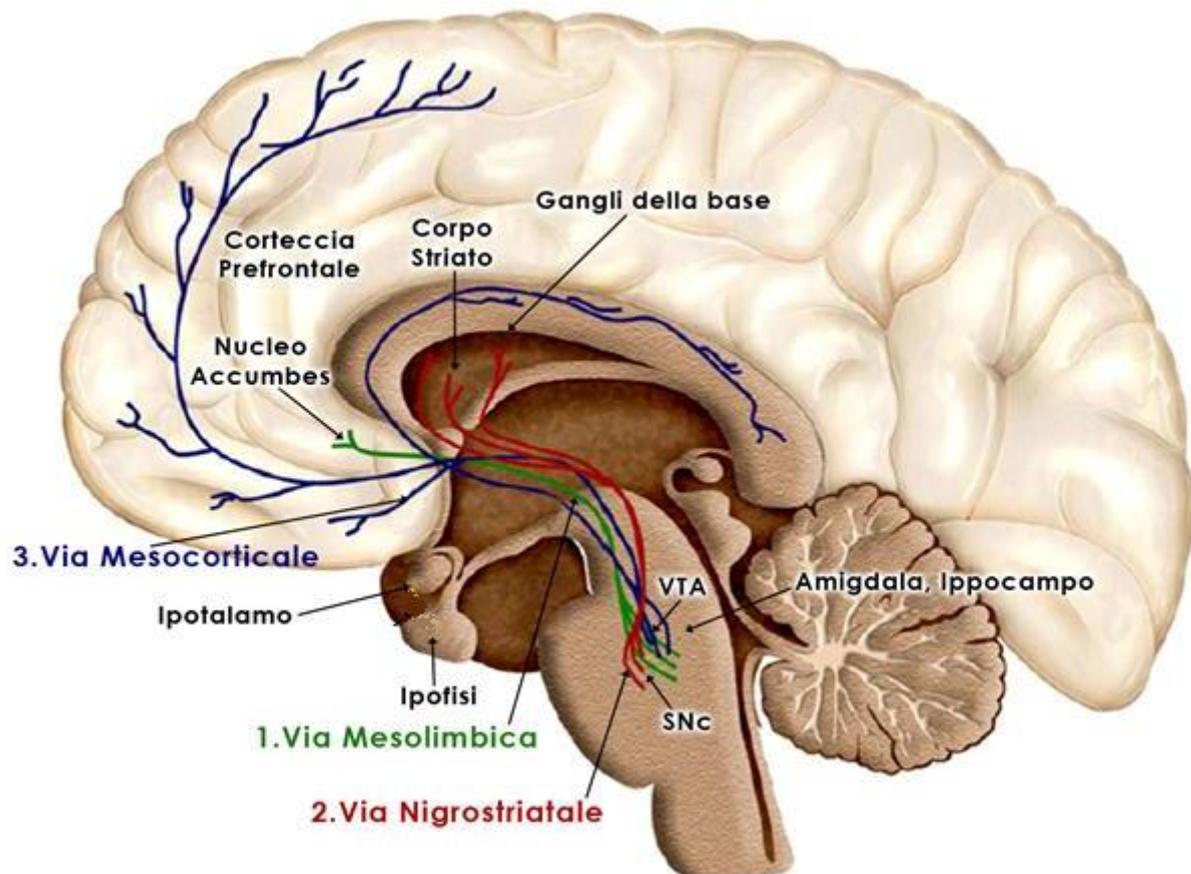


Figura5: Sezione sagittale di cervello umano in cui sono evidenziati i tre sistemi dopaminergici: nigrostriatale, mesolimbico e mesocorticale.

Nella substantia nigra solo il 3-5% della quantità totale di neuroni è costituita da neuroni dopaminergici, ciò nonostante la carenza di dopamina nella substantia nigra determina l'insorgenza del morbo di Parkinson, una patologia a grosso impatto sociale.

La prima caratterizzazione morfologica ed elettrofisiologica delle cellule DA della SNc è da far risalire a Grace (Grace & Bunney 1983, Grace & Onn 1989), il cui lavoro pionieristico rappresenta tuttora un punto di riferimento per l'identificazione di questi neuroni. I neuroni DA della substantia nigra, identificati con una doppia marcatura, che consisteva in una colorazione intracellulare e in una localizzazione immunocitochimica della tirosina-idrossilasi, sono stati classificati, da Grace, in due classi morfologiche:

- cellule multipolari,
- cellule bipolari.

I neuroni DA con ramificazione dendritica provenienti dal soma, hanno dendriti tipicamente orientati in una direzione medio-laterale che restano entro il confine dorso-ventrale della substantia nigra pars compacta o tendono ventralmente nella zona reticulata (Grace & Bunney 1983, Grace 1988, Preston et al. 1981). I neuroni bipolari della substantia nigra, invece, presentano una morfologia fusiforme caratterizzata da due processi che originano dal soma cellulare in posizione opposta, ed i dendriti sono in genere confinati nella pars compacta.

Cellule nervose di questo tipo, che presentano una morfologia fusiforme di medie dimensioni o soma multipolare, sono indicate come neuroni “principali”.

I neuroni principali registrati in vitro mostrano molte caratteristiche elettrofisiologiche in comune con quelle dei neuroni DA registrati in vivo: sono in genere spontaneamente attivi, e tale attività spontanea è caratterizzata da una lunga durata del potenziale d'azione (> 2 ms) e da una soglia di attivazione piuttosto depolarizzata (-30 / -45 mV). Questi neuroni, inoltre, esibiscono tipicamente una spiccata *afterhyperpolarization* (Grace 1988), seguita da una depolarizzazione molto lenta che permette la genesi di potenziali di azione (Grace & Onn 1989, Lacey et al. 1989).

Una differenza importante tra la fisiologia dei neuroni DA registrati in vitro rispetto a quella riportata in vivo è nel tipo di attività. I neuroni DA registrati in vivo presentano spesso una attività in *burst*, che consiste in treni di 3-8 picchi di ampiezza decrescente e di durata crescente che si verificano a intervalli relativamente brevi (73 ± 13 ms), ma con lunghi periodi di tempo di inibizione di attività *postburst* (200 - 450 ms) (Grace & Bunney 1984, Grace & Bunney 1984). Al contrario, i neuroni DA registrati in vitro mostrano attività spontanea ad una frequenza costante di 0,5 - 3,0 Hz (Grace & Onn 1989). Inoltre, depolarizzando le cellule DA in vitro, aumenta la frequenza di scarica mantenendo la regolarità degli *spike*, mentre la depolarizzazione dei neuroni DA in vivo tipicamente innesca una sequenza di *burst* (Grace & Bunney 1984).

Tale attività *pacemaker* sembra essere controllata da almeno cinque conduttanze potassio e due di calcio (Silva et al. 1990, Harris et al. 1989). Le correnti calcio coinvolte nel *pacemaker*, sono probabilmente, almeno in parte, di tipo L, perché l'attività spontanea è rallentata o interrotta con bloccanti dei canali di tipo L, ma non con bloccanti dei canali di tipo N (Nedergaard et al. 1993, Mercuri et al. 1994).

Anche il bloccante dei canali P/Q, Ω -Aga-IVA, rallenta o blocca il *pacemaker* (Puopolo et al. 2007). Studi in vivo e in vitro hanno dimostrato che la dopamina, il GABA, alte concentrazioni di glicina, e l'agonista GABA(B) baclofen inibiscono l'attività spontanea dei neuroni DA (Lacey et al. 1988,

Grace & Bunney 1985, Chiodo et al. 1987, Mercuri et al. 1990, Mercuri et al. 1990, Mercuri et al. 1992).

1.5.3 *Hyperpolarization-activated cation current* nella *substantia nigra pars compacta*.

I neuroni dopaminergici mesencefalici mostrano una marcata corrente cationica attivata dalla iperpolarizzazione (I_h) (Lacey et al. 1989, Yung et al. 1991, Jiang et al. 1993, Hainsworth et al. 1991), corrente presente anche nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta*.

La presenza dei canali HCN in questa area cerebrale è stata messa in evidenza da alcuni Autori (Franz et al. 2000, Monteggia et al. 2000).

Esperimenti di RT-PCR qualitativa su singola cellula hanno rivelato che i neuroni DA della SNc coesprimono tre dei quattro tipi di canali HCN: HCN2, HCN3, e HCN4 (Franz et al. 2000).

Altri Autori hanno invece avanzato l'ipotesi che in questa area cerebrale siano presenti tutti i tipi di canali HCN (HCN 1-4): Monteggia ha, infatti, dimostrato, mediante tecnica PCR, la coespressione degli mRNA codificanti per i quattro canali (Monteggia et al. 2000), Notomi li ha, invece, localizzati nel cervello di ratto mediante tecniche immunoistochimiche (Notomi & Shigemoto 2004). Tali differenze possono essere spiegate alla luce di evidenze sperimentali che mostrano che la varietà dei canali HCN è maggiore in vivo a causa della formazione di etero tetrameri (Ulens & Tytgat 2001, Yu et al. 2001).

Una delle più dettagliate caratterizzazioni cinetiche della I_h nella SNc è stata proposta da Cathala e Paupardin-Tritsch (Cathala & Paupardin-Tritsch 1997) che hanno descritto la presenza di questa corrente nei neuroni *principali*. Gli esperimenti di patch-clamp, condotti a temperatura ambiente su fettine di cervello di ratto, hanno evidenziato un range di attivazione della I_h compreso tra -65 e -105 mV, un V_{50} pari a -86 mV e un potenziale di inversione stimato intorno a -43 mV. La curva di attivazione della corrente è stata descritta con l'uso di due esponenziali caratterizzati da costanti di tempo lente (0.7 ± 0.4 e 4.83 ± 2 s a -110 mV). Ad ulteriore conferma che si trattasse di I_h gli Autori hanno dimostrato la sensibilità della corrente registrata a Cs (3mM) e a ZD7288 (10 μ M), bloccante selettivo.

Washio e collaboratori (Washio et al. 1999), effettuando registrazioni di patch-clamp a temperatura ambiente su fettine di cervello di ratti di età compresa tra P1 e P18, hanno fornito prove che la I_h aumenta sensibilmente durante le prime fasi dello sviluppo postnatale. L'aumento

di ampiezza, che si verificava a partire dal quinto giorno dopo la nascita, è stato attribuito a un aumento della densità dei canali dal momento che la capacità di membrana dei neuroni della substantia nigra pars compacta non cambiava in maniera significativa dopo P5.

A differenza di Cathala, Washio afferma che la curva di attivazione della I_h è ben descritta da un singolo esponenziale sia in neuroni immaturi (P3) che maturi (P12) ma sottolinea che si verifica una riduzione postnatale della costante di tempo (1142.5 ms a -110 mV in P3 contro 692.3 ms a -110 mV in P12).

2 MATERIALI E METODI

2.1 Animali

Per l'attività sperimentale sono stati utilizzati topi transgenici che esprimevano una proteina reporter, la *green fluorescent protein* (GFP) sotto il promotore della tirosina idrossilasi, l'enzima a monte della via di produzione della dopamina (Sawamoto et al. 2001, Matsushita et al. 2002).

Il costrutto transgenico, formato da una porzione di 9.0 Kb, presenta in posizione 5' il promotore per la tirosina idrossilasi di topo, seguito da un introne di β -globina di coniglio, dal cDNA che codifica per la proteina reporter GFP e da una sequenza di poliadenilazione sempre proveniente dal gene per la β -globina di coniglio.

La colonia di topi è stata allevata all'interno del nostro stabulario e ai fini riproduttivi si sono effettuati degli incroci tra topi transgenici e topi wild type dello stesso ceppo C57BL/6J, poiché il gene presente in omozigosi non è compatibile con la vita.

Gli esperimenti sono stati condotti avendo cura di minimizzare la sofferenza degli animali sacrificati e il numero di topi sacrificati. Le procedure seguite sono conformi alla Direttiva 86/609/EEC, sulla salvaguardia e tutela degli animali usati in esperimenti scientifici, e approvate dal Comitato Etico e dal veterinario dell'Università di Ferrara.

2.1.1 La Green Fluorescent Protein (GFP)

Un fondamentale strumento di lavoro è stato senz'altro la proteina reporter GFP. Derivata naturale dalla medusa *Aequoria victoria* (Brejc et al. 1997), essa è estremamente funzionale per gli studi in vitro in quanto non richiede agenti esogeni per manifestare la propria fluorescenza. Il gruppo cromoforo (fluoroforo) è composto da un tripeptide serina-tirosina-glicina ciclizzato post-traduzionalmente e avente una tirosina deidrogenata.

2.1.1.1 Struttura.

La GFP contiene 238 aminoacidi che formano 6 α -eliche e 11 catene β ; queste ultime danno luogo ad una struttura a barile con catene antiparallele al centro della quale si posiziona il cromoforo (figura6), che risulta così protetto da interazioni con i solventi. Questa particolare struttura

determina la notevole stabilità di fluorescenza della GFP, e ne ha fatto uno degli strumenti di maggiore successo nell'indagine citofluorimetrica.

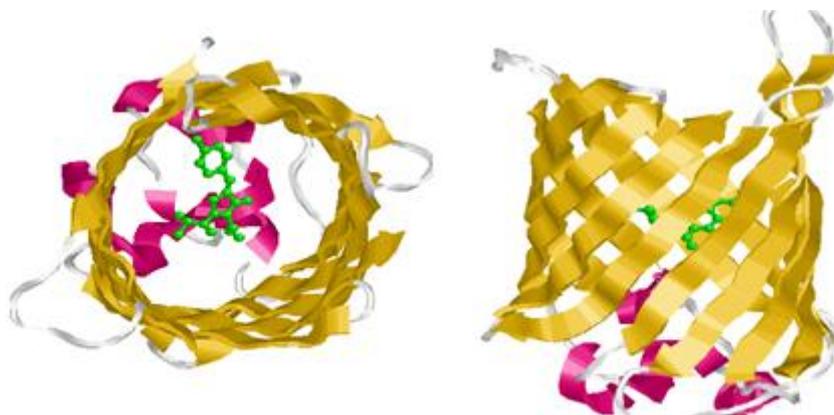


Figura 6: Struttura della proteina reporter GFP. In giallo le catene β , in rosa le α -eliche, al centro in verde il tripeptide cromoforo serina-tirosina-glicina.

Sotto l'azione di una radiazione ultravioletta (figura7) il cromoforo ha la capacità di passare da una forma non ionizzata ad una ionizzata, transitando rispettivamente da un assorbimento massimo di 395 nm ad un picco di assorbimento a 475 nm (luce blu) che ne determina l'emissione nel verde. Un ruolo importante in questo spostamento è svolto dai residui adiacenti al cromoforo e da una molecola d'acqua.

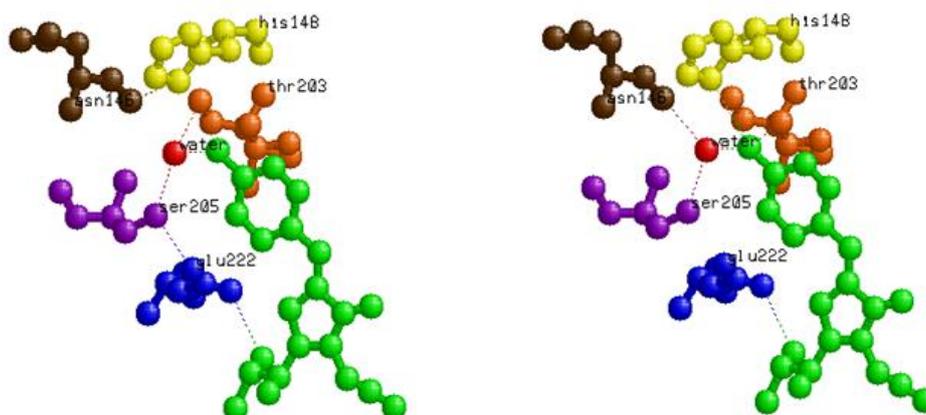


Figura 7: Rappresentazione delle due strutture alternative del centro cromoforo: a sinistra la forma naturale, a destra la forma ionizzata.. I legami idrogeno sono tratteggiati. In particolare è il glutammato 222 (blu) che cede un protone al cromoforo (verde) causando un riarrangiamento dei legami idrogeno.

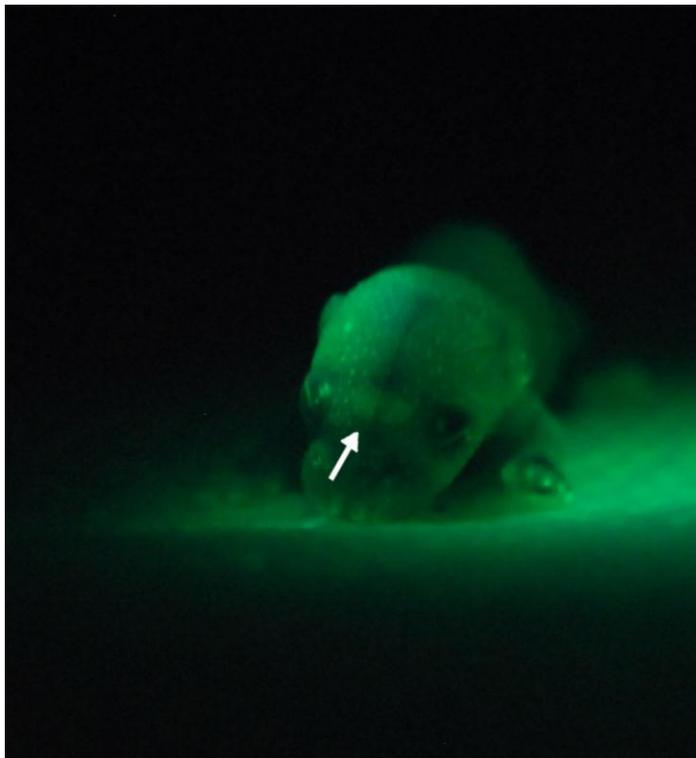
2.1.2 Riconoscimento dei topi transgenici

Al fine di distinguere i topi transgenici dai topi wild type ottenuti in stabulario, è stata utilizzata una sorgente di luce UV (lampada FBL/Basic-B&N-01, modello FHS/LS 1B, lunghezza d'onda 460-495)(figura 8) capace di eccitare il cromoforo della GFP.



Figura 8: Sorgente di luce e occhiali utilizzati per il riconoscimento dei topi transgenici

Il fascio di luce viene indirizzato sull'osso frontale al fine di illuminare i bulbi olfattivi in topi



neonati (fino ad un massimo di quattro giorni); l'emissione della GFP viene rilevata, se presente, mediante occhiali dotati di lenti con filtro (filtro FHS/EF-2G2, lunghezza d'onda 500-515 nm) per lo spettro di emissione della GFP (figura 9).

Figura9: Fotografia di topo neonato: la sorgente UV è indirizzata verso l'osso frontale del cranio al fine di illuminare i bulbi olfattivi. La freccia indica i bulbi olfattivi che appaiono di colore verde intenso in un topo transgenico GFP+.

2.2 Isolamento del mesencefalo

Gli animali venivano sacrificati per decapitazione mediante ghigliottina da laboratorio; la testa veniva quindi fissata ad un substrato di neoprene racchiuso in una celletta, precedentemente raffreddata a 0 °C. Veniva quindi versato nella celletta un liquido cefalorachidiano artificiale (*bicarbonate buffered saline*, BBS, vedi oltre), mantenuto sempre a 0 °C e continuamente ossigenato durante le operazioni di estrazione. Si procedeva con l'incisione e l'apertura della scatola cranica. Tramite tecniche di microchirurgia si estraeva l'intero cervello e si rimuovevano le meningi cercando sempre di limitare *shock* termici, meccanici e di variazioni del pH ai tessuti.

Per l'identificazione e la dissezione del mesencefalo è stato utilizzato il protocollo descritto da Sulzer (http://www.sulzerlab.org/Sulzer_VM_culture_protocol_book_version5.pdf) che prevedeva l'immobilizzazione dell'encefalo con il dorso rivolto verso il basso all'interno di un apposito sostegno. Successivamente venivano effettuati due tagli, uno caudale e l'altro rostrale rispetto alla flessione mesencefalica (figura 10).

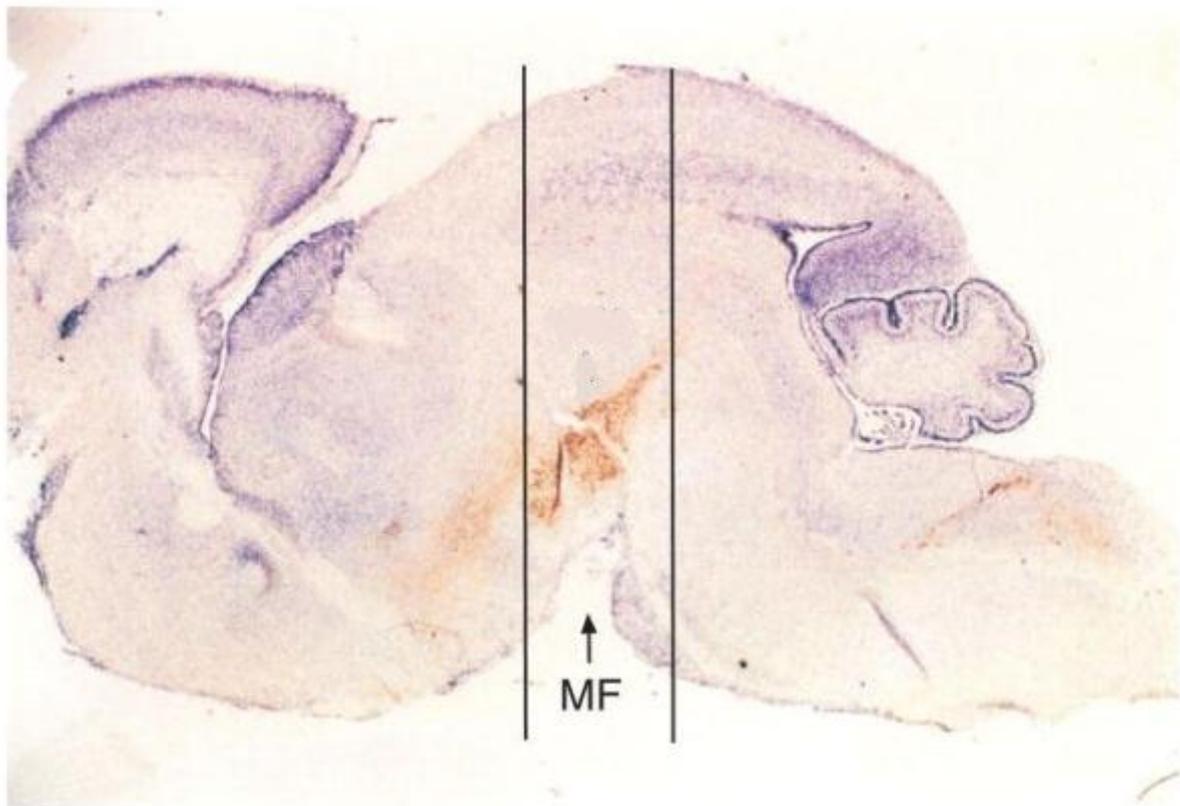


Figura 10: Sezione sagittale di cervello di topo in cui sono indicate le posizioni dei due tagli ai lati della flessione mesencefalica.

2.2.1 Preparazione delle fettine

La superficie rostrale della sezione di cervello ottenuta, veniva fissata al supporto del vibratomo per mezzo di colle tipo cianacrilato. Si effettuavano delle fettine da 150 μm di spessore, secondo piani orizzontali coronali. Le fettine che contenevano la substantia nigra pars compacta erano riconosciute irradiando il preparato con radiazione ultravioletta (vedi paragrafo 3.1.2). Le fettine erano conservate in BBS, continuamente gorgogliata con una miscela di carbossigeno (95% O_2 , 5% CO_2), e mantenute a temperatura ambiente per circa 10 ore.

Per effettuare le registrazioni elettrofisiologiche una singola fettina veniva posizionata in una camera di registrazione del volume di 1 cm^3 ed era tenuta ferma da una griglia di platino ("arpa") a forma di "C" tra i cui bracci erano tesi dei fili di nylon di circa 50 μm di diametro. La camera così preparata era montata sul tavolino del microscopio dove la fettina era perfusa con BBS satura di carbossigeno alla velocità di 2 ml/min.

Il microscopio utilizzato era un Olympus BX50WI modificato in modo tale da presentare un tavolino fisso e l'ottica mobile. Questo macchinario era equipaggiato con contrasto del differenziale di interferenza (ottica di Nomarski), che consente di avere immagini tridimensionali con un'unica via ottica. Inoltre il microscopio era dotato di epifluorescenza, per permettere la visione delle cellule GFP positive, e di un dispositivo di videomicroscopia ad infrarosso.

2.3 Soluzioni e farmaci

La soluzione extracellulare standard utilizzata (BBS) aveva la seguente composizione in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 26 NaHCO_3 , 1.25 NaH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 e 15 glucosio. La soluzione era preparata a partire da una soluzione concentrata 10X priva di glucosio, calcio e magnesio che venivano aggiunti al momento. La soluzione extracellulare standard era talvolta sostituita con una BBS ad alto contenuto di potassio, la cui composizione in mM era: 125 NaCl, 32.5 KCl, 26 NaHCO_3 , 1.25 NaH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 e 15 glucosio.

La BBS veniva gorgogliata in modo continuo con 95% di O_2 e 5% di CO_2 . La sua composizione era pensata e calcolata affinché raggiungesse il pH fisiologico dei mammiferi, 7.4, alla saturazione; infine l'osmolarità della soluzione era aggiustata a 305 mOsm con glucosio.

La soluzione intracellulare standard, che riempiva le micropipette, comprendeva i seguenti componenti, espressi in mM: 120 KCl, 10 NaCl, 2 MgCl_2 , 0.5 CaCl_2 , 5 EGTA [acido etilene glicol-bis (β -aminoetiletere) N,N,N',N'-tetraacetico], 10 HEPES [acido N-(2-idrossietil)piperazina-N'-(2-

etansulfonico]], 2 Na-ATP, 10 Glucosio. Con l'aggiunta di NaOH si regolava il pH al valore di 7.2 e l'osmolarità era mantenuta a 295 mOsm.

Per le registrazioni in perforato, alla soluzione intracellulare era aggiunta amfotericina B (200 µg/ml), come agente perforante, e acido pluronico F-127 300 µg/ml. Per essere sicuri dell'integrità del *patch* perforato, la soluzione intracellulare conteneva una concentrazione di CaCl₂ pari a 3 mM ed era priva di EGTA

Per isolare la corrente h, sono state utilizzate tossine e sostanza neuroattive, somministrate direttamente nella perfusione extracellulare o utilizzando uno scambiatore rapido di soluzioni (RSC-160, Biologic, Claix, France) e talvolta tramite aggiunta alla soluzione intracellulare contenuta nelle micropipette. Tutti i farmaci sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich, tranne la tetrodossina (TTX) acquistata dalla Ascent Scientific e l'ivabradina fornita dalla Servier.

2.4 Elettrofisiologia

2.4.1 Il *patch-clamp*

La tecnica elettrofisiologica del patch clamp è stata ideata nel 1976 da B. Sakmann e E. Neher, i quali hanno ottenuto per essa nel 1991 il premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina. Tale metodo elettrofisiologico permette la registrazione dei flussi ionici attraverso canali localizzati sulle membrane cellulari (Hamill et al. 1981, Sakmann & Neher 1984).

Con questa tecnica si può modificare sperimentalmente il potenziale di una piccola porzione di membrana cellulare, oppure della membrana dell'intera cellula, iniettando nella cellula una quantità di corrente sufficiente a mantenere il blocco del voltaggio, e registrare le correnti che attraversano la membrana (*voltage clamp*).

È inoltre possibile studiare i cambiamenti del potenziale di membrana in seguito a variazioni della corrente iniettata (*current clamp*).

Il patch clamp permette di monitorare sia le proprietà attive di membrana, ovvero le correnti dei canali ionici, sia le proprietà passive come ad esempio la capacità della cellula e la resistenza di membrana.

Da un punto di vista pratico, la tecnica consiste nell'avvicinare la punta di una pipetta di vetro alla superficie della cellula fino a farla aderire intimamente ad un piccolissimo lembo della membrana plasmatica (*patch*), formando un sigillo (*seal*) ad alta resistenza (nell'ordine dei GΩ), successivamente viene praticata una suzione, con la quale il lembo di membrana posto sotto la

punta della pipetta si adagia all'interno della stessa e la soluzione contenuta nella pipetta entra in contatto con il citoplasma della cellula, rendendo possibile il controllo del potenziale di membrana e la registrazione delle correnti dell'intera cellula (figura11).

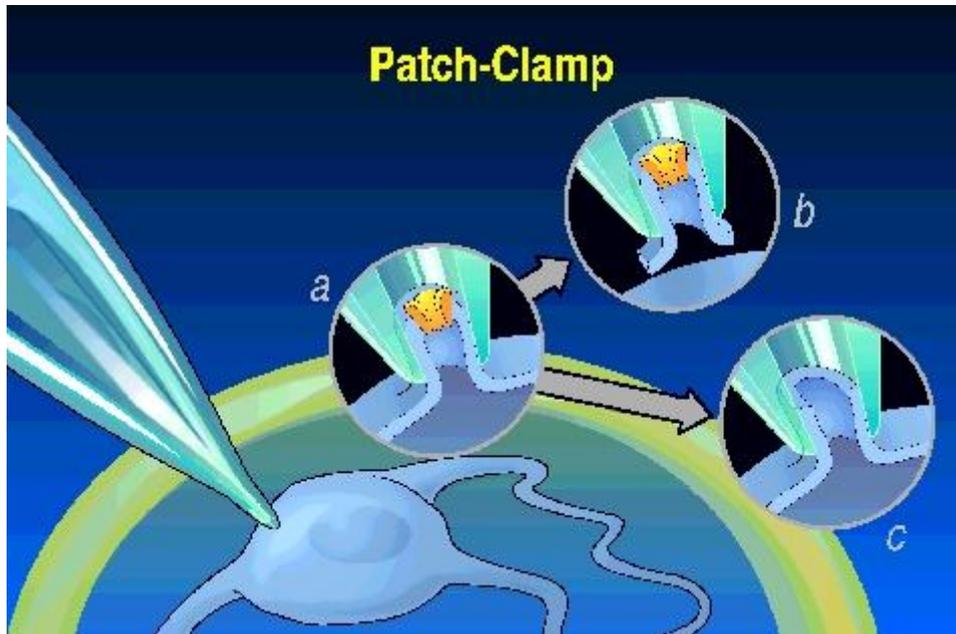


Figura11: La tecnica del patch clamp

La pipetta, contenente un elettrodo d'argento clorurato collegato all'amplificatore, viene riempita con una opportuna soluzione elettrolitica e la corrente, che attraversa il patch di membrana sotteso ad essa, viene registrata dall'amplificatore con un meccanismo a *feedback* in grado di fornire una quantità di corrente esattamente uguale, ma di segno opposto, alla corrente che fluisce dalla cellula: in questo modo si può bloccare il potenziale di membrana e registrare la corrente in esame.

A partire dal sigillo e con peculiari manipolazioni, la tecnica del patch clamp può essere utilizzata in diverse configurazioni (*cell-attached*, *inside out*, *whole cell*, *outside*) e con diverse finalità (registrazione di attività di singolo canale, di singolo canale regolato da secondi messaggeri, delle correnti totali della cellula, di canali attivati da un ligando).

2.4.2 Registrazioni elettrofisiologiche

Le registrazioni sono state effettuate da cellule in fettine di 150 μm di spessore. Per il raggiungimento delle cellule GFP positive e per la riuscita del sigillo (*seal*), che si realizza perfettamente con una pressione di circa 70 mbar su di una superficie cellulare pulita, è risultata indispensabile l'operazione di *cleaning*, che consiste nella pulizia della membrana della cellula

d'interesse o nell'asportazione degli strati più superficiali di tessuto che impediscono di raggiungere la superficie cellulare (figura 12).

Il *cleaning* è stato realizzato con pipette di vetro borosilicato dalla punta più larga di quella normalmente adoperata per il patch clamp, le cui resistenze erano inferiori ai 2 M Ω (Sakmann et al. 1989). Le pipette erano riempite con la soluzione extracellulare e con una leggera pressione si generava un flusso diretto verso la superficie della fetta, che era sufficiente per esporre il corpo cellulare dei neuroni visivamente già identificati grazie all'epifluorescenza.

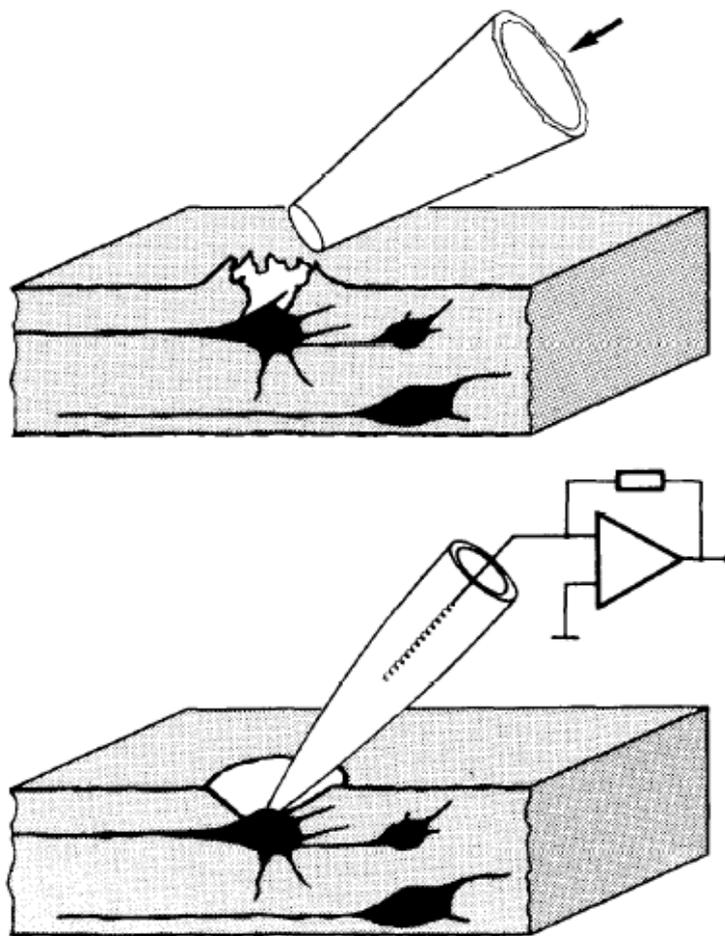


Figura 12: Esposizione della cellula di interesse grazie all'operazione di cleaning.

Alcuni esperimenti sono stati eseguiti utilizzando la configurazione *whole cell*, la quale si ottiene, una volta formato il sigillo, praticando una suzione che permette di rompere il lembo di membrana posto sotto la punta della pipetta, il quale si adagia all'interno della stessa. In questo modo, la soluzione contenuta nella pipetta entra in contatto con il citoplasma della cellula, rendendo possibile il controllo del potenziale di membrana e la registrazione delle correnti dell'intera cellula. La maggior parte delle registrazioni è stata condotta nella configurazione detta *perforated patch* (patch perforato) che rappresenta una variante della registrazione in *whole cell*. Essa viene

realizzata tramite l'aggiunta, alla soluzione contenuta nella micro pipetta, dell'antibiotico amfotericina B, il quale da origine a delle aperture sul patch, permettendo così una parziale (ma non totale) comunicazione tra i due ambienti (figura 13).

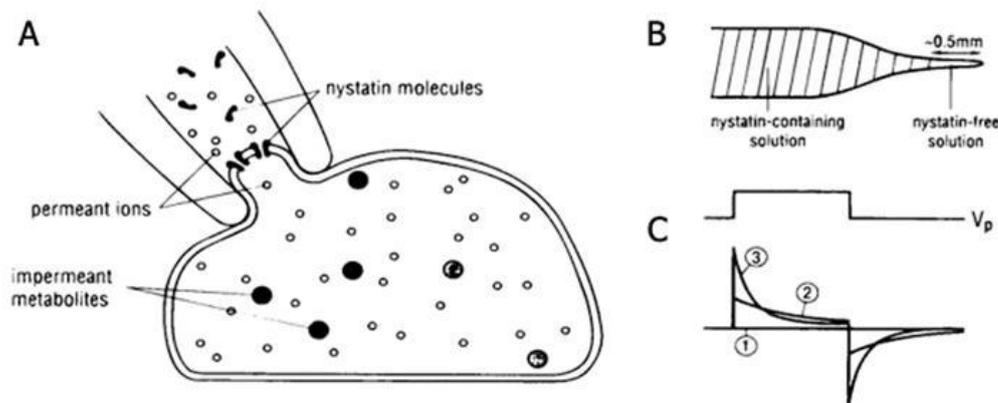


Figura 13: Patch-clamp in configurazione patch perforato.

2.4.3 Il set-up di elettrofisiologia

Il set-up di elettrofisiologia utilizzato per gli esperimenti era così costituito:

1. un microscopio ottico dritto (Olympus BX50WI), dotato di obiettivi 5x e 40x, con un tavolino mobile e l'ottica fissa;
2. micromanipolatore elettromeccanico (Patch Man, Eppendorf) che permetteva l'avvicinamento della punta della pipetta alla cellula;
3. un amplificatore (Axopatch 200B, Axon Instruments, USA) in grado di fornire una lettura dei valori delle correnti e di filtrare il rumore di fondo oltre a permettere di effettuare una serie di operazioni come la compensazione della resistenza dell'elettrodo, della capacità della cellula e della resistenza in serie;
4. un convertitore analogico-digitale e digitale-analogico (Digidata 1320A, Axon Instruments, USA), che interfacciava l'amplificatore per *patch* al computer;
5. una gabbia di Faraday, che proteggeva il microscopio e l'headstage, da interferenze dovute a campi elettromagnetici;
6. un tavolo antivibrante che isolava il setup dalle microvibrazioni della struttura in cui il setup era ospitato

Tutti gli esperimenti erano condotti a temperatura controllata (27 o 37°C), utilizzando per il riscaldamento un elemento Peltier posto tra il tavolino del microscopio e la camera di

registrazione; il controllo della temperatura avveniva con una termoresistenza estremamente sensibile alle variazioni di calore.

2.4.4 Preparazione dei microelettrodi

Le micropipette da *patch-clamp* derivavano da capillari di vetro borosilicato con filamento, aventi diametro esterno di 1.5 mm, diametro interno di 0.86 mm e filamento interno di 0.15 mm (Hilgenberg, Germania).

Questi capillari venivano quindi tagliati in pezzi da 10 cm e successivamente flambati.

Grazie ad un tiralettrodi (DMZ-Universal puller, Zeitz), strumento che consente di preparare pipette con aperture inferiori a 1 μm , da ogni capillare da 10 cm si ottenevano due microelettrodi finiti da circa 5 cm l'uno.

Durante gli esperimenti questi microelettrodi venivano riempiti di soluzione intracellulare e presentavano una resistenza pari a 4-6 M Ω .

Per effettuare l'operazione di *cleaning*, si ricorreva a pipette con una punta piú larga le cui resistenze erano molto piú basse, inferiori ai 2 M Ω (Sakmann et al. 1989).

I sigilli presentavano delle resistenze molto elevate, pari a 1 - 2 G Ω ; questo si verificava perché la corrente che attraversava la micropipetta risultava essere esclusivamente quella che passava attraverso il tassello della membrana racchiuso dalla bocca dell'elettrodo. Una volta rotto questo tassello, la resistenza d'accesso, ovvero la somma della resistenza della pipetta e di quella dei frammenti residui sulla membrana plasmatica, risultava di circa 9 - 15 M Ω .

2.4.5 L'acquisizione e l'analisi dei dati

L'acquisizione e l'analisi delle correnti è stata effettuata utilizzando il software pClamp (Axon Instruments, USA), in particolare la versione 10.2 di Clampex e di Clampfit. Ulteriori analisi sono state realizzate con il programma Origin 8.1 e i test di significatività sono stati effettuati con Graphpad mediante test di Student. Tutti i dati qui riportati sono espressi come media \pm errore standard, dove n indica il numero degli esperimenti.

3 RISULTATI

Lo scopo di questo studio è caratterizzare la corrente I_h nei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta (SNc), attraverso registrazioni elettrofisiologiche effettuate su neuroni TH-GFP positivi.

Una volta identificate le proprietà di base della I_h , ci si è concentrati sulla modulazione della corrente a carico del cAMP e sull'identificazione di neurotrasmettitori che, innescando una cascata di eventi biochimici, determinano una variazione della concentrazione intracellulare di secondi messaggeri.

Infine, essendo i neuroni DA spontaneamente attivi, ci si è interrogati sul ruolo della corrente I_h nel mantenimento di questa peculiare autoritmicità.

3.1 Proprietà cinetiche della I_h

Al fine di isolare la *hyperpolarization-activated cation current* (I_h) sono state bloccate farmacologicamente tutte le correnti presenti, in particolare la corrente sodio con tetrodotossina (TTX) 0.6 μ M, la corrente potassio *delayed rectifier* con tetraetilammonio (TEA) 20 mM, la corrente potassio di tipo A con 4-aminopiridina (4AP) 3 mM, le correnti calcio e calcio-dipendenti con cadmio 0.1 mM e la corrente K_{ir} con bario 0.5 mM.

Sono stati effettuati sia esperimenti in condizioni sia di *voltage-* che di *current clamp*.

3.1.1 Attivazione

In condizioni di *current-clamp*, l'iniezione di una corrente iperpolarizzante in cellule dopaminergiche della substantia nigra pars compacta provoca una risposta RC caratterizzata dal tipico "*sag potential*" (Mercuri et al. 1995, Halliwell & Adams 1982, Mayer & Westbrook 1983). A seguito di una prima iperpolarizzazione, come si può vedere nella figura 14, si registra una depolarizzazione che dà luogo a una "saccatura", spiegata proprio dalla presenza di una corrente attivata da iperpolarizzazione.

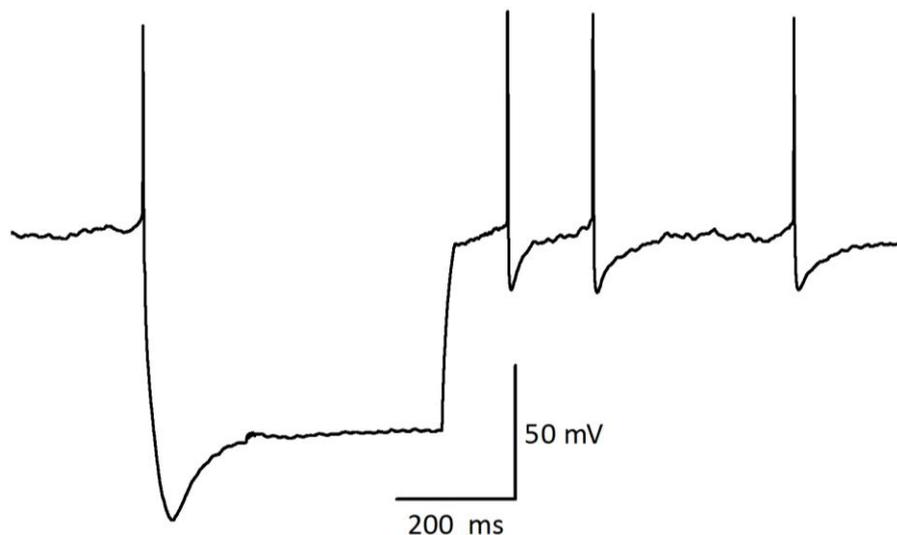


Figura 14: Risposta di una cellula dopaminergica della substantia nigra in condizioni di current-clamp all'iniezione di un gradino di corrente iperpolarizzante di 300 pA al potenziale di membrana di riposo. L'impulso iperpolarizzante evoca una risposta in voltaggio che presenta un evidente "sag potential" tempo-dipendente.

Per valutare sia l'ampiezza che la cinetica di attivazione è stato utilizzato un protocollo a doppio impulso (figura 15). Partendo da un potenziale di mantenimento di -40 mV (potenziale a cui il canale è ancora chiuso), la membrana era condizionata per 4 s a potenziali progressivamente più negativi da -50 mV a -130 mV, con decrementi costanti di 10 mV, e poi iperpolarizzata al potenziale di test fisso -130mV.

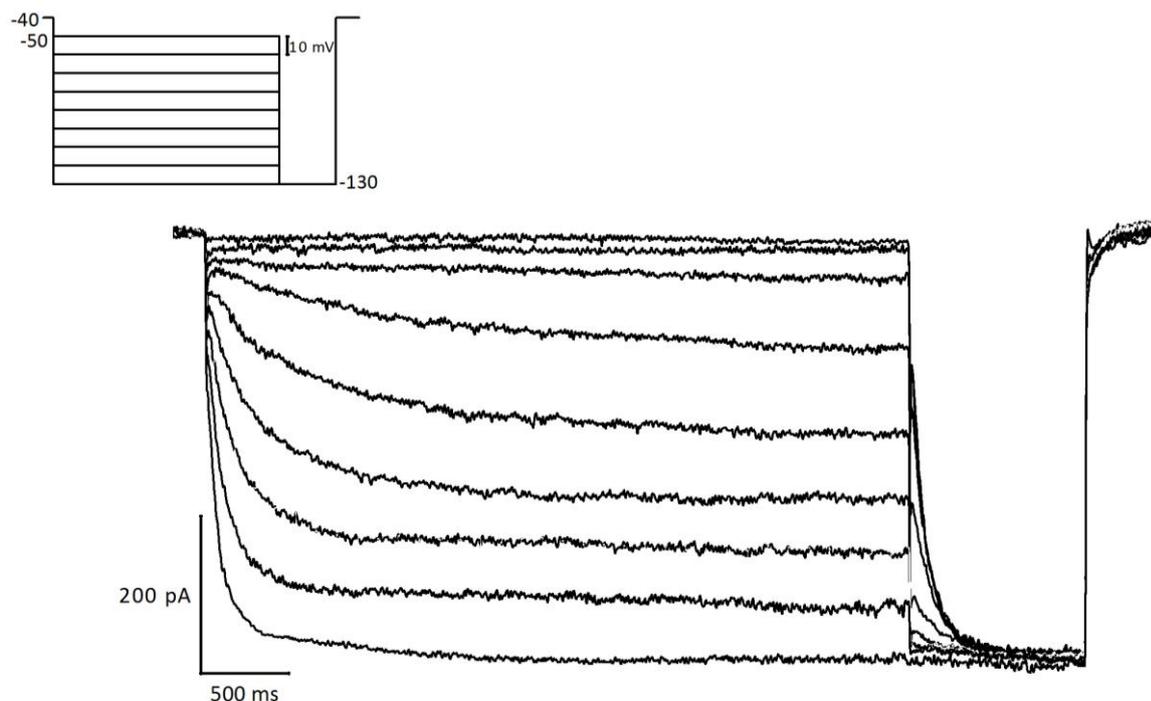


Figura 15: Registrazione in condizione di voltage-clamp in risposta ad un protocollo a doppio impulso (in alto a sinistra).

Le registrazioni effettuate a 37°C hanno evidenziato una componente istantanea della corrente che si sviluppa in pochi millisecondi mentre nella componente lenta si verifica un graduale aumento di ampiezza di pari passo con gli incrementi dei comandi iperpolarizzanti (figura 15), quindi l'ampiezza della corrente aumenta in maniera non lineare all'aumentare del potenziale conferendo alla corrente la caratteristica di voltaggio-dipendenza.

L'ampiezza della corrente (figura 16) è stata calcolata sottraendo per ogni valore di potenziale alla corrente allo stato stazionario (I_{ss}) la corrente istantanea (I_{inst}). Si è osservato che la I_h aveva, a 37°C, una soglia di attivazione intorno al potenziale di -70 mV, e la sua ampiezza media a -130 mV era di -569.06 ± 48.90 pA (n=20).

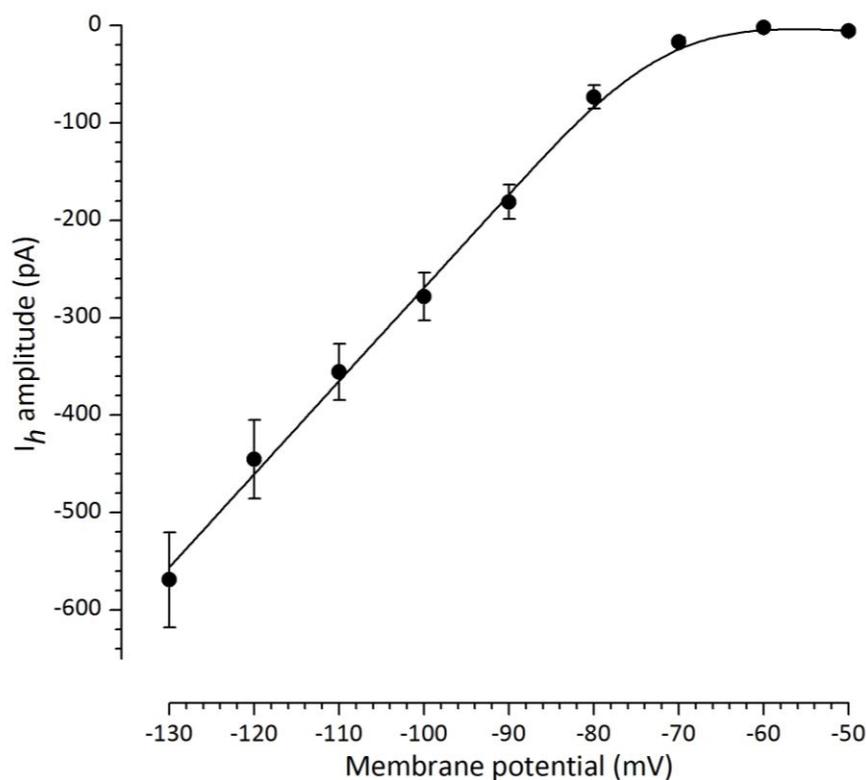


Figura 16: Relazione corrente voltaggio: l'ampiezza media (n=20) della corrente h è riportata in grafico in funzione del potenziale a cui la membrana è mantenuta.

Lo sviluppo della corrente è ben descritto dalla somma di due esponenziali. Le costanti di tempo τ_1 (costante di tempo veloce) e τ_2 (costante di tempo lenta) erano chiaramente voltaggio dipendenti, diminuendo con l'iperpolarizzazione. I valori medi di τ_1 e τ_2 erano infatti di 497.03 ± 46.37 ms e 3469.62 ± 739.37 ms a -90mV (n=18) e decrescevano a 86.61 ± 7.08 ms e 1531.71 ± 346.02 ms a -130 mV (n=19) (figura 17).

Per descrivere l'andamento delle due costanti di tempo di attivazione in funzione del potenziale è stata utilizzata la curva esponenziale

$$\tau_{(V)} = k + \bar{\tau} * e^{-V/v} \quad \text{EQUAZIONE 1}$$

in cui:

- $\tau_{(V)}$ è il valore che assume la costante di tempo al variare del potenziale (V) del comando;
- k è il valore a cui tende τ con l'aumentare della iperpolarizzazione, pari a 62.91 ± 28.34 ms per la τ_1 e 1374.1 ± 178.81 ms per la τ_2 ;
- $\bar{\tau}$ è l'ambito di variazione delle costanti di tempo di attivazione pari a 434.0 ± 29.65 per la costante veloce e 2096.11 ± 297.55 per quella lenta;
- v è la costante che descrive la dipendenza di τ dal voltaggio V , ovvero la variazione di potenziale necessaria affinché avvenga $1/e$ della variazione di τ , ed è pari a 15.52 ± 2.74 mV per la τ_1 e 3.51 ± 0.25 mV per la τ_2 .

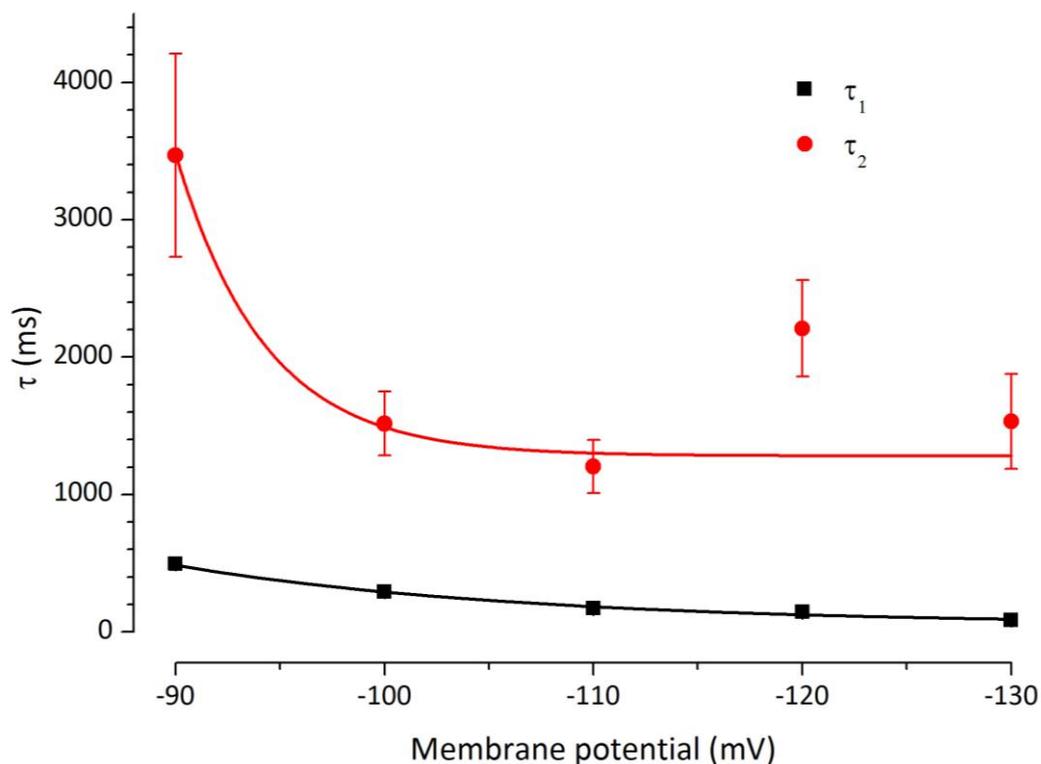


Figura 17: Il grafico ritrae la variazione delle costanti di tempo di attivazione medie τ_1 e τ_2 in funzione del potenziale. L'andamento delle costanti di tempo di attivazione è descritto dalle seguenti funzioni esponenziali:

$$\tau_{(V)} = 62.91 + 434 * \exp(-V/15.52) \text{ per } \tau_1 \text{ e } \tau_{(V)} = 1374.1 + 2096.1 * \exp(-V/3.51) \text{ per la } \tau_2.$$

Per l'analisi cinetica i valori della corrente istantanea delle *tail* (secondo impulso) sono stati normalizzati e riportati in un grafico in funzione del potenziale a cui il neurone era mantenuto per 4 s (figura 18).

L'attivazione della corrente allo stato stazionario è descritta da una sigmoide, che può essere interpolata con la funzione di Boltzmann

$$\frac{I_{tail}}{I_{tailmax}} = \{1 + \exp[(V_m - V_{50})/k]\}^{-1} \quad \text{EQUAZIONE 2}$$

dove:

- I_{tail} è l'ampiezza delle tail registrata dopo un condizionamento al potenziale di membrana V_m ;
- $I_{tailmax}$ è la ampiezza massima delle tail evocata dopo un preconditionamento di -130 mV;
- V_m è il potenziale di membrana;
- V_{50} è il potenziale di membrana per cui la metà dei canali sono aperti;
- k è la dipendenza dell'apertura dei canali dal cambiamento di potenziale, o pendenza della relazione corrente voltaggio (*slope*).

Da tale funzione si ricava che il valore di potenziale al quale si raggiunge il 50% dell'attivazione massima (V_{50}) è pari a -84.17 ± 1.31 mV (n=13) e che la pendenza della relazione corrente voltaggio è di 7.74 ± 0.40 mV (n=13).

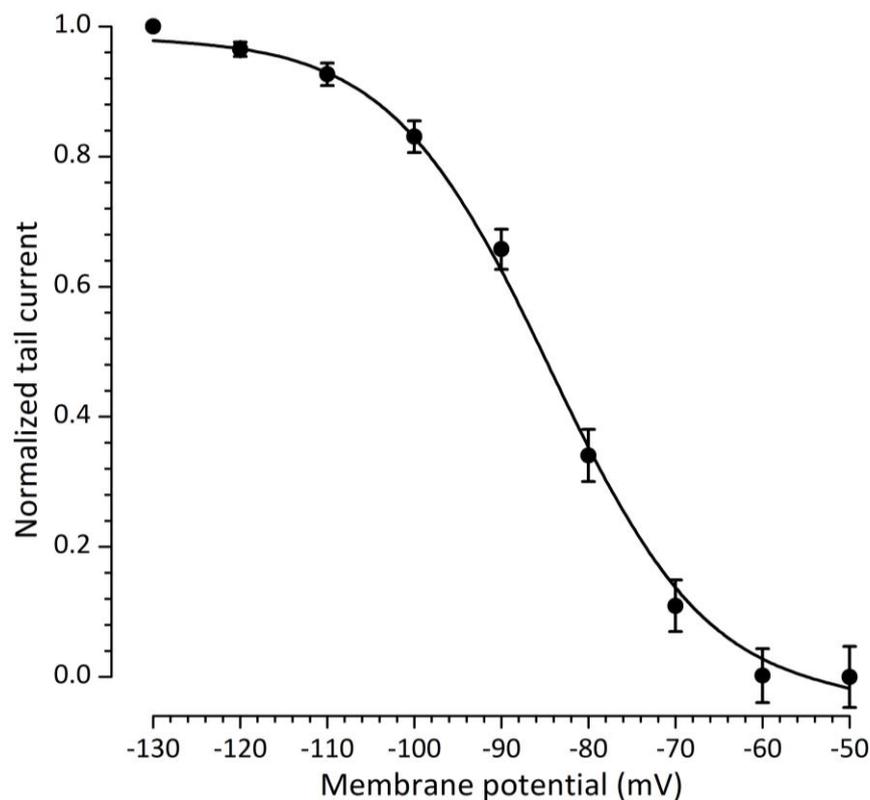


Figura 18: Voltaggio dipendenza della curva di attivazione allo stato stazionario: i valori della corrente istantanea delle tail sono stati normalizzati e riportati in un grafico in funzione del potenziale a cui il neurone era mantenuto per 4 s. I punti sono stati interpolati con la funzione di Boltzmann $I_{tail}/I_{tailmax} = \{1 + \exp[(V + 84.17)/8]\}^{-1}$ da cui si ricava il valore di V_{50} di -84.17 ± 1.31 mV (n=13) e la pendenza della relazione corrente voltaggio pari a 7.74 ± 0.40 mV (n=13).

Seifert e collaboratori (Seifert et al. 1999) hanno dimostrato che il V_{50} dipende in modo critico dalla lunghezza dell'impulso iperpolarizzante. Gli impulsi di breve durata non permettono di raggiungere la completa attivazione del canale e, quindi la probabilità di apertura derivata dall'ampiezza delle correnti di coda misura a in questo modo non è realmente allo stato stazionario. Ne consegue che la probabilità di apertura è seriamente sottostimata, e il V_{50} viene ad essere collocato a valori più negativi di quanto non sia in realtà. Questi errori di misura sono molto più pronunciati per i canali HCN lenti rispetto a quelli veloci e sono ulteriormente dipendenti dalla temperatura.

Si è, quindi, analizzata la dipendenza del potenziale di metà attivazione dalla durata del comando iperpolarizzante sottoponendo 9 cellule a un protocollo a doppio impulso (vedi figura 15) in cui il primo comando iperpolarizzante aveva una durata variabile (1,2,4 e 8 s).

Come mostrato nel grafico (figura 19) all'aumentare della durata dello stimolo si ha uno slittamento in senso depolarizzante delle curve di attivazione allo stato stazionario, i cui valori di V_{50} risultano essere meno negativi passando da -87.52 ± 2 mV per uno stimolo di 1 s a -78.15 ± 1.22 mV per 8 s. I valori di V_{50} ottenuti possono essere interpolati con la funzione esponenziale

$$V_{50(t)} = k + \bar{V}_{50} * e^{-t/\tau} \quad \text{EQUAZIONE 3}$$

in cui:

- $V_{50(t)}$ è il valore che assume il potenziale di metà attivazione al variare della durata (t) del comando iperpolarizzante;
- k è l'asintoto (valore a cui tende V_{50} per $t=\infty$) ed è pari a -77.05 ± 1.54 mV;
- \bar{V}_{50} è l'ambito di variazione di V_{50} al variare della durata del condizionamento, ed ha un valore pari a -13.88 ± 1.58 mV;
- τ è la costante di tempo, che risulta pari a 3.21 ± 1.42 s.

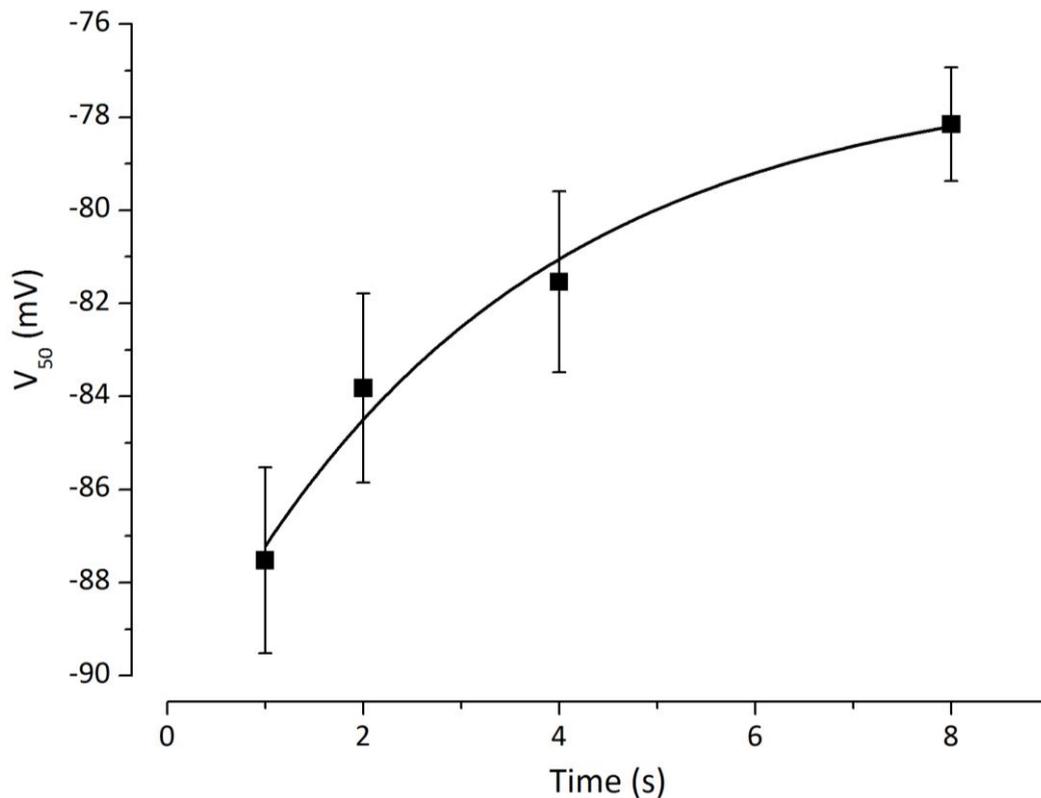


Figura 19: Dipendenza del V_{50} dalla durata dello step iperpolarizzante ($n=9$). All'aumentare della durata dello stimolo si ha uno spostamento in senso depolarizzante dei valori di V_{50} che passano da -87.52 ± 2 mV per uno stimolo di 1 s a -78.15 ± 1.22 mV per 8 s. I valori di V_{50} ottenuti possono essere interpolati con l'equazione esponenziale: $V_{50(t)} = -77.05 - 13.88 \cdot \exp(-t/3.21)$.

3.1.2 Deattivazione

L'analisi del tempo di deattivazione è stata eseguita utilizzando un protocollo che prevede un potenziale di mantenimento di -40 mV a cui fa seguito un primo test a -130 mV della durata di 4 s, una ripolarizzazione a -40 mV (di durata variabile) seguita da una nuova iperpolarizzazione a -130 mV (figura 20).

Per calcolare la costante di tempo di deattivazione i valori delle ampiezze delle correnti registrate a 37°C ($n=5$) sono stati normalizzati, riportati in grafico in funzione della durata dello step depolarizzante e interpolati dalla funzione esponenziale (figura 20 in rosso)

$$I_{(t)} = 1 + \bar{I} \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{EQUAZIONE 4}$$

in cui:

- $I_{(t)}$ è l'ampiezza normalizzata della corrente in funzione dell'intervallo di tempo variabile di depolarizzazione (t);
- \bar{I} , l'ambito di variazione della corrente normalizzata, pari a -0.69 ± 0.06 ;

- τ , la costante di tempo di deattivazione, è di 0.45 ± 0.07 s.

In blu è indicato il limite per un intervallo di confidenza del 95%.

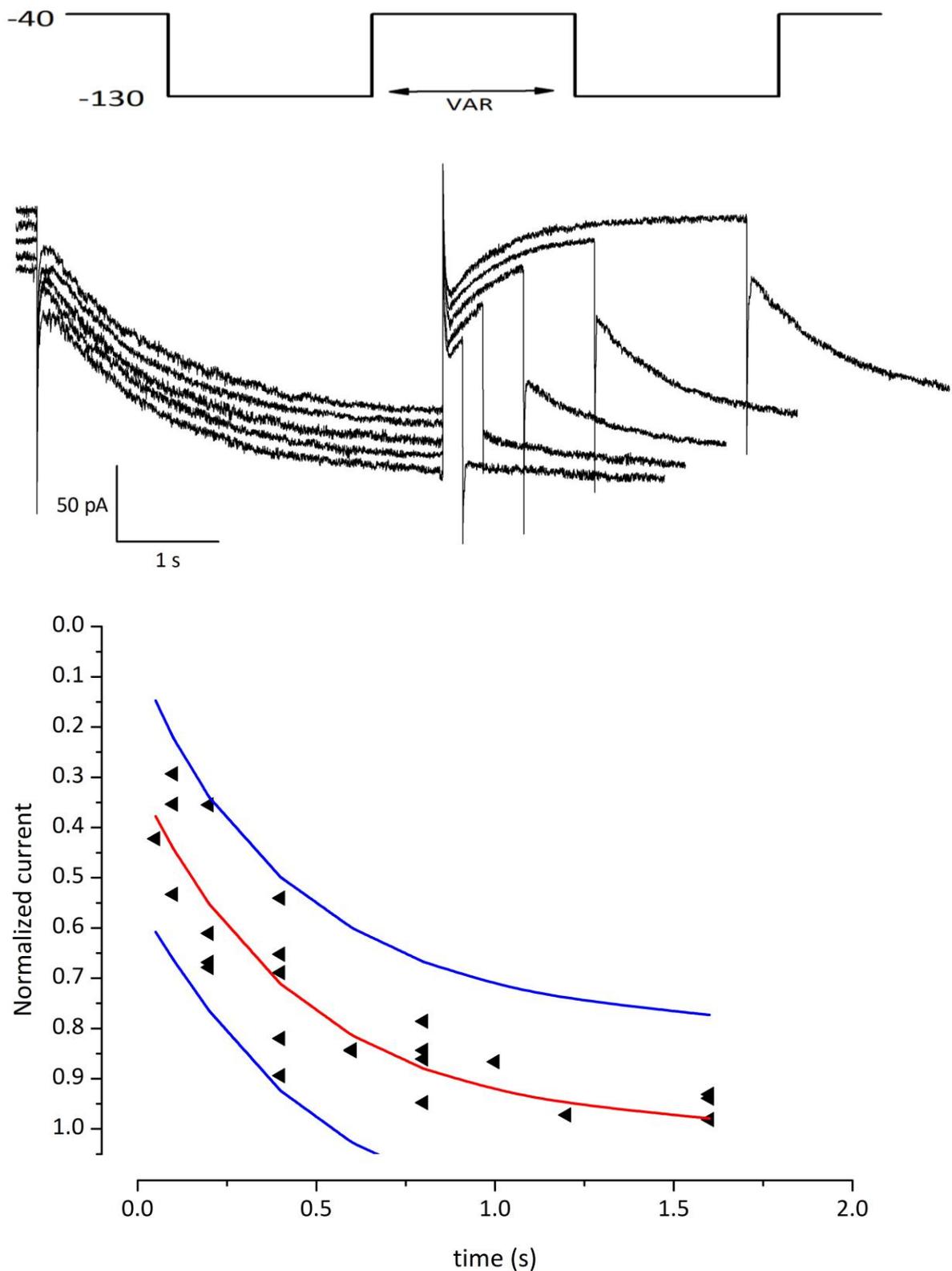


Figura 20: Tempo di deattivazione. Protocollo: primo impulso (da -40 a -130 mV) determina l'attivazione completa della corrente ed è seguito a intervalli di tempo variabili da un identico secondo test. Esempio di registrazione. L'andamento temporale della deattivazione della corrente h a 37°C è descritto dalla equazione: $I(t) = 1 - 0.69 \cdot \exp(-t/0.45)$.

3.1.3 Potenziale di inversione

Normalmente il potenziale di inversione di una corrente si ottiene dal potenziale a cui si annullano le correnti di coda: si provoca prima l'apertura del canale (nel caso specifico, iperpolarizzando) e poi la sua chiusura (depolarizzando) e in questo modo si osserva lo sviluppo di una corrente di coda che si estingue in corrispondenza del potenziale di inversione. Nelle cellule DA della SNc, poiché altre correnti sono attive al potenziale a cui la corrente I_h inverte (V_{rev}), non è stato possibile determinare il V_{rev} direttamente.

Pertanto per poter calcolare il potenziale di inversione della I_h (E_h o V_{rev}) è stato utilizzato il metodo descritto da Mayer e Westbrook (Mayer & Westbrook 1983). Questo metodo si basa sulla proprietà di queste correnti di essere completamente attivate e di non presentare alcuna inattivazione tempo dipendente a potenziali di membrana più negativi di -95 mV. Il potenziale di inversione può essere, allora, determinato come punto di intersezione delle rette che descrivono la relazione corrente voltaggio istantanea a partire da -40mV (potenziale a cui la conduttanza non è attiva) e -95 mV (potenziale a cui la I_h è attiva).

Infatti la corrente ohmica è descritta dalla equazione della retta:

$$I_o(V) = g_o * (V - V_r)$$

dove V_r è il potenziale di membrana di riposo e g_o il reciproco della resistenza di membrana ($1/R_m$) (tale retta si costruisce riportando i valori di corrente istantanea misurati a partire da -40 mV).

La corrente h è, invece, descritta dall'equazione:

$$I_h(V) = g_h (V) * (V - E_h).$$

Per valori di potenziale a cui i canali sono completamente aperti l'equazione si semplifica in:

$$I_h(V) = g_h * (V - E_h),$$

dove g_h è la conduttanza massima. La corrente totale è data dalla somma di $I_o + I_h$:

$$I_{tot} = I_o + I_h = g_o * (V - V_r) + g_h * (V - E_h)$$

Questa retta si ottiene dalle correnti allo stato stazionario misurate a partire dal potenziale di -90 mV.

Come già detto, il punto di intersezione di queste due rette esprime il potenziale di inversione della corrente h :

$$g_o * (V - V_r) + g_h * (V - E_h) = g_o * (V - V_r)$$

da cui:

$$g_h * (V - E_h) = 0$$

e

$$E_h = V.$$

Overo le due rette si intersecano per $V = E_h$.

Questo metodo è stato applicato sistematicamente alle cellule analizzate, utilizzando come primo test un protocollo che prevedeva un preconditionamento a -60 mV, potenziale al quale la corrente h non risulta ancora attiva nelle cellule dopaminergiche della substantia nigra pars compacta (la soglia di attivazione è infatti -70 mV) e poi un secondo protocollo in cui la corrente era preventivamente attivata a -95 mV (figura 21).

Dall'intersezione delle rette che descrivevano la relazione corrente voltaggio istantanea a partire da -60 mV e -95 mV si è ottenuto un valore medio del potenziale di inversione pari a -45.01 ± 2.86 mV (n=8) (figura 21).

Tale procedura è soggetta a errori legati all'estrapolazione, ma nonostante ciò il valore di -45 mV da noi trovato non è molto diverso dai valori riportati da altri autori.

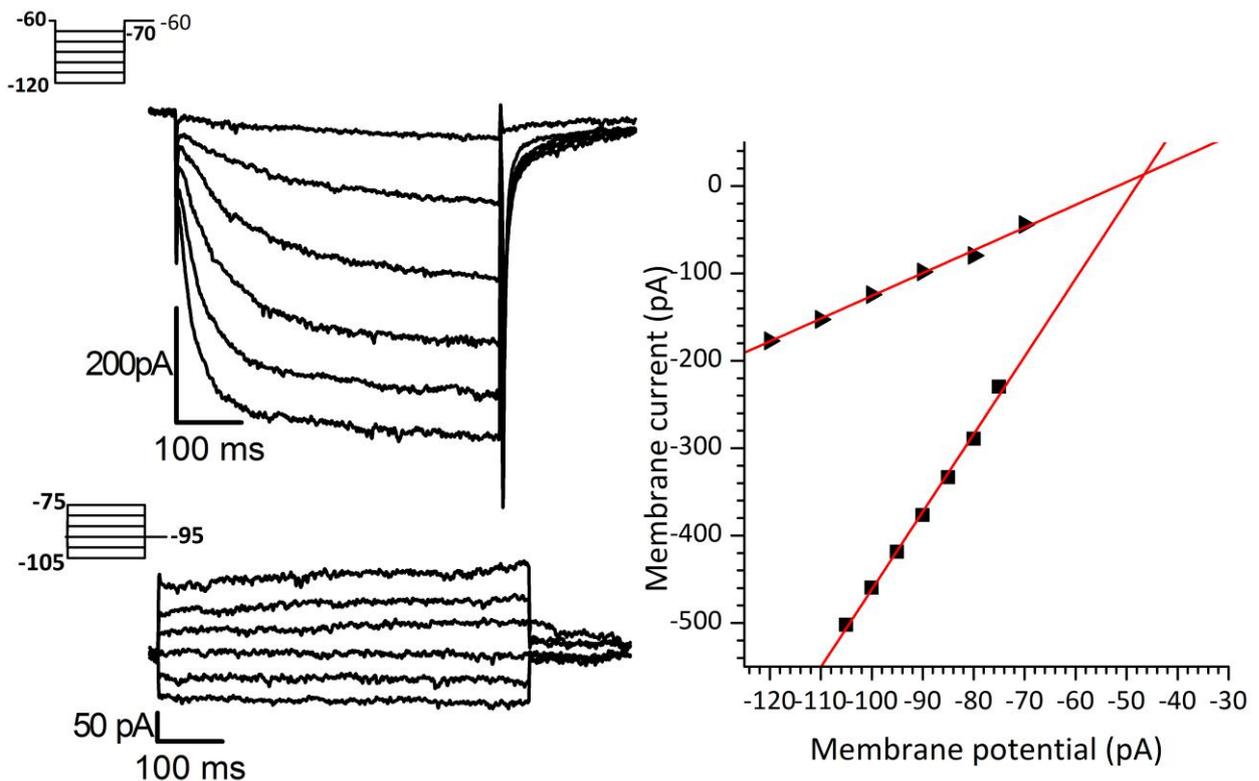


Figura 21: Protocolli utilizzati per stabilire il potenziale di inversione della corrente h (destra) ed esempio di tracciati e di calcolo del V_{rev} come punto di intersezione delle rette che descrivono la relazione corrente istantanea- voltaggio a partire dai potenziali di condizionamento di -60mV e -95 mV.

3.2 Effetto della temperatura

E' stato dimostrato, in vari tipi di preparato, che la cinetica della I_h è particolarmente sensibile alle condizioni termiche (Cuevas et al. 1997, Pena et al. 2006). I valori di Q_{10} riportati dai vari autori, relativamente alla ampiezza della corrente, si collocano nell'intervallo tra 1e4.

La temperatura alla quale vengono effettuate le registrazioni elettrofisiologiche, influenzando la cinetica della I_h , è uno dei fattori limitanti nella comparazione dei risultati.

In questo studio di caratterizzazione della I_h in cellule dopaminergiche della substantia nigra pars compacta, abbiamo ritenuto opportuno utilizzare durante l'attività sperimentale un sistema di controllo della temperatura, effettuando registrazioni prevalentemente a 27°C e 37°C.

I cambiamenti di temperatura hanno effetti pronunciati e riproducibili sulla I_h : il riscaldamento provoca una attivazione più rapida e un evidente aumento dell'ampiezza della corrente (figura 22).

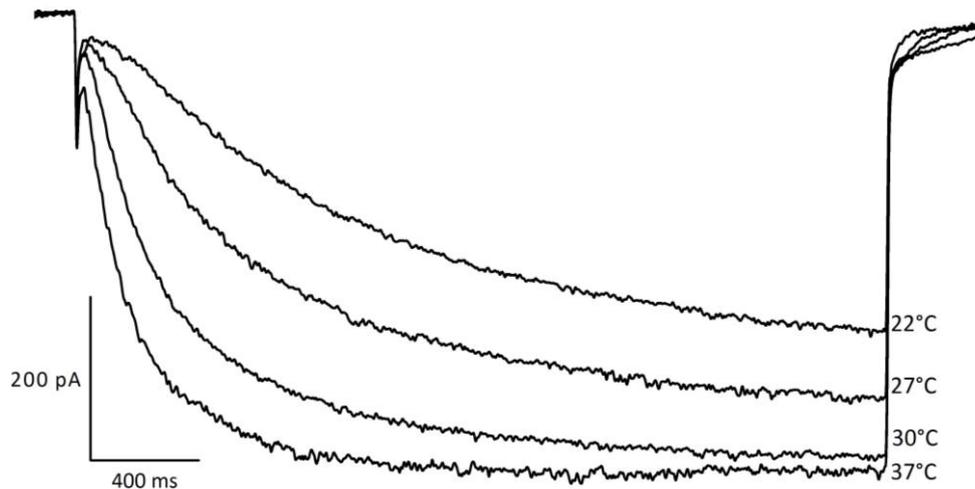


Figura 22: Traccianti di corrente I_h registrati dalla stessa cellula a diverse temperature; il protocollo di attivazione utilizzato è costituito da un singolo comando iperpolarizzante da -40 a -130 mV.

La figura 23 mostra l'effetto di un innalzamento di temperatura pari a 10°C sull'ampiezza della I_h . In grafico è riportata l'ampiezza della corrente registrata a 27°C (in nero) e a 37°C (in rosso) in funzione del potenziale. Il riscaldamento determina un aumento dell'ampiezza, che a -130 mV passa da un valore medio di -194.18 ± 18.51 pA a 27°C (n=19) a -569.06 ± 48.90 pA a 37°C (n=23). Per l'analisi statistica delle variazioni osservate, a seguito di un incremento di temperatura pari a 10 °C, è stato utilizzato un test *t Student* a due code per dati non appaiati.

La differenza di ampiezza della I_h risulta significativa per un P value < 0.0001.

Il valore medio di Q_{10} , relativo all'effetto della temperatura sull'ampiezza della I_h ai potenziali compresi tra -70 e -130 mV, è di 3.73.

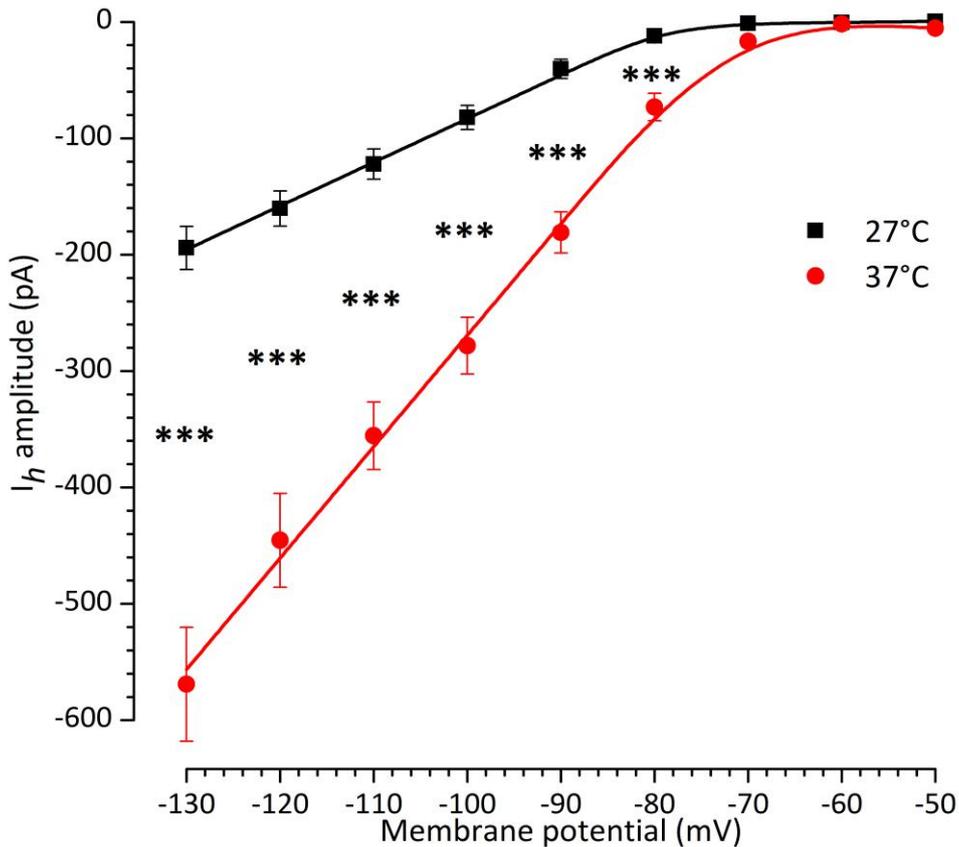


Figura 23: Relazione corrente voltaggio: l'ampiezza media della corrente h registrata a 27°C (in nero n=18) e a 37 °C (in rosso n = 20) è riportata in grafico in funzione del potenziale a cui la membrana è mantenuta. La differenza di ampiezza della I_h in seguito ad un incremento di temperatura di 10°C risulta significativa per un P value < 0.0001.

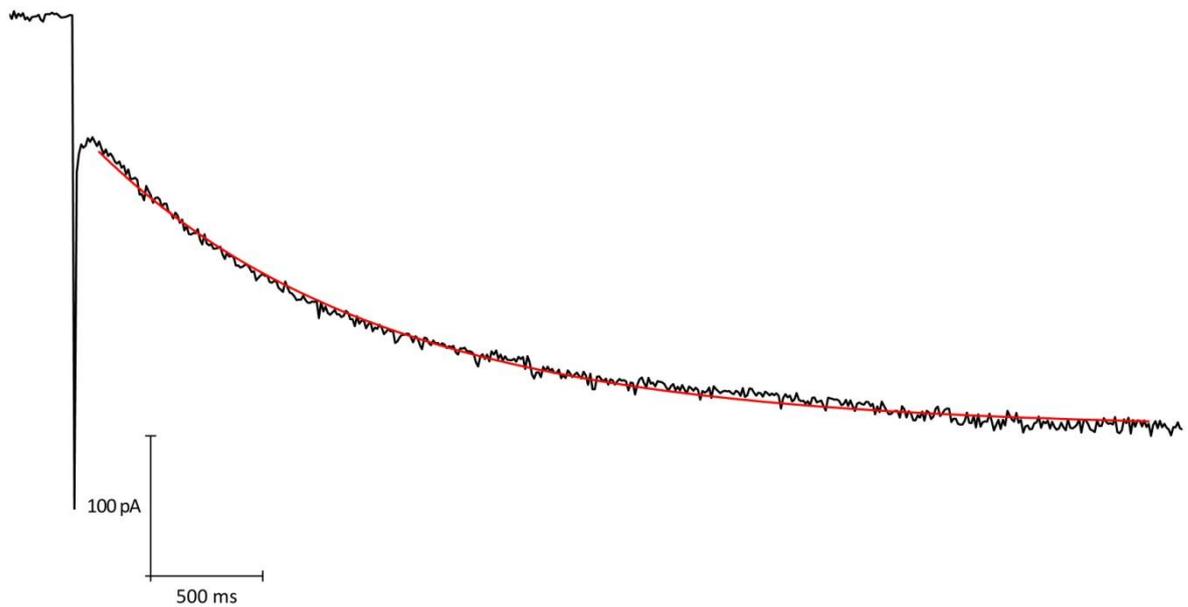
Il profilo di attivazione della corrente h a 27°C è ben descritta da un singolo esponenziale (figura 24a), la cui costante di tempo τ è chiaramente voltaggio dipendente, diminuendo con l'iperpolarizzazione (figura 28).

I tentativi di descrivere l'andamento temporale della I_h registrata a 37°C con un unico esponenziale hanno dato risultati poco precisi, mentre l'utilizzo di una doppia funzione esponenziale ha determinato un significativo miglioramento dell'interpolazione (figura 25a).

Al fine di mostrare la bontà del metodo di interpolazione utilizzato per le registrazioni effettuate alle due temperature, abbiamo riportato per ognuno il residuo al tempo T, ovvero la differenza tra il valore misurato al tempo T e il valore stimato (Fit). E' evidente dall'analisi dei residui risultanti dall'interpolazione con un singolo e con doppio esponenziale del tracciato di corrente ottenuto a 37°C, che un singolo esponenziale non è sufficiente per una accurata descrizione della traccia in quanto l'errore commesso sarebbe troppo elevato (figura 25b), mentre un singolo esponenziale è

descrive adeguatamente la cinetica di attivazione della corrente I_h registrata in esperimenti condotti a 27°C (figura 24b).

a



b

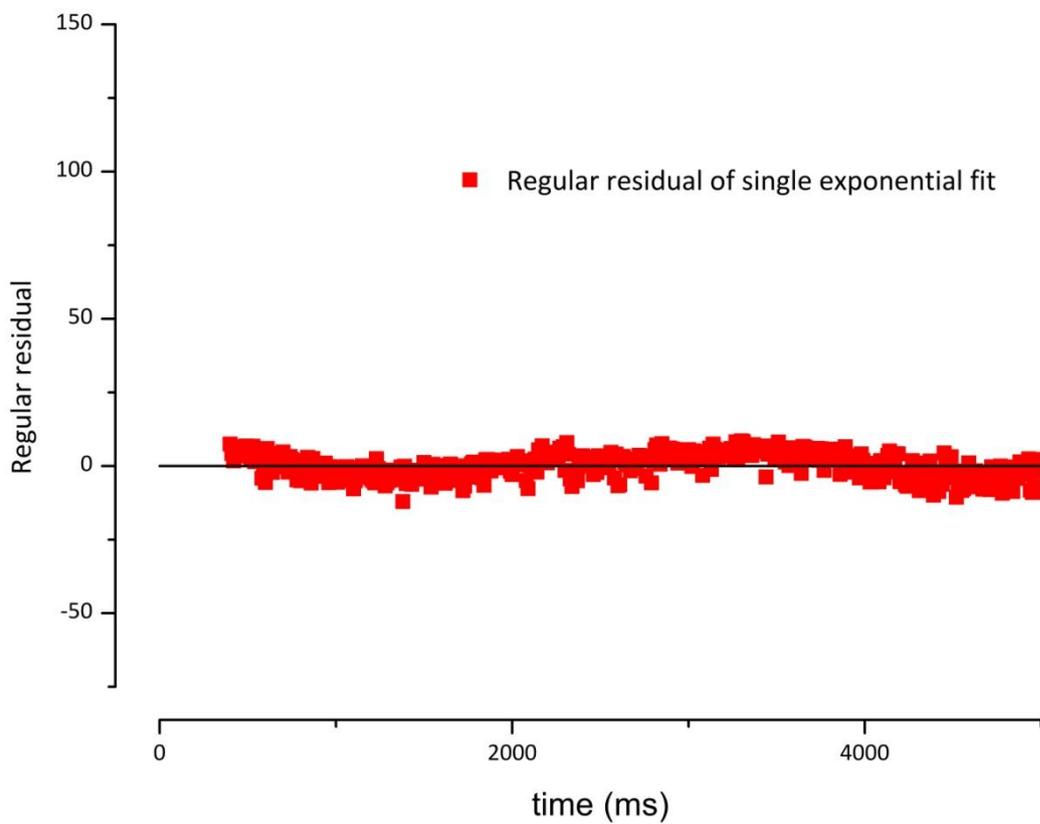


Figura 24: **a** Traccia della I_h ottenuta a -130 mV e 27°C. Un singolo esponenziale (in rosso) è sufficiente per una accurata interpolazione della traccia. **b** Residuo al tempo t relativo al singolo esponenziale.

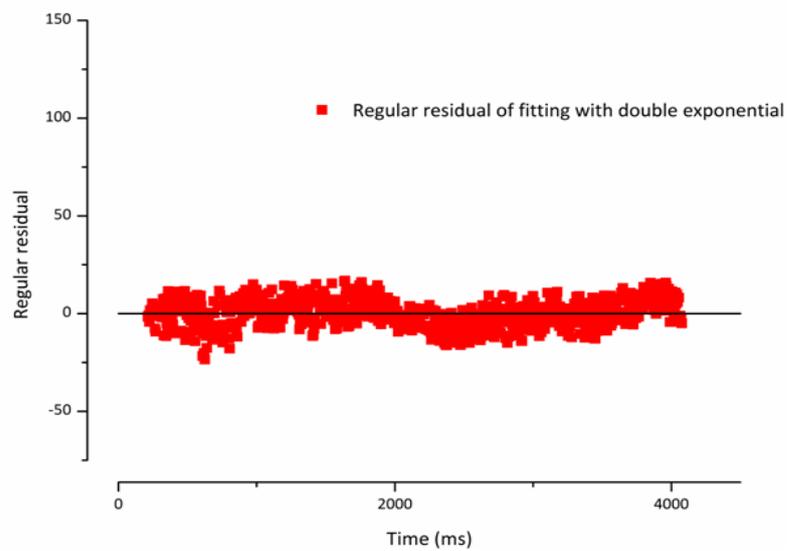
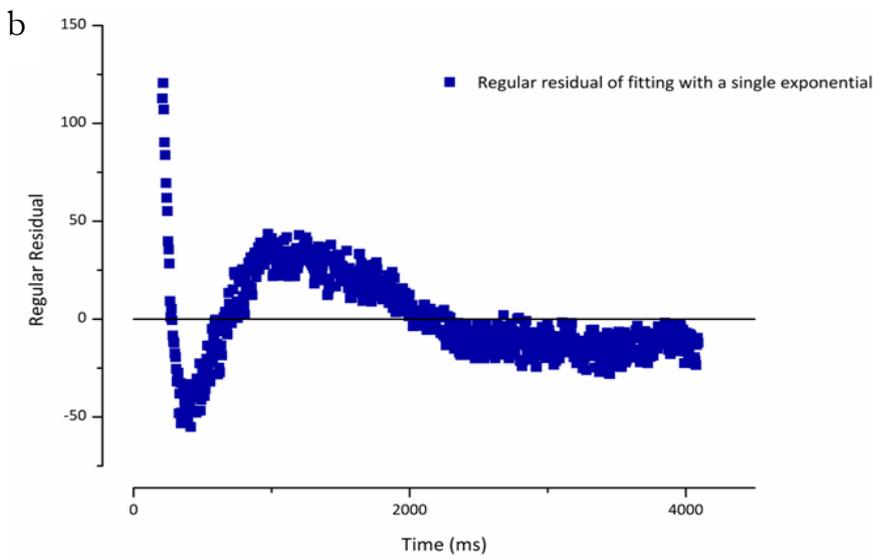
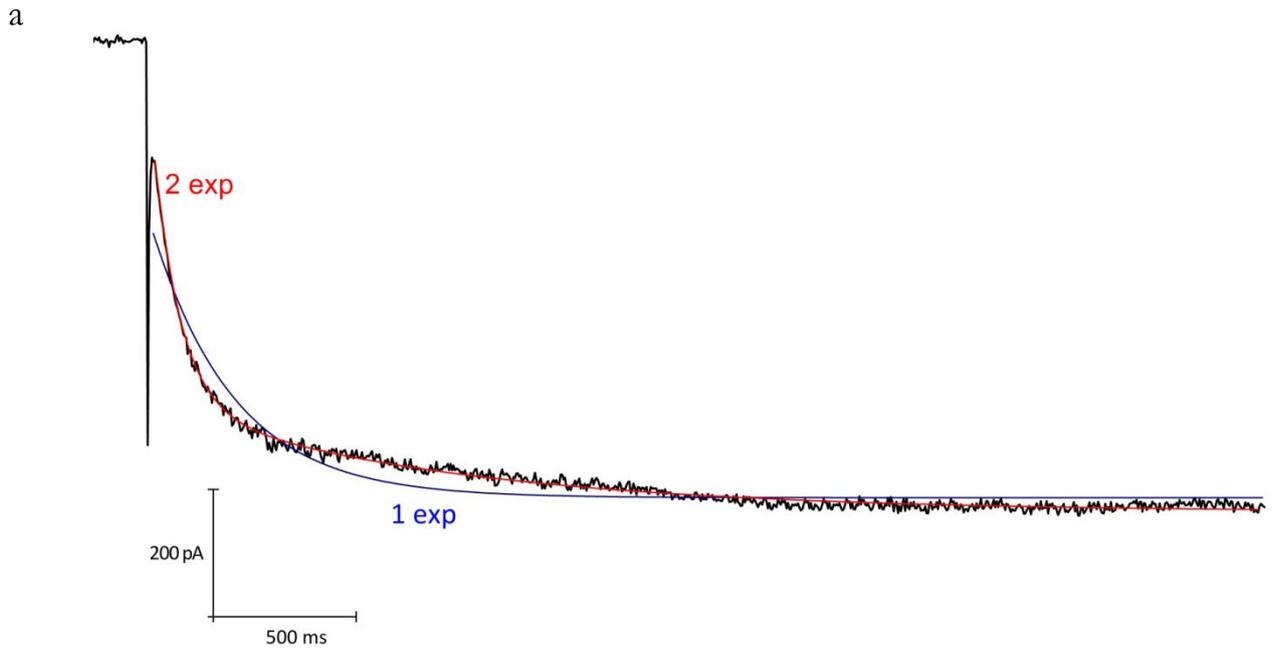


Figura 25: a Registrazione della corrente h effettuata a -130 mV e 37°C . Un singolo esponenziale (in blu) non è sufficiente per una accurata interpolazione della traccia, mentre un doppio esponenziale (in rosso) descrive il processo di attivazione in maniera soddisfacente b In alto: residuo al tempo t relativo al singolo esponenziale; in basso: residuo al tempo t ottenuto dall'interpolazione della stessa traccia con due esponenziali.

Per l'analisi cinetica i valori dell'ampiezza di corrente delle *tail*, ottenute a 27°C e 37°C, sono stati normalizzati e riportati in grafico in funzione del potenziale a cui la membrana era mantenuta per 4s.

Le cinetiche di attivazione voltaggio dipendenti sono descritte da due funzioni sigmoidali (figura 26) che interpolate con la funzione di Boltzmann (vedi equazione 2) hanno permesso di ricavare i valori di potenziale ai quali si raggiunge il 50% dell'attivazione massima (V_{50}) e le relative pendenze delle relazioni corrente voltaggio (*slope*).

Come si evince dal grafico il passaggio da 27°C (sigmoide nera) a 37°C (sigmoide rossa) determina uno spostamento della curva di attivazione di circa +10 mV, infatti il V_{50} è di -94.88 ± 1.07 mV a 27°C (n=13) contro -84.17 ± 1.31 mV a 37°C (n=18) e tale differenza è significativa per un valore di $P < 0.0001$. Non si verifica invece alcun cambiamento significativo nella ripidezza della relazione (la *slope* è pari a 8 ± 0.37 mV a 27°C e 7.74 ± 0.40 mV a 37°C).

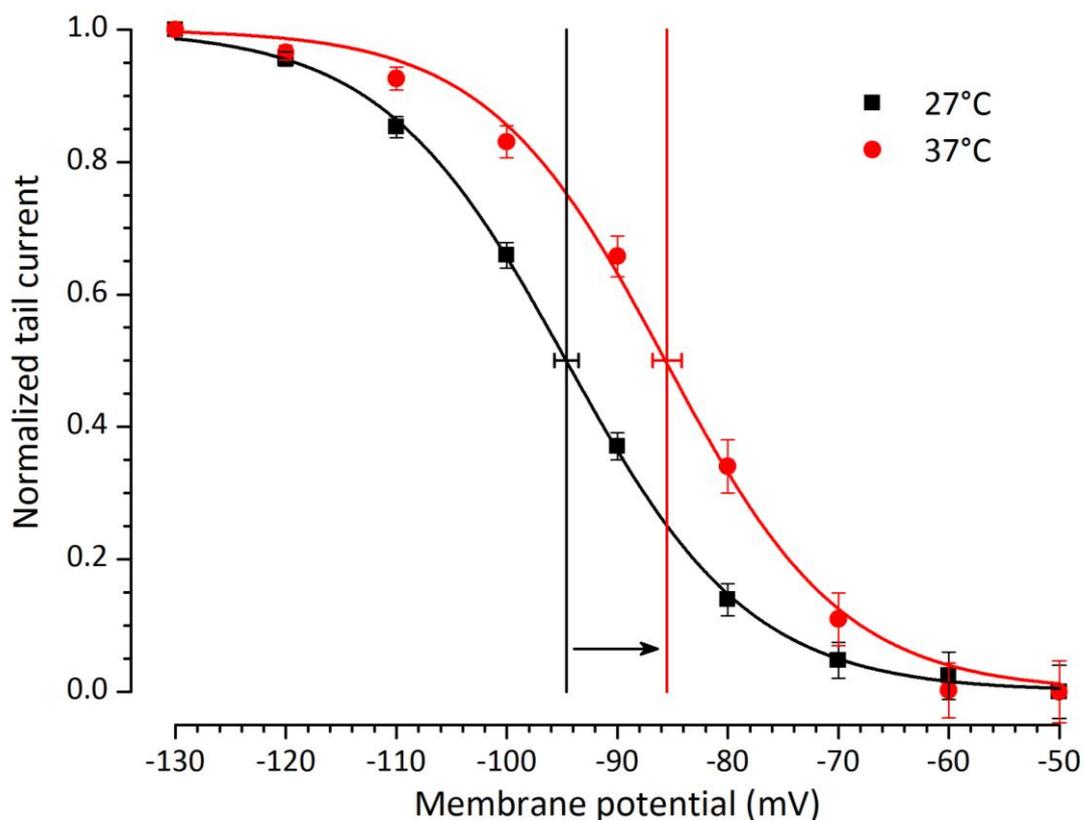


Figura 26: Voltaggio dipendenza delle curve di attivazione allo stato stazionario ottenute da registrazioni eseguite a 27°C (sigmoide nera) e 37°C (sigmoide rossa). I valori della corrente istantanea delle tail sono stati normalizzati e riportati in grafico in funzione del potenziale. Le cinetiche di attivazione voltaggio dipendenti sono descritte da due sigmoidi, interpolate con le relative funzioni di Boltzmann: $I_{tail}/I_{tailmax} = \{1 + \exp[(V + 84.17)/8]\}^{-1}$ a 27°C (sigmoide nera) e $I_{tail}/I_{tailmax} = \{1 + \exp[(V + 94.88)/7.74]\}^{-1}$ a 37°C (sigmoide rossa). Il passaggio da 27°C a 37°C determina uno spostamento della curva di attivazione di circa +10 mV. Tale differenza è significativa per un valore di $P < 0.0001$.

Si è, inoltre, analizzata la dipendenza del potenziale di metà attivazione dalla durata dello step iperpolarizzante (1,2,4 e 8 s) nelle due condizioni di temperatura (27 e 37 °C). Come mostrato nel grafico (figura 27), sia a 37°C che a 27°C, all'aumentare della durata dello stimolo di condizionamento si ottengono valori di V_{50} meno negativi ma, mentre a 37°C la curva di attivazione si sposta di + 9.37mV passando da uno stimolo di 1 s a uno di 8 s (n=9), a 27°C lo slittamento è di +11.6 mV (n=6).

I diversi valori di V_{50} , ottenuti modificando la durata dei comandi iperpolarizzanti, possono essere interpolati con l'equazione esponenziale 3 da cui si ricava:

- il valore di \bar{V}_{50} , cioè l'ambito di variazione del potenziale, pari a -19.65 ± 2.69 mV a 27°C e -13.88 ± 1.58 mV a 37°C;
- la costante di tempo τ della variazione di V_{50} , pari a 2.45 ± 0.88 s a 27°C e di 3.21 ± 1.42 s a 37°C.

Le differenze riscontrate tra i valori di V_{50} alle due diverse temperature sono significative per un $P < 0.0001$ per durate dello step iperpolarizzante da 1 a 4s, mentre se l'iperpolarizzazione è protratta per 8 s il $P < 0.0007$.

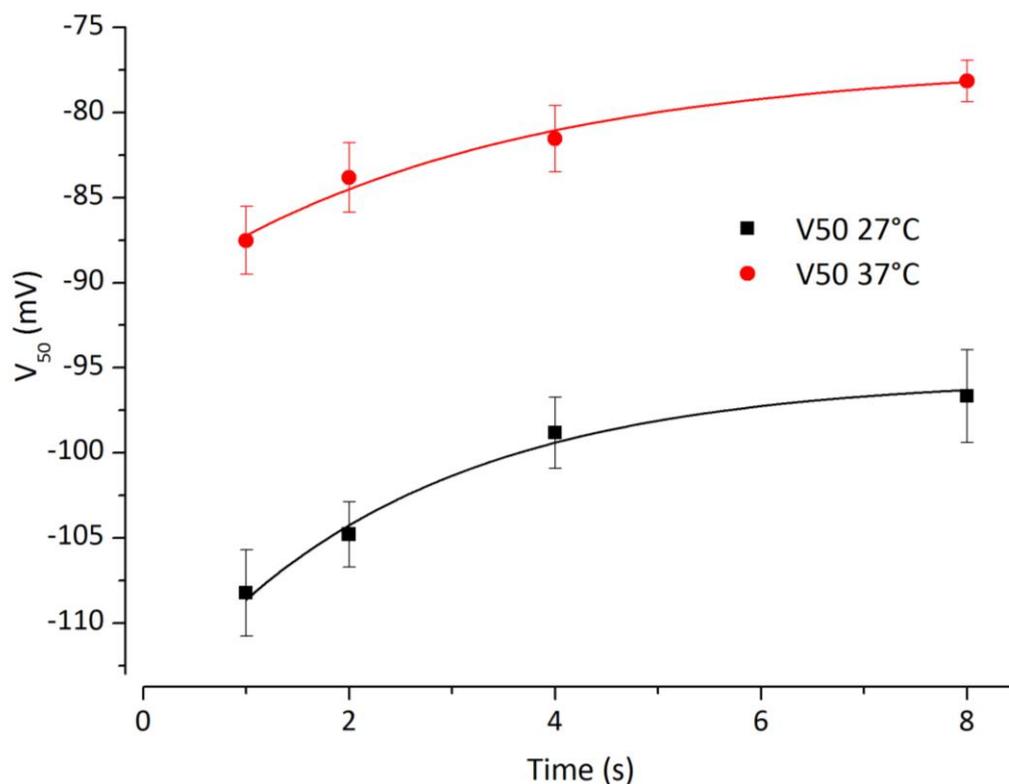


Figura 27: Dipendenza del V_{50} dalla durata del condizionamento. All'aumentare della durata dell'impulso si verifica uno spostamento in senso depolarizzante dei valori di V_{50} sia a 37°C (in rosso) che a 27°C (in nero). L'equazione che descrive lo spostamento del potenziale di metà attivazione in funzione della durata del comando iperpolarizzante a 27°C è $V_{50(t)} = -95.55 - 19.65 \cdot \exp(-t/2.45)$, mentre quella a 37°C è $V_{50(t)} = -77.05 - 13.88 \cdot \exp(-t/3.21)$

La figura 28 mostra l'effetto delle variazioni di temperatura sulla costante di tempo di attivazione. Sono state riportate in grafico le τ a 27°C (quadrati neri) e le costanti di tempo di attivazione veloci τ_1 a 37°C in funzione del potenziale. Aumentando la temperatura di 10°C la costante τ diminuisce sensibilmente: ad esempio la τ misurata a -130 mV risulta di 675.75 ± 68.19 ms a 27°C (n=21) contro 86.61 ± 7.08 ms a 37°C (n=19), differenza significativa con un $P < 0.0001$. Il Q_{10} medio, per l'effetto della temperatura sulla τ ai potenziali da -70 a -130 mV, è particolarmente elevato: circa 10.83. Per descrivere l'andamento delle due costanti di tempo di attivazione in funzione del potenziale i valori delle τ alle due temperature, sono stati interpolati con l'equazione 1, dove:

- k è il valore a cui tende τ con l'aumentare della iperpolarizzazione, pari a 289.46 ± 273.9 ms a 27°C e 62.91 ± 28.34 a 37°C;
- \bar{t} , l'ambito di variazione delle costanti di tempo di attivazione pari a 6386.7 ± 289.02 a 27°C e 434.0 ± 29.65 ms a 37°C;
- v è la costante che descrive la dipendenza di τ dal voltaggio V , ovvero la variazione di potenziale necessaria affinché avvenga 1/e della variazione di τ , ed è pari 15.23 ± 1.79 mV a 27°C e 15.52 ± 2.74 mV a 37°C.

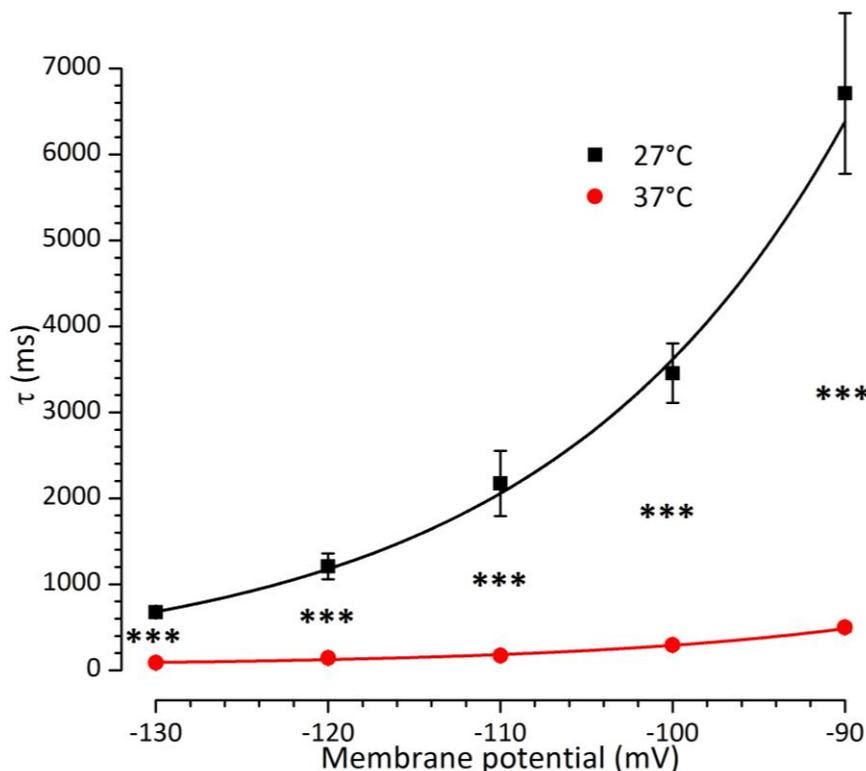


Figura 28: Effetto della variazione di temperatura sulla costante di tempo di attivazione. In grafico sono state riportate le τ a 27°C (quadrati neri) e le costanti di tempo di attivazione veloci τ_1 a 37°C (cerchi rossi) in funzione del potenziale. I valori delle τ sono stati interpolati con le seguenti funzioni esponenziali: $t_{(V)} = 289.46 + 6386.7 \cdot \exp(-V/15.23)$ a 27°C e $t_{(V)} = 62.91 + 434 \cdot \exp(-V/15.52)$ a 37°C. Aumentando la temperatura di 10°C a parità di potenziale di condizionamento la costante τ diminuisce. Tale differenza è significativa con un $P < 0.0001$.

L'analisi del tempo di deattivazione è stata eseguita utilizzando un protocollo a doppio impulso che prevedeva un potenziale di mantenimento di -40 mV a cui faceva seguito un primo test a -130 mV, successivamente la membrana era ripolarizzata a -40 mV per intervalli di tempo variabili e nuovamente iperpolarizzata a -130 mV (figura 20).

Per calcolare la costante di tempo di deattivazione i valori delle ampiezze delle correnti registrate a 27°C (n=3) e 37°C (n=5) sono stati normalizzati, riportati in grafico in funzione della durata del comando depolarizzante e interpolati con la funzione esponenziale, descritta dall'equazione 4 (figura 29, in rosso), da cui si ricava un valore di \bar{I} di -1.04 ± 0.03 a 27°C e -0.69 ± 0.06 a 37°C e una costante di tempo di deattivazione pari a 1.46 ± 0.1 s a 27°C e 0.45 ± 0.07 s a 37°C.

In blu è indicato il limite per un intervallo di confidenza del 95% e, come si può dedurre dal grafico, la funzione prescelta ben descrive l'andamento delle costanti di tempo.

Nella figura 29, in alto è riportata la variazione delle ampiezze di corrente registrate a 27°C in funzione del tempo; in basso, quella relativa alle registrazioni effettuate a 37°. La differenza tra le τ è significativa per un $P < 0.0003$. Il Q_{10} calcolato per tale variazione è pari a 3.2.

I dati sperimentali, fin qui descritti, relativi agli effetti della temperatura sulla I_h , indicano che i cambiamenti nella temperatura corporea potrebbero avere notevoli ripercussioni sull'ampiezza e sulla cinetica della I_h .

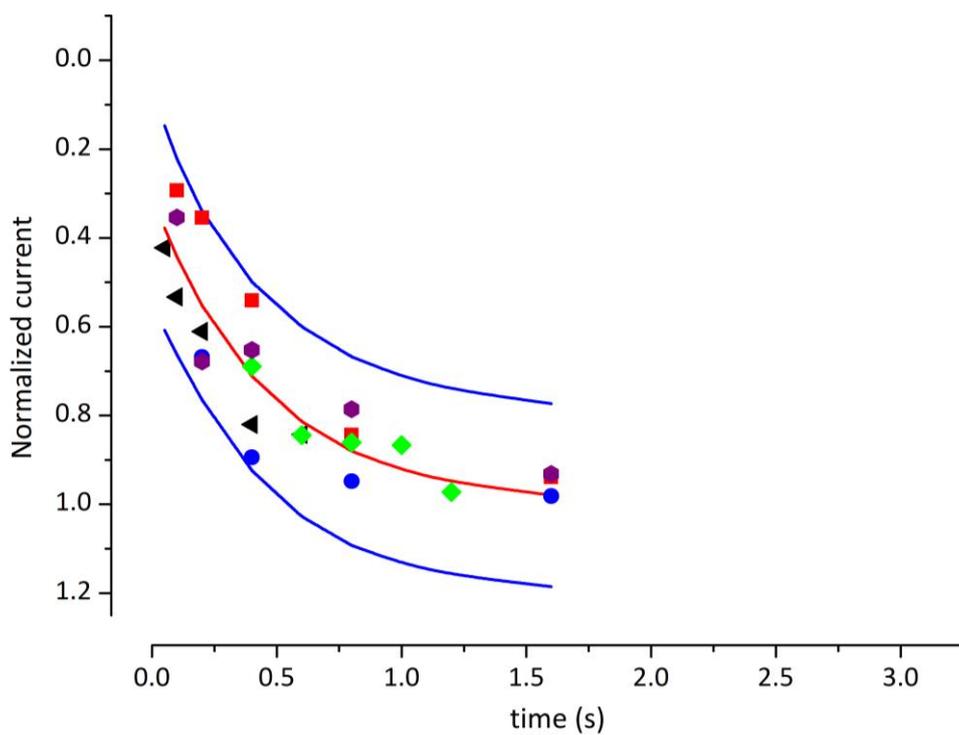
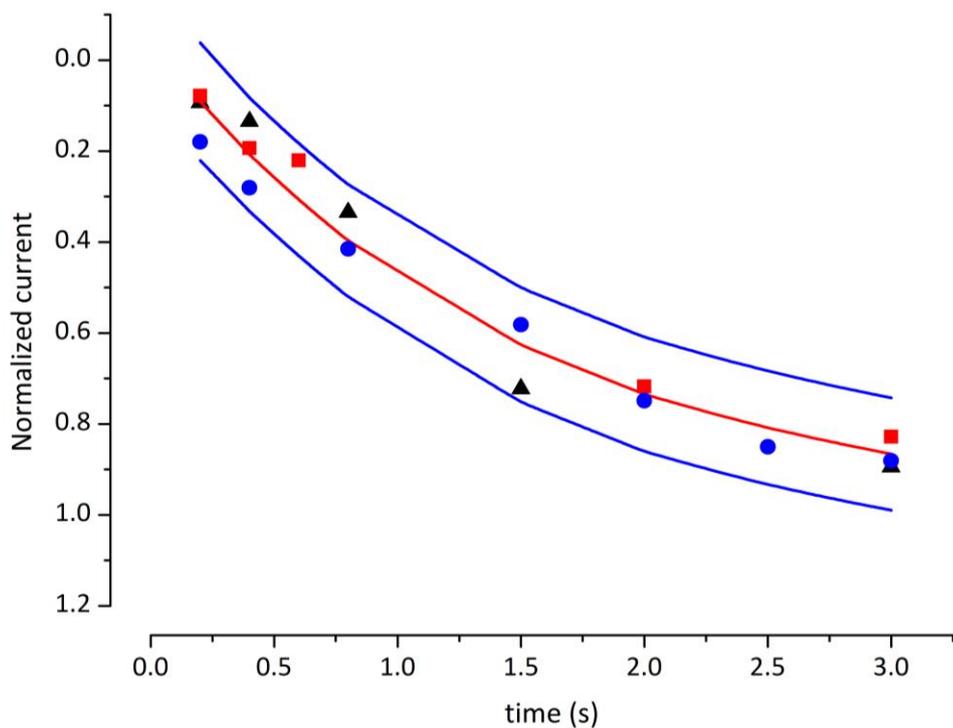


Figura 29: I dati relativi ai singoli esperimenti (indicati da simboli diversi) sono stati normalizzati, riportati in grafico in funzione della durata dell'impulso depolarizzante e interpolati con un esponenziale. L'andamento temporale della deattivazione della corrente h è descritto dall'equazione $I(t) = 1 - 1.04 \cdot \exp(-t/1.46)$ a 27°C (in alto) e da $I(t) = 1 - 0.69 \cdot \exp(-t/0.45)$ a 37°C (in basso). In blu sono stati messi in evidenza i limiti per un intervallo di confidenza del 95%.

3.3 Profilo farmacologico

La corrente I_h è sensibile a basse concentrazioni di Cs (1-2 mM) e a un certo numero di composti organici capaci di bloccare in maniera specifica tale corrente quali ZD7288 (Gasparini & DiFrancesco 1997) e S-16257 (ivabradina) (Bucchi et al. 2002, Bucchi et al. 2006). Si è quindi vagliato l'effetto di tale sostanza sulla I_h delle cellule dopaminergiche della substantia nigra pars compacta.

1 mM di cesio, aggiunto alla soluzione extracellulare, sopprime la fase depolarizzante (saccatura) nella risposta alla iniezione di un gradino di corrente iperpolarizzante, trasformando la risposta in una tipica curva RC (resistiva-capacitativa) in circa 2.5 minuti (figura 30).

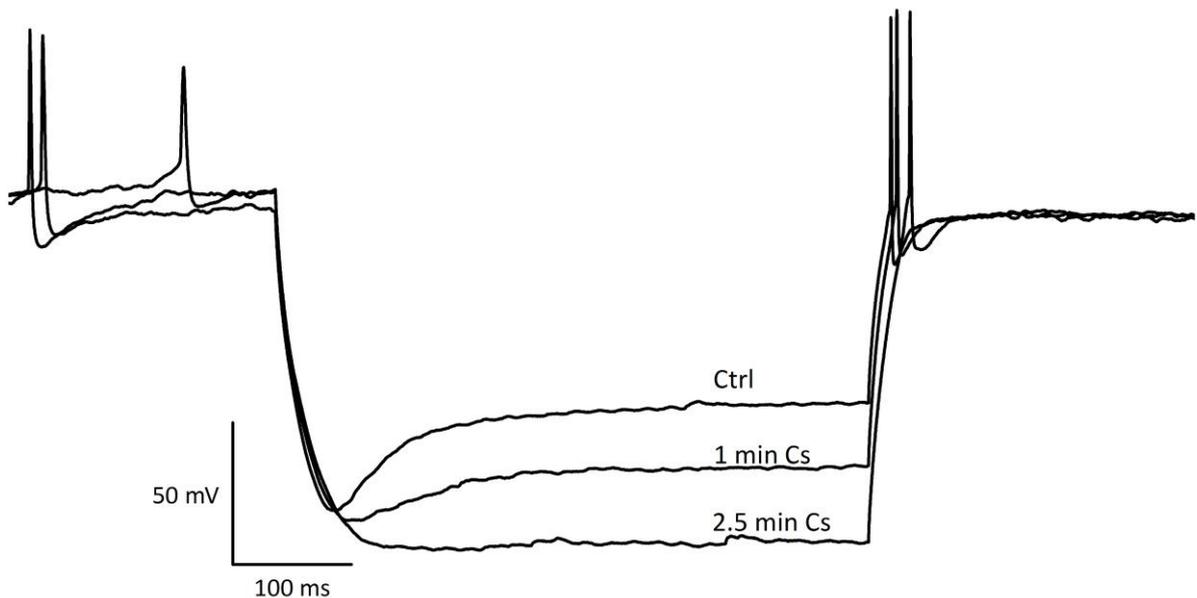


Figura 30 : Risposta di una tipica cellula dopaminergica della SNe in condizioni di current-clamp alla iniezione di un gradino di corrente iperpolarizzante di 300 pA al potenziale di holding di -60 mV. In condizioni di controllo l'impulso iperpolarizzante evoca una risposta in voltaggio che presenta una evidente "saccatura" tempo dipendente, bloccata dal Cs 1 mM. In figura è riportato sia il blocco parziale ottenuto dopo 1 minuto di applicazione di Cs sia quello totale dopo 2.5 min.

L'identificazione di questa corrente come I_h è stata ulteriormente confermata dall'uso di un bloccante specifico, l'ivabradina, che alla dose 10 μ M blocca completamente la corrente dopo 10 minuti di applicazione focale (figura 31).

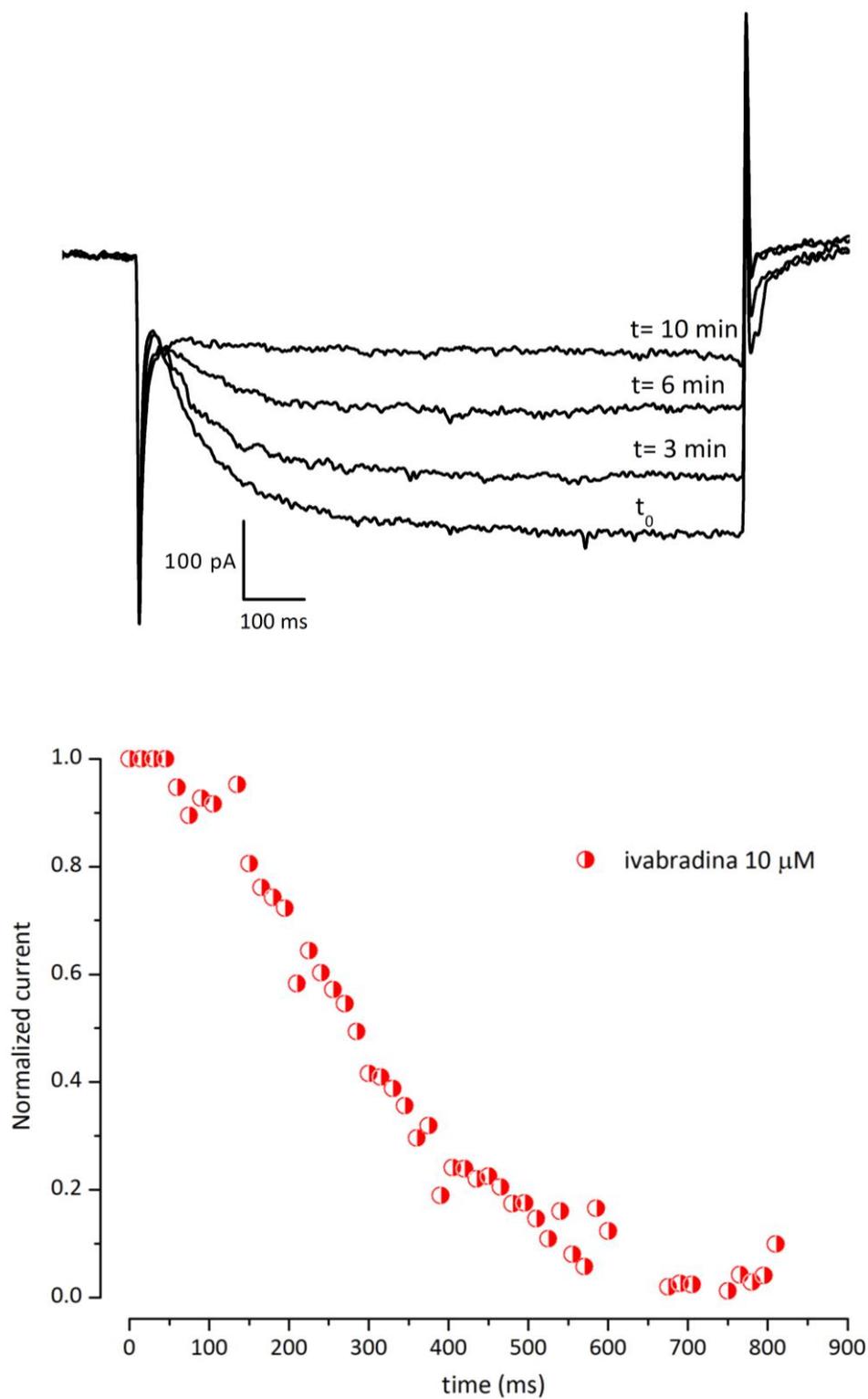


Figura 31: In alto: blocco della corrente h indotto dall'applicazione di ivabradina 10 μ M. Le quattro tracce rappresentate in figura sono ottenute con un protocollo di *voltage clamp* in cui a un potenziale di preconditionamento di -40 mV segue uno stimolo iperpolarizzante a -130 mV e si riferiscono a tempi progressivamente crescenti di applicazione di ivabradina (0, 3, 6, 10 min.).

In basso: esempio di andamento temporale del blocco da ivabradina, ottenuto ripetendo un test di attivazione della corrente da -40 a -130 mV a intervalli regolari di 15 s in presenza di ivabradina.

3.4 Modulazione della I_h ad opera del cAMP intracellulare

La corrente h è attivata non solo dall'iperpolarizzazione ma anche da una modulazione diretta da parte dei nucleotidi ciclici (cAMP e cGMP). Ciò è stato esaurientemente dimostrato in patch excisi sia di canali nativi che ricombinanti (Gauss et al. 1998, Ludwig et al. 1998, DiFrancesco & Tortora 1991). I nucleotidi ciclici regolano i canali HCN legandosi al dominio di legame dei nucleotidi ciclici (CNBD), localizzato nel segmento C-terminale.

3.4.1 Forskolina

Per valutare l'effetto di un incremento dei livelli intracellulari di cAMP, sono stati aggiunti alla soluzione extracellulare la forskolina, attivatore dell'adenilato ciclasi, e l'IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine, un inibitore delle fosfodiesterasi.

I primi esperimenti sono stati condotti in *current clamp* per determinare quali fossero gli effetti di un aumento del cAMP intracellulare sul potenziale di membrana di riposo.

In tre cellule l'aggiunta di forskolina (10 μ M) alla soluzione extracellulare ha determinato una depolarizzazione di circa 3.5 mV dopo 4 minuti di applicazione, ma l'effetto tendeva poi ad esaurirsi nei successivi 5 minuti con un ritorno al potenziale di membrana di riposo pur continuando ad applicare la forskolina (figura 32, curva a campana in nero). Per contro, se alla soluzione extracellulare arricchita di forskolina si aggiunge IBMX (0.1 mM), la depolarizzazione che ne deriva è sensibilmente più marcata (circa 6 mV), ma soprattutto si mantiene fintanto che si prolunga l'applicazione della forskolina (figura 32, grafico in rosso, $n=3$).

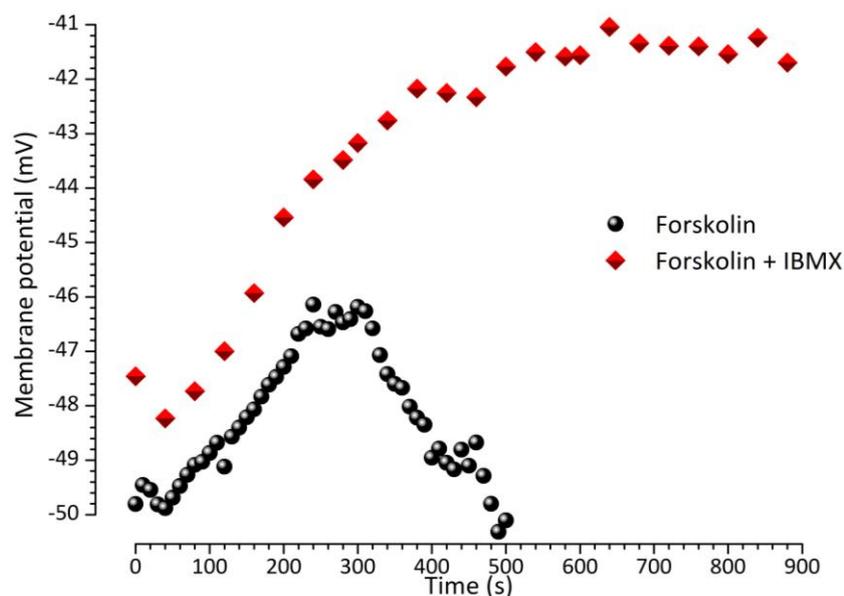


Figura 32: Effetto di forskolina e IBMX sul potenziale di membrana di riposo.

Per stabilire l'esistenza di una correlazione tra l'effetto riscontrato sul potenziale di membrana e una possibile modulazione dei canali HCN nelle cellule dopaminergiche della SNc, e per vagliare quanto i canali, presenti in quest'area cerebrale, fossero sensibili ai nucleotidi ciclici, sono stati condotti esperimenti nella configurazione detta *perforated patch* (patch perforato) con amfotericina B nella pipetta. Questa configurazione permette solo una parziale comunicazione tra l'ambiente intra- ed extra-cellulare evitando che secondi messaggeri intracellulari vengano dilavati dalla soluzione fisiologica contenuta nella pipetta, come invece accade nella configurazione whole-cell convenzionale.

L'applicazione nel bagno di 10 μ M Forskolina e 0.1 mM IBMX, determina dopo 2 minuti un aumento dell'ampiezza della I_h . La figura 33 è un esempio dell'effetto della forskolina sulla corrente h, attivata con un protocollo a doppio impulso al fine di studiare la modulazione dell'ampiezza e della cinetica. Le tracce rappresentate sono state ottenute a -100 mV.

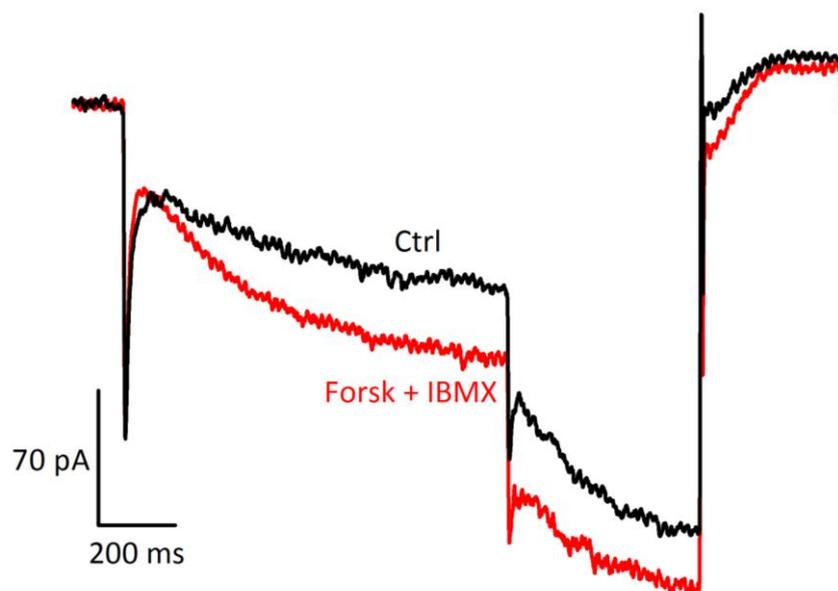


Figura 33: Registrazione in *voltage-clamp*: esempio dell'effetto di forskolina e IBMX sulla corrente I_h , attivata con un protocollo a doppio impulso. L'ampiezza della corrente è evidentemente incrementata da un aumento del cAMP intracellulare.

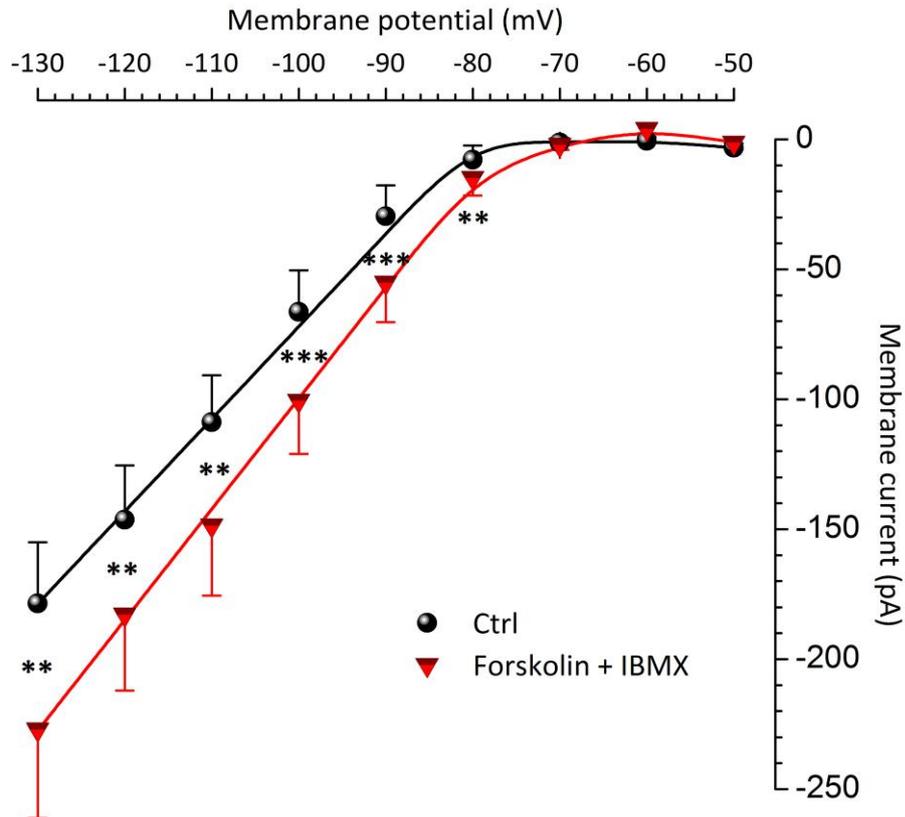


Figura 34: Relazione corrente voltaggio: l'ampiezza media della corrente I_h registrata è riportata in grafico in funzione del potenziale. L'ampiezza media ($n=8$) della I_h in seguito all'applicazione di forskolina e IBMX (in rosso) risulta significativamente maggiore ($P \text{ value} < 0.005$) rispetto a quella misurata in condizioni di controllo.

L'ampiezza della corrente aumenta significativamente in seguito all'applicazione nel bagno di forskolina e IBMX (figura 34): a -130 mV la corrente misurata è di -178.53 ± 23.48 pA in condizioni di controllo ($n=8$), contro -227.01 ± 34.17 pA ($n=8$) in presenza di aumentati livelli di cAMP. Queste analisi sono state condotte su 8 cellule, in cui è stato applicato il protocollo a doppio impulso prima e dopo l'applicazione dell'attivatore dell'adenilato-ciclastasi e dell'inibitore delle fosfodiesterasi. Per valutare la significatività delle differenze riscontrate nelle due condizioni è stato utilizzato un test T per dati appaiati ad una sola coda. Tutti gli incrementi in ampiezza registrati ai potenziali da -80 a -130 mV sono risultati significativi almeno per un $P < 0.005$.

L'effetto della forskolina sulla curva di attivazione allo stato stazionario è duplice.

In primo luogo il V_{50} si sposta in senso depolarizzante di 6.33 ± 0.68 mV ($n=8$) e tale slittamento è significativo per $P < 0.0005$ (figura 35).

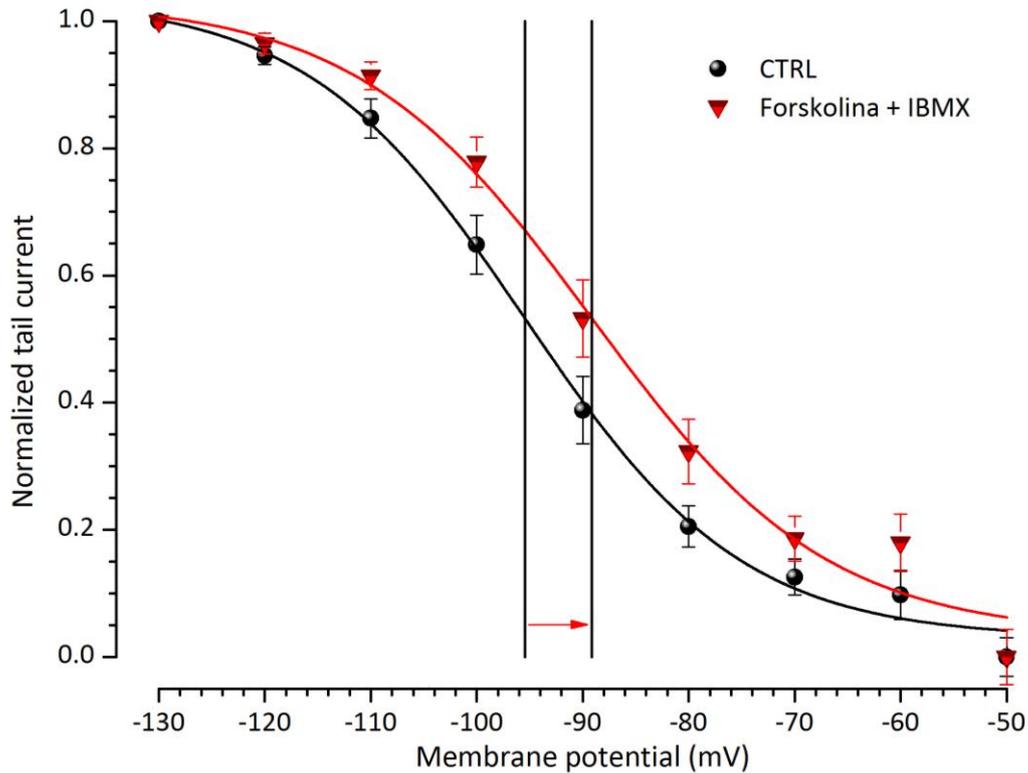


Figura 35: I valori medi della corrente istantanea delle tail ottenuti in condizione di controllo (cerchi neri) e in presenza di forskolina e IBMX (triangoli rossi) sono stati normalizzati e riportati in grafico in funzione del potenziale di condizionamento. Le cinetiche di attivazione voltaggio dipendenti sono descritte da due sigmoidi, interpolate con le relative funzioni di Boltzmann. In seguito all'aumento della concentrazione di cAMP intracellulare. Si verifica uno slittamento in senso depolarizzante di circa 6.33 mV della curva di attivazione della I_h . Tale differenza è significativa per un valore di $P < 0.0005$.

Inoltre, in presenza di forskolina e IBMX, il decorso temporale di attivazione della I_h è significativamente più veloce, la costante di tempo di attivazione a -100 mV è pari a 802.77 ± 171 ms in condizioni di controllo e 653.42 ± 149.3 ms in condizione di aumento di cAMP (figura 36).

È chiaro dai risultati fin qui riportati, che il decorso temporale della I_h è significativamente modificato da forskolina e IBMX e che variazioni della concentrazione intracellulare di cAMP, determinate da neurotrasmettitori, il cui legame al recettore influisca sull'attività dell'adenilato ciclasi, possono modificare la cinetica voltaggio dipendente della I_h .

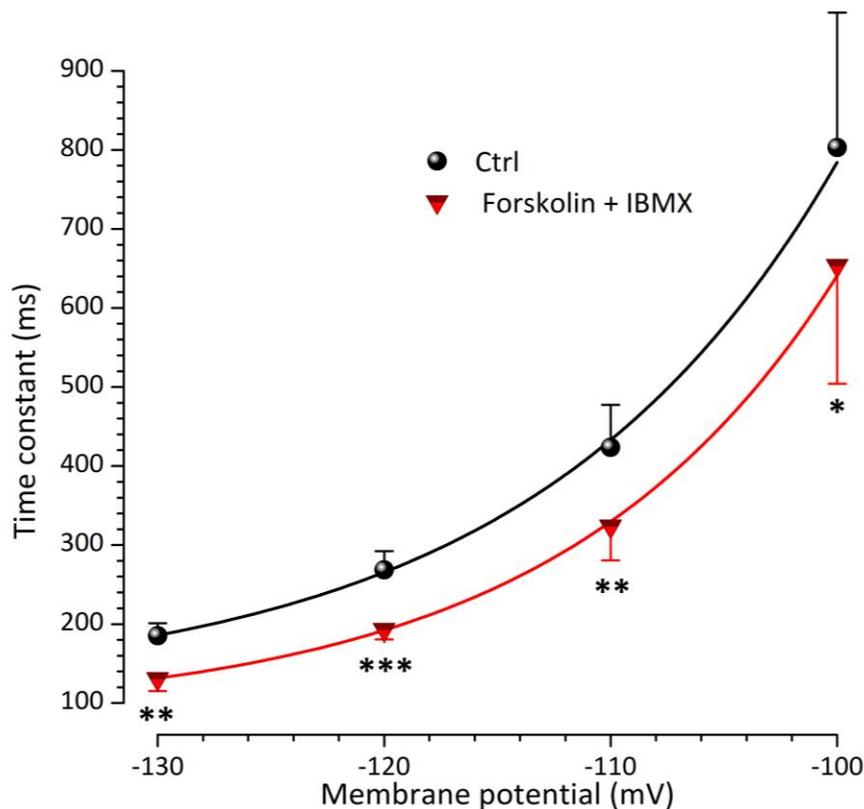


Figura 36: Effetto della variazione della concentrazione intracellulare di cAMP sulla costante di tempo di attivazione. In grafico sono state riportate le τ in controllo (cerchi neri) e le costanti di tempo di attivazione in forskolina e IBMX (triangoli rossi) in funzione del potenziale. Aumentando i livelli di nucleotidi ciclici intracellulari a parità di potenziale si registra una diminuzione delle τ . Tale differenza è significativa con un P value < 0.0005 a -120 mV, P value < 0.005 a -130 e -110 mV e P value < 0.025 a -100 mV.

3.4.2 Attivazione dei recettori dopaminergici D2

Dei recettori dopaminergici sinora clonati quelli D2 sono i più abbondantemente espressi nel mesencefalo dove hanno una importante funzione nella regolazione di numerose attività e nel rilascio di dopamina. In questa regione le cellule che esprimono mRNA per i D2 sono quelle della substantia nigra pars compacta e della VTA (Meador-Woodruff et al. 1989, Mengod et al. 1989).

Dati gli effetti della variazione dei livelli di cAMP sulla corrente h nelle cellule dopaminergiche della substantia nigra (vedi paragrafo 3.4.1), si è voluto indagare se l'attivazione dei recettori D2 avesse un effetto modulatore su tale corrente.

A tal fine sono stati condotti esperimenti nella configurazione detta *patch* perforato a 37°C in presenza dell'agonista dei recettori D2 quinpirolo (30 μ M).

L'ampiezza della corrente diminuisce significativamente in seguito all'applicazione di quinpirolo (figura 37): a -130 mV la corrente misurata è di -653.25 ± 221.50 pA in condizioni di controllo (n=6) contro -556.96 ± 189.16 pA (n=6). Queste analisi sono state condotte su 6 cellule, in cui è stato applicato un protocollo a singolo impulso da -40 mV a -130 mV prima e dopo l'applicazione dell'agonista dopaminergico. Per valutare la significatività delle differenze riscontrate nelle due condizioni è stato utilizzato un test T per dati appaiati a una sola coda. La riduzione in ampiezza registrata a -130 mV è risultata statisticamente significativa con un *p-value* di 0.0091.

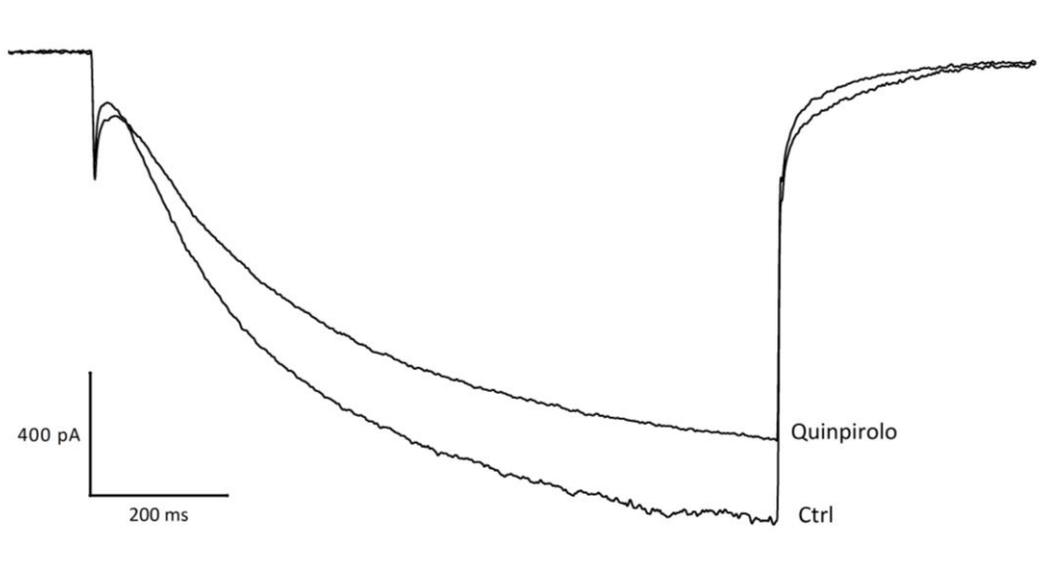


Figura 37: Registrazione in voltage-clamp : esempio dell'effetto del quinpirolo sulla corrente h , attivata con un protocollo a singolo impulso da -40 mV a -130 mV. L'ampiezza della corrente è evidentemente ridotta.

Per calcolare il tempo d'azione del quinpirolo, il protocollo a singolo impulso è stato ripetuto a intervalli regolari di 20 - 30 s a partire dall'applicazione focale del quinpirolo. I valori delle ampiezze delle correnti registrate a -130 mV sono stati normalizzati e i valori medi sono stati riportati in grafico in funzione del tempo di applicazione e interpolati dalla funzione esponenziale (figura 38 in rosso).

$$I_{(t)} = k + \bar{I} * e^{-t/\tau} \quad \text{EQUAZIONE 5}$$

in cui:

- $I_{(t)}$ è l'ampiezza normalizzata della corrente in funzione del tempo di applicazione del quinpirolo (t);

- k è il valore basale di I_h , 0.84 ± 0.01 ;
- \bar{I} , l'ambito di riduzione della corrente normalizzata, pari a 0.15 ± 0.01 ;
- τ , la costante di tempo, è di 93.41 ± 29.95 s.

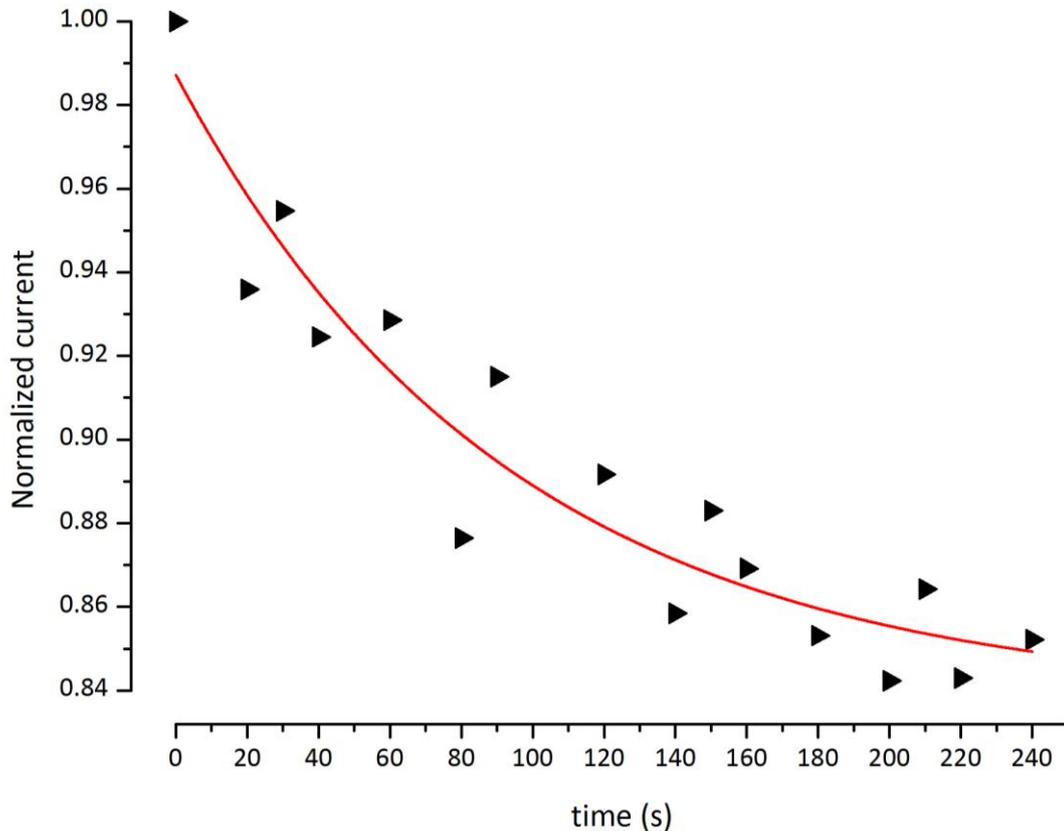


Figura 38: Andamento temporale della riduzione della corrente h in presenza di quinpirolo. I dati relativi ai singoli esperimenti sono stati normalizzati e riportati in grafico in funzione della tempo di applicazione del quinpirolo e sono stati interpolati con l'esponenziale $I(t) = 0.84 + 0.15 \cdot \exp(-t/93.41)$.

È possibile affermare che in presenza di quinpirolo, agonista D2 che, attivando il recettore, determina una inibizione dell'adenilato ciclasi, si verifica una riduzione della corrente di circa il 15% dopo 3 minuti di applicazione.

Per convalidare il risultato ottenuto si è testato l'effetto del sulpiride ($20 \mu\text{M}$), antagonista D2 utilizzando lo stesso protocollo a singolo impulso (figura 39). I risultati ottenuti dimostrano che il sulpiride determina un aumento della I_h quando è addizionato alla soluzione extracellulare successivamente al quinpirolo ($n=3$), ma –sorprendentemente- anche quando è applicato in condizione di controllo ($n=2$): il sulpiride, quindi, non solo antagonizza l'effetto dell'agonista ma determina un aumento della corrente h anche in assenza di agonisti D2 esogeni. Non essendo, però, il sulpiride un attivatore dell'adenilato ciclasi, l'effetto registrato può essere spiegato dalla

presenza in quest'area cerebrale di un rilascio spontaneo di dopamina (Geffen et al. 1976), la cui azione su autorecettori determina una inibizione tonica della ciclasi.

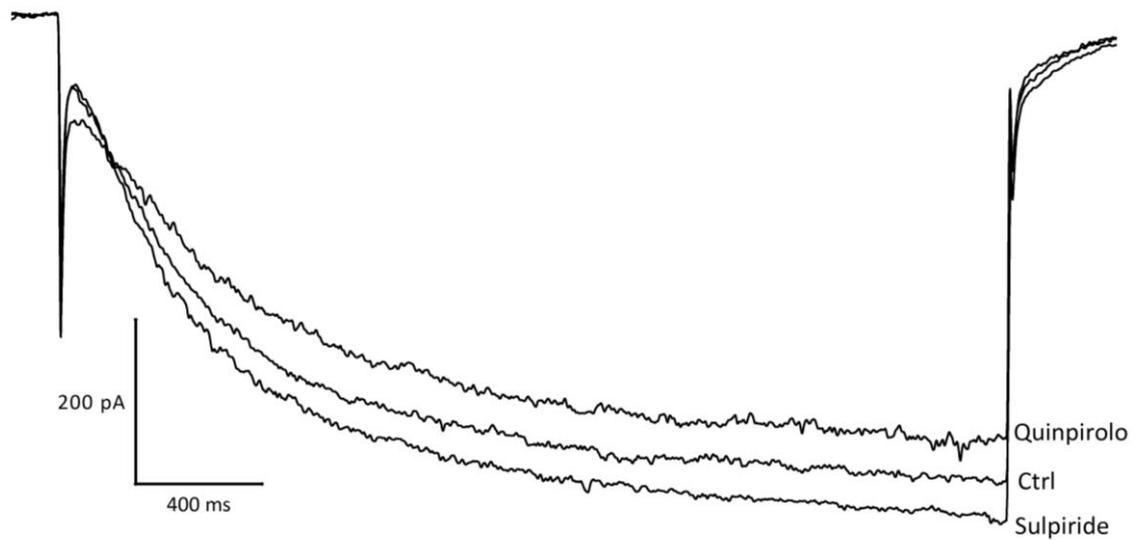


Figura 39: Esempio dell'effetto dell'agonista e dell'antagonista D2 sulla corrente h, attivata con un protocollo a singolo impulso da -40 mV a -130 mV. Nella stessa cellula si è proceduto ad applicare prima il quinpirolo, registrando una riduzione della corrente e poi sulpiride. In presenza di quest'ultimo la corrente aumenta, superando i valori di ampiezza del controllo.

3.4.3 Effetto della 5HT

È noto che la serotonina inibisce i canali HCN nelle cellule dopaminergiche della VTA attraverso l'attivazione dei recettori 5-HT_{2A} (Liu et al. 2003). Nedergaard e collaboratori (Nedergaard et al. 1991) hanno, invece, dimostrato che nella substantia nigra la 5-HT determina un aumento della corrente h.

Si è, quindi, verificato se la 5-idrossitriptamina (100 μM) avesse qualche effetto sulla corrente h effettuando degli esperimenti di *voltage clamp* nella configurazione *patch* perforato a 37°C.

Utilizzando un protocollo a singolo impulso da -40 mV a -130 mV, si è registrata, in seguito all'applicazione di serotonina, in 5 cellule su 8 una riduzione di ampiezza della I_h di circa il 20% (figura 40), mentre nelle altre 3 o non si è rilevata nessuna variazione della corrente (2 cellule) o un lieve aumento (1 cellula).

Per valutare la significatività della riduzione in ampiezza in seguito alla applicazione di serotonina, è stato eseguito un test T per dati appaiati a una sola coda. La riduzione in ampiezza registrata a -130 mV è risultata statisticamente significativa con un *p-value* di 0.0358.

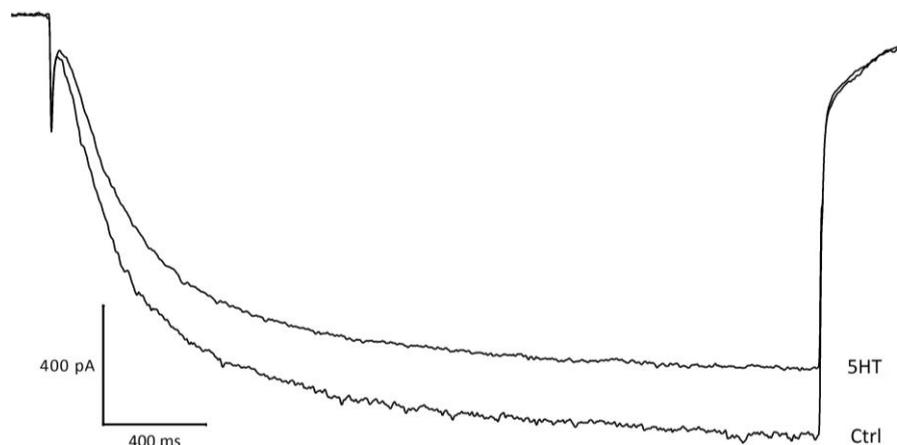


Figura 40: Effetto della 5HT sulla I_h: la serotonina determina una riduzione dell'ampiezza della corrente.

Il protocollo a singolo impulso è stato ripetuto a intervalli regolari di 30 s durante l'applicazione della serotonina. I valori delle ampiezze delle correnti registrate a -130 mV sono stati normalizzati, i valori medi sono stati rappresentati in grafico in funzione del tempo di applicazione e interpolati con la funzione esponenziale 5 (figura 41), nella quale: $I_{(t)}$ è l'ampiezza normalizzata della corrente in funzione del tempo di applicazione della serotonina(t), k, il valore basale della I_h, è 0.80

± 0.008 , \bar{I} , l'ambito di riduzione della corrente normalizzata, risulta pari a 0.19 ± 0.01 , τ , la costante di tempo è di 67.51 ± 9.7 s.

Dai risultati ottenuti si evince che, nella maggior parte delle cellule testate, la 5HT riduce la corrente h di circa il 20 % dopo 3 minuti di perfusione.

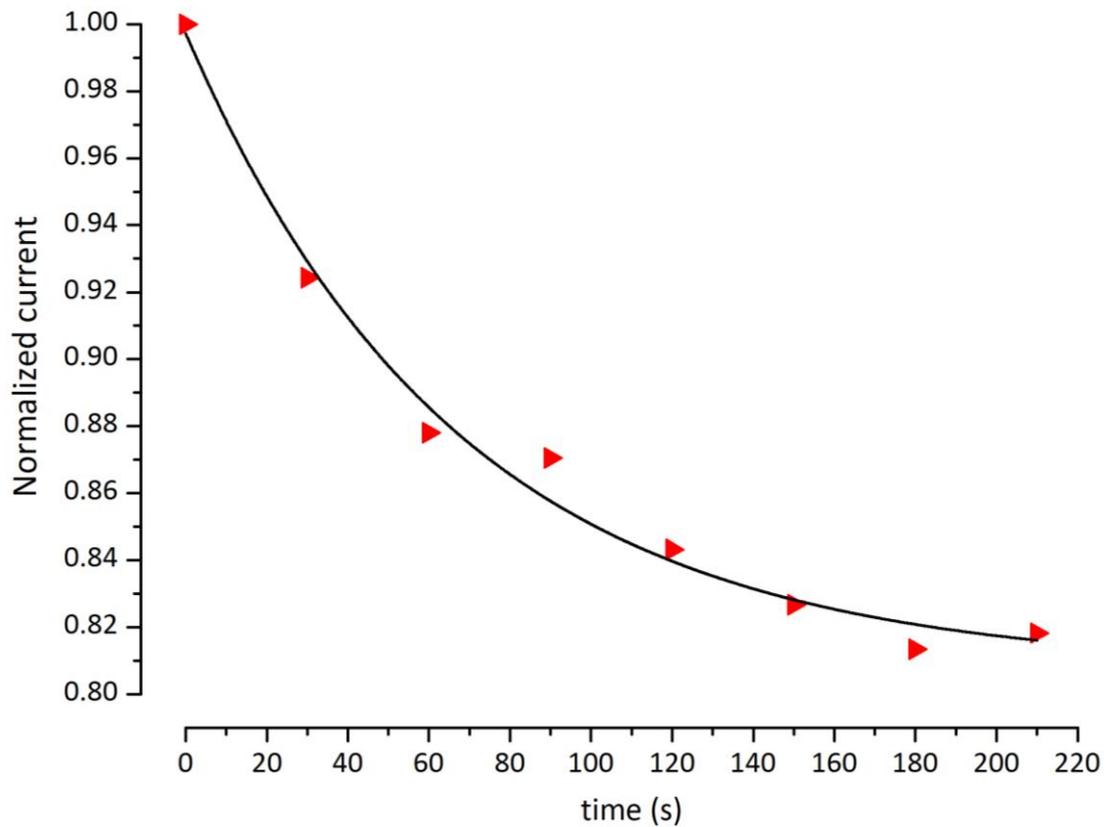


Figura 41: Andamento temporale della riduzione della corrente h in presenza di serotonina. I dati valori medi delle ampiezze della corrente sono stati normalizzati e riportati in grafico in funzione della tempo di applicazione della 5HT e sono stati interpolati con l'esponenziale $I(t) = 0.80 + 0.19 \cdot \exp(-t/67.51)$.

3.3.3 Effetto della Noradrenalina

La norepinefrina (NE), o noradrenalina, modula la I_h dei neuroni relè talamici (McCormick & Pape 1990), nei neuroni del nucleo mediale del corpo trapezoide (MNTB) (Banks et al. 1993), e nei neuroni sensoriali primari dei gangli delle radici dorsali (Yagi & Sumino 1998). Nel talamo, la noradrenalina (NA) attiva i recettori beta-adrenergici innalzando i livelli intracellulari di cAMP e spostando la voltaggio - dipendenza della I_h verso potenziali più depolarizzati (McCormick & Pape 1990). Allo stesso modo, nei neuroni di MNTB, la NE determina uno spostamento cAMP-dipendente della curva di attivazione della I_h (Banks et al. 1993). Diversamente, l'attivazione di recettori adrenergici alfa-2 nei neuroni del ganglio della radice dorsale (DRG) induce una significativa riduzione di ampiezza della I_h (Yagi & Sumino 1998).

Anzitutto si è verificato se la NA (100 μ M) poteva determinare qualche modificazione della corrente I_h dei neuroni DA della SNc.

Si sono effettuati degli esperimenti di *voltage clamp* nella configurazione *patch* perforato a 37°C e utilizzando un protocollo a singolo impulso da -40 mV a -130 mV. In seguito all'applicazione di noradrenalina, in 8 cellule su 10 si è registrato un aumento della ampiezza della I_h di circa l'11.8 % \pm 1% (figura 42), mentre nelle altre 2 non si è rilevata nessuna variazione della corrente.

Per valutare la significatività dell'aumento di ampiezza in seguito all'applicazione di noradrenalina, è stato eseguito un test T per dati appaiati a una sola coda. L'aumento in ampiezza registrato a -130 mV è risultato statisticamente significativo con un *p-value* < 0.025.

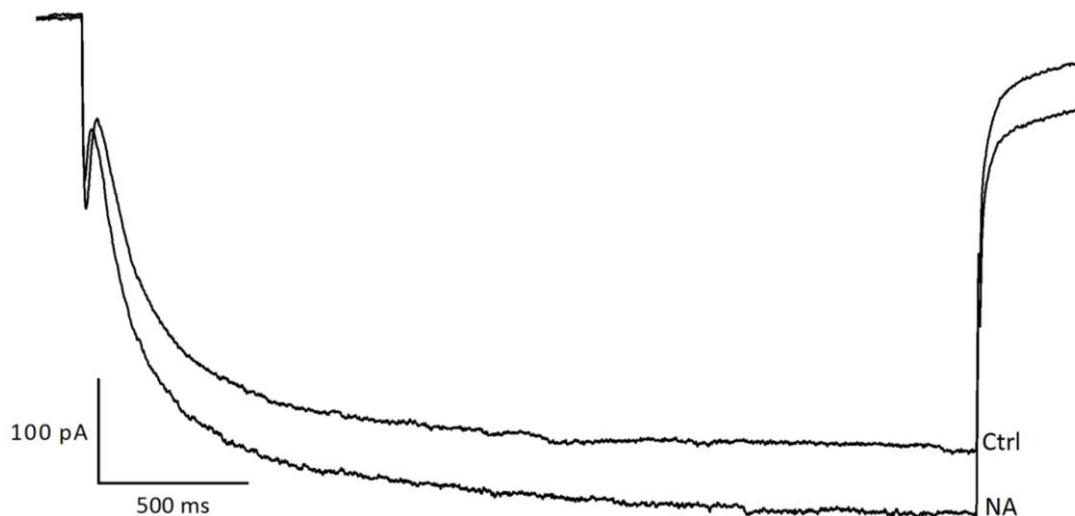


Figura 42: Esempio di effetto della NA sulla I_h : la noradrenalina determina un aumento di della corrente.

3.5 Ruolo della corrente I_h sull'autoritmicità dei neuroni dopaminergici della SNc

I neuroni dopaminergici della substantia nigra sono in genere spontaneamente attivi e tale attività spontanea è caratterizzata da una lunga durata del potenziale d'azione (> 2 ms), da una soglia di attivazione depolarizzata (-30, -40 mV), e da una spiccata iperpolarizzazione postuma (Lacey et al. 1989, Grace & Onn 1989).

Per valutare il ruolo della corrente I_h nell'attività spontanea di questo tipo neuronale, sono state effettuate delle registrazioni in *current clamp* senza iniezione di corrente al fine di mantenere le cellule al potenziale di riposo e registrare potenziali d'azione spontanei. In tali condizioni si è verificato l'effetto del blocco della I_h , applicando, con uno scambiatore rapido di soluzioni, ivabradina $10 \mu\text{M}$ per 10 min, tempo richiesto per il blocco (vedi paragrafo 3.3).

Il blocco della I_h induce una iperpolarizzazione di circa 10 mV (figura 43) con un arresto dell'attività spontanea.

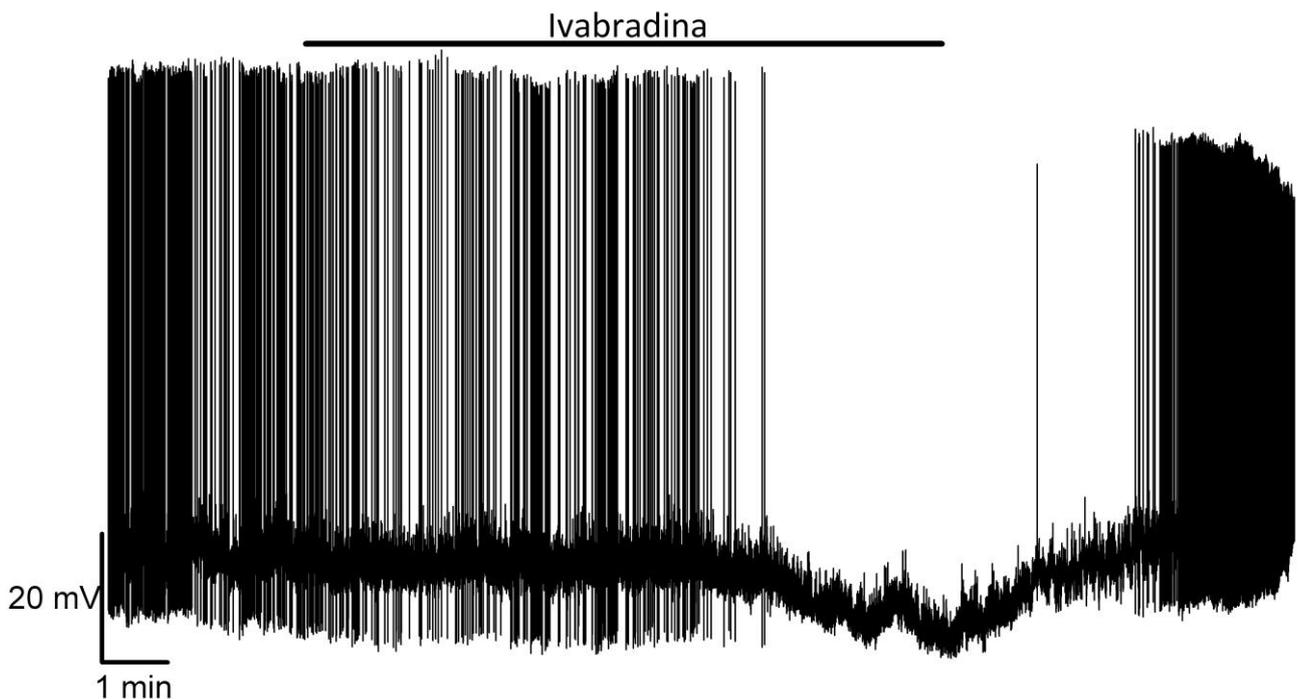


Figura 43: L'ivabradina induce un'iperpolarizzazione del potenziale di membrana di riposo di circa 10 mV, con recupero in lavaggio.

Si è quindi voluto verificare se il blocco della attività spontanea fosse un effetto secondario della iperpolarizzazione, o se fosse invece dovuto alla soppressione di una corrente fondamentale per il meccanismo pacemaker. In presenza di ivabradina, nel momento in cui questa aveva sviluppato completamente la sua azione iperpolarizzante, si è iniettata una corrente depolarizzante per

riportare il potenziale al valore di V_{rest} iniziale. In queste condizioni, abbiamo osservato che l'attività autoritmica spontanea della cellula riprendeva regolarmente (figura 44).

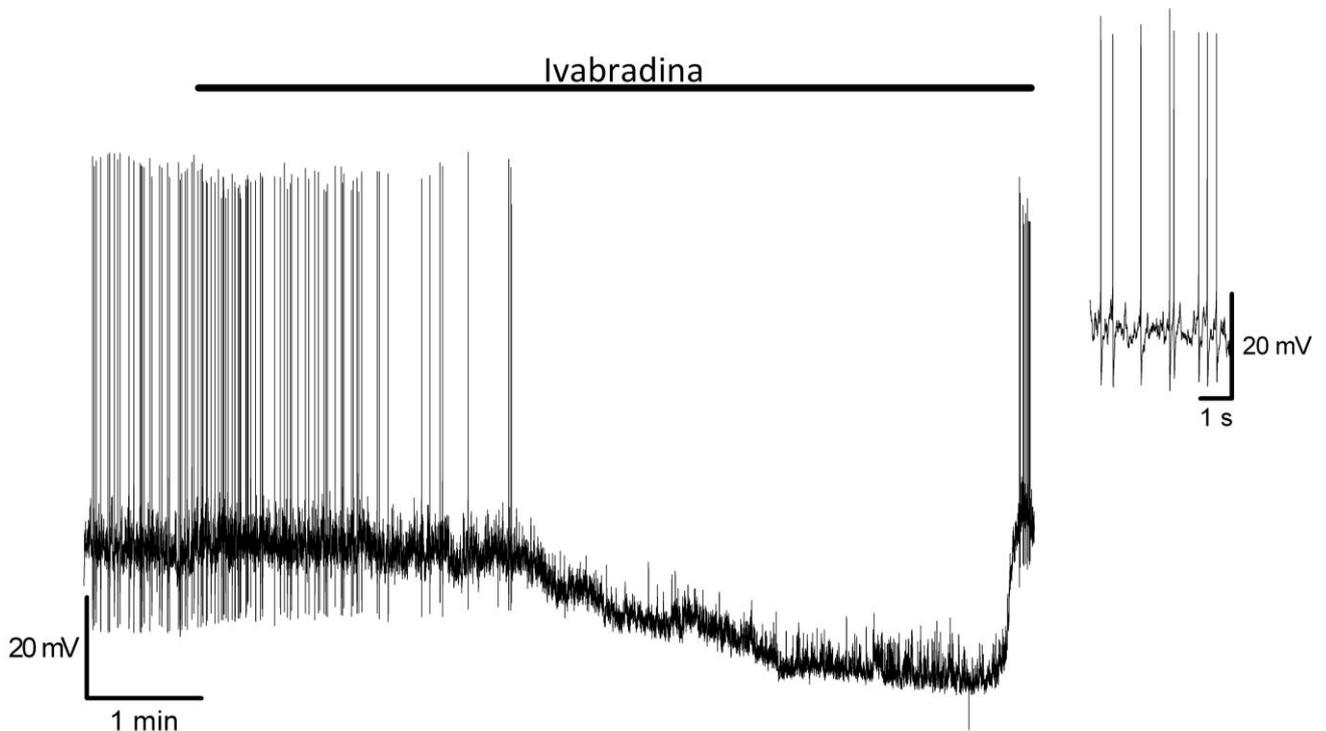


Figura 44: Registrazione in current clamp: l'ivabradina determina una iperpolarizzazione del V_{rest} , se il potenziale di membrana viene riportato al valore iniziale, mediante iniezione di corrente, si verifica una ripresa dell'attività spontanea.

Tali osservazioni sperimentali permettono di concludere che la corrente h stabilizza in uno stato depolarizzato il potenziale di membrana di riposo dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta ma non è essenziale per l'autoritmicità di questi neuroni.

4 DISCUSSIONE

Fin dalla scoperta della dopamina come neurotrasmettitore del SNC, il sistema dopaminergico è stato sovente oggetto di studio per l'importanza che esso ricopre nella fisiologia del cervello e per le patologie mentali e neurologiche associate ad alterazioni del sistema DA (Parkinson, schizofrenia ed abuso di droghe).

I neuroni dopaminergici pur costituendo meno dell'1% del numero totale di neuroni, giocano un ruolo importante nel regolare processi di base, dal controllo di funzioni vegetative a livello del sistema nervoso autonomo, a funzioni motorie e psichiche presso il SNC.

In particolare, i neuroni DA del mesencefalo sono la fonte principale di dopamina del sistema nervoso centrale.

In origine, l'identificazione e la localizzazione delle cellule dopaminergiche fu eseguita utilizzando l'immunofluorescenza (Falck et al. 1982), metodo basato sulla visualizzazione di monoamine fluorescenti all'interno di una cellula nervosa, seguito da trattamento con formaldeide. Questa tecnica è stata poi sostituita dalla immunisto chimica.

La prima caratterizzazione morfologica ed elettrofisiologica delle cellule DA della substantia nigra pars compacta è da far risalire a Grace (Grace & Bunney 1983, Grace & Onn 1989), il cui lavoro pionieristico rappresenta tuttora un punto di riferimento per l'identificazione di questi neuroni. I neuroni DA della substantia nigra erano riconosciuti, a partire dalla loro posizione anatomica, con una doppia marcatura, che consisteva in una colorazione intracellulare e in una localizzazione immunocitochimica della tirosina-idrossilasi. Essi mostravano alcune caratteristiche elettrofisiologiche peculiari: attività spontanea, contraddistinta da una lunga durata del potenziale d'azione (> 2 ms) e da una soglia depolarizzata di attivazione (-30, -45 mV), una spiccata *afterhyperpolarization* (Grace 1988), seguita da una depolarizzazione molto lenta che permette la genesi di potenziali di azione (Lacey et al. 1989, Grace & Onn 1989) e un'anomala corrente che si sviluppa a potenziali di membrana molto negativi, la *hyperpolarization-activated cation current*, osservata inizialmente in vivo (Grace & Bunney 1983) e poi in vitro (Grace & Onn 1989).

A causa del suo inusuale profilo biofisico, la corrente attivata da iperpolarizzazione è stata denominata corrente I_f (f sta per "funny", buffo) nel cuore (Brown & DiFrancesco 1980, Brown et al. 1979), mentre altri ricercatori hanno utilizzato il termine I_q (q sta per "queer", strano) e di I_h per la corrente neuronale.

Tale corrente ha suscitato un continuo interesse nei fisiologi e nei ricercatori.

L'eccezionale rilevanza delle I_h tra le correnti ioniche deriva principalmente dalla selettività ionica (si tratta di una corrente cationica mista supportata da ioni Na^+ e ioni K^+) e dagli specifici meccanismi di "gating".

Tuttavia, a differenza della stragrande maggioranza delle conduttanze cellulari voltaggio-dipendenti che sono attivate da depolarizzazione di membrana, la I_h è attivata da iperpolarizzazione a potenziali più negativi di -50 / -55 mV e prossimi al potenziale di riposo della cellula.

In aggiunta, l'attivazione della I_h è facilitata da AMP ciclico intracellulare mediante una azione diretta sui canali HCN e non mediata da fosforilazione (DiFrancesco & Tortora 1991).

Molti ruoli fisiologici sono stati attribuiti alla I_h . In primo luogo, le proprietà della I_h suggeriscono che la corrente svolga un ruolo importante nell'avvio e nella regolazione del battito cardiaco ("corrente *pacemaker*").

La I_h è anche coinvolta nel controllo dell'attività ritmica nei circuiti neuronali e contribuisce a diversi altri processi neuronali di base, inclusi la determinazione del potenziale di membrana di riposo, l'integrazione dendritica (Magee 1998), la trasmissione sinaptica (Fletcher & Chiappinelli 1992) e l'elaborazione di segnali visivi temporali nella retina.

Nel mesencefalo la I_h è stata proposta come un marcatore elettrofisiologico per distinguere i neuroni dopaminergici dai non dopaminergici (Grace & Onn 1989). Non è, però, ancora chiaro se essa intervenga nell'attività *pacemaker* e in che misura.

Mercuri (Mercuri et al. 1995) ha dimostrato che nei neuroni DA l'inibizione della I_h con Cs^+ non produce alcun effetto sull'attività spontanea; studi successivi hanno, invece, evidenziato che un inibitore selettivo, ZD7288, determina una riduzione della frequenza di scarica in un sottogruppo di neuroni dopaminergici della SNc (Neuhoff et al. 2002, Puopolo et al. 2007). Tali differenze potrebbero essere attribuite a condizioni sperimentali e tipi cellulari diversi.

L'obiettivo di questo studio è stato caratterizzare la corrente I_h nelle cellule dopaminergiche della substantia nigra e capire il ruolo da essa svolto nel meccanismo *pacemaker*, avvalendosi di condizioni sperimentali diverse da quelle presenti in letteratura:

- in primo luogo è stato utilizzato un topo transgenico, in cui è espressa la proteina reporter GFP (*green fluorescent protein*) sotto il promotore della tirosina idrossilasi, enzima a monte della via biosintetica della DA. Tale modello animale è risultato particolarmente adatto all'obiettivo dello studio, perché ha permesso una facile e sicura identificazione dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta senza ricorrere all'immunoistochimica

ed ad ulteriori marcature cellulari. L'identificazione del tipo cellulare è stata poi ulteriormente confermata dalla presenza di particolari caratteristiche elettrofisiologiche, quali l'attività spontanea e la corrente I_h .

- Le misure sono state fatte a temperatura fisiologica: è noto dalla letteratura che la I_h è particolarmente sensibile alla temperatura (Cuevas et al. 1997, Yanagida et al. 2000), per cui è sembrato opportuno stabilire se ci fossero modificazioni nelle proprietà della corrente registrata a 27 e a 37°C anche in queste cellule.
- È stata valutata l'entità della modulazione della I_h operata dai nucleotidi ciclici regolandone la concentrazione sia direttamente, con agonisti della adenilato ciclasi, che indirettamente, mediante l'applicazione di neurotrasmettitori in grado di modulare attraverso un sistema a secondo messaggero i livelli citosolici dei nucleotidi ciclici. Si è utilizzato l'approccio del "*perforated patch*", che permette di evitare gli inconvenienti della diluizione dei componenti citosolici solubili e, quindi, consente di effettuare registrazioni in condizioni di *voltage clamp*, senza che la biochimica della cellula fosse perturbata.
- Infine, alla luce dei risultati ottenuti, si è riconsiderato il coinvolgimento della corrente I_h nell'attività spontanea.

4.1 Cambiamento del profilo cinetico della corrente I_h in seguito a variazioni di temperatura.

La presenza dei canali HCN nella substantia nigra pars compacta è stata riportata da diversi autori (Franz et al. 2000, Monteggia et al. 2000, Notomi & Shigemoto 2004, Santoro et al. 2000, Moosmang et al. 1999). Ciò nonostante, esistono in letteratura solo pochi lavori che forniscono una descrizione della cinetica della corrente I_h nei neuroni DA di questa area cerebrale.

Cathala (Cathala & Paupardin-Tritsch 1997) e Washio (Washio et al. 1999) hanno effettuato delle registrazioni elettrofisiologiche della I_h su fettine di cervello di ratto da neuroni presumibilmente dopaminergici, identificati in base alle caratteristiche elettrofisiologiche (Lacey et al. 1989) e all'analisi immunoistochimica di espressione della TH.

L'unico Autore che ha analizzato l'effetto della temperatura sulla corrente I_h dei neuroni dopaminergici della SNc è Watts (Watts et al. 1996), che ha dimostrato come, in fettine di cervello di ratto, i cambiamenti di temperatura abbiano effetti pronunciati sulla I_h .

Ci siamo quindi proposti di colmare questa lacuna, fornendo una descrizione dettagliata della cinetica della corrente I_h registrata da neuroni GFP positivi presenti nella substantia nigra pars compacta e abbiamo analizzato l'influenza della temperatura sulla I_h .

4.1.1 Profilo di attivazione della I_h

I nostri dati indicano che il riscaldamento causa una modificazione del profilo di attivazione della corrente, determinando una più rapida attivazione e un aumento dell'ampiezza della corrente, in parziale accordo con i risultati di Watts.

I nostri risultati sperimentali dimostrano che un innalzamento di temperatura pari a 10°C provoca a -130 mV un netto aumento di ampiezza della corrente (da 194.18 ± 18.51 pA a 27°C, $n=19$, a 569.06 ± 48.90 pA a 37°C, $n=23$; figura 23) con un valore medio di Q_{10} da -80 a -140 mV pari a 3.73 ± 0.45 , e una significativa modificazione del profilo di attivazione della corrente, che a 27°C è ben descritta da un singolo esponenziale (figura 24), mentre a 37°C richiede una doppia funzione esponenziale (figura 25). L'assenza di un controllo della temperatura potrebbe dare spiegazione dei diversi profili di attivazione descritti in letteratura. Infatti se Cathala e Paupardin-Tritsch (Cathala & Paupardin-Tritsch 1997) hanno interpolato l'attivazione della corrente a temperatura ambiente con l'uso di due esponenziali, Washio, anch'egli con registrazioni a temperatura ambiente, ha affermato che la curva di attivazione della I_h è ben descritta da un singolo esponenziale sia in neuroni immaturi (P3) che maturi (P12) (Washio et al. 1999).

Watts che, invece, ha realizzato delle registrazioni nella configurazione *whole cell* sia a 35°C che a 30°C, ha interpolato il profilo di attivazione della corrente con un singolo esponenziale in entrambe le condizioni sperimentali (Watts et al. 1996). La discrepanza tra il profilo di attivazione da noi descritto e quello evidenziato da Watts potrebbe essere dovuta al fatto che Watts utilizza un protocollo di attivazione della I_h di soli 500-1000 ms, che è probabilmente troppo breve per permettere la completa attivazione dei canali e riuscire a mettere in evidenza il secondo esponenziale, molto più lento.

4.1.2 Influenza della temperatura sulle costanti di tempo di attivazione

L'incremento della temperatura a cui è registrata la corrente h si traduce anche in una riduzione della costanti di tempo di attivazione di quasi un ordine di grandezza a -130mV (675.75 ± 68.19 ms a 27°C , $n=21$, contro 86.61 ± 7.08 ms a 37°C, $n = 19$) (figura 28) con un Q_{10} medio delle τ ai potenziali da -70 a -130 mV di 10.83 ± 1.15 .

Le costanti di tempo di attivazione ottenute a temperatura fisiologica sono significativamente inferiori e maggiormente omogenee rispetto a quelle riportate da alcuni Autori che hanno effettuato registrazioni elettrofisiologiche in assenza di qualunque controllo della temperatura: Cathala, ad esempio, evidenzia a temperatura ambiente due costanti di tempo di attivazione, una τ_1 di 700 ± 400 ms e una τ_2 di 4830 ± 2000 ms a -110 mV (Cathala & Paupardin-Tritsch 1997) mentre Washio, che descrive il profilo di attivazione della I_h sempre a temperatura ambiente, trova che lo sviluppo della corrente avvenga secondo un singolo esponenziale, con costante di tempo pari 692.3 ms a -110 mV (Washio et al. 1999).

Watts, pur avendo utilizzato condizioni sperimentali simili alle nostre, sia a 35°C che a 30°C interpola il profilo di attivazione della corrente con un singolo esponenziale, la cui τ_{act} , innalzando la temperatura di 5°C, diminuisce di circa il 15% a -105mV (280 ms a - 105 mV a 35°C) (Watts et al. 1996). Questi valori non sono troppo dissimili da quelli che abbiamo calcolato per la costante di tempo veloce (τ_1) a 37°C (171.2 ± 11.6 ms). Quest'ultima osservazione avvalorata la nostra ipotesi secondo cui un protocollo di attivazione della I_h di soli 500-1000 ms, non consentendo una attivazione completa dei canali HCN dei neuroni DA della substantia nigra pars compacta, non permette una descrizione veritiera del profilo di attivazione di questa corrente. È probabile che il singolo esponenziale e la relativa costante di tempo messe in evidenza da Watts a 35°C corrispondano alla funzione esponenziale e alla τ_{act} veloce da noi mostrata a 37°C.

4.1.3 Effetto della temperatura sul V_{50}

Il riscaldamento incide sul potenziale di metà attivazione (V_{50}), ed infatti, il passaggio da 27°C a 37°C provoca uno spostamento della curva di attivazione in senso depolarizzante di circa +10 mV (figura 26).

I valori di V_{50} registrati sono -94.88 ± 1.07 mV a 27°C ($n=13$) e -84.17 ± 1.31 mV a 37°C ($n=18$).

Se non sorprende che questi valori siano dissimili da quelli riportati da Cathala (-86 ± 3 mV) e Washio (114 ± 5.6 mV) che hanno eseguito i loro esperimenti a temperatura non controllata, può invece colpire che si tratti di V_{50} molto più depolarizzati di quelli riportati da Watts.

Quest'ultimo, infatti, effettuando delle registrazioni elettrofisiologiche a due diverse temperature, ha trovato che a 35°C la curva di attivazione è spostata in senso depolarizzante di +10 mV rispetto a quella descritta a 30°C (il V_{50} a 30°C era di 115mV e a 35°C di -105 mV) ma il potenziale di metà attivazione da lui riportato a 35°C è più negativo di circa 10 mV rispetto a quello sperimentalmente stabilito da noi a 37°C, peraltro con un n molto più elevato di quello di Watts che è pari a 5.

Riteniamo che la differenza sia da attribuire alla dipendenza del V_{50} dalla lunghezza dell'impulso iperpolarizzante. Gli impulsi di breve durata non permettono di raggiungere la completa attivazione del canale e, quindi la probabilità di apertura derivata dall'ampiezza delle correnti di coda non riflette una situazione allo stato stazionario (Seifert et al. 1999).

Ne consegue che, con condizionamenti di durata insufficiente, il V_{50} viene ad essere collocato a valori più negativi di quanto non sia in realtà. Watts, infatti, effettua la sua analisi utilizzando un protocollo di attivazione di soli 500 ms – 1000 ms con il quale si sottostima il valore del V_{50} .

Per analizzare più a fondo questo aspetto, nel nostro lavoro abbiamo, anche, esaminato la dipendenza del potenziale di metà attivazione dalla durata dello step iperpolarizzante (1,2,4 e 8 s) nelle due condizioni termiche. Sia a 37°C che a 27°C, all'aumentare della durata dello stimolo iperpolarizzante si ottengono valori di V_{50} progressivamente meno negativi. A 37°C la curva di attivazione si sposta di + 9.37 mV passando da uno stimolo di 1 s a uno di 8 s, mentre a 27°C lo slittamento è di +11.6 mV (figura 27).

È da notare che i valori di V_{50} da noi registrati utilizzando un comando iperpolarizzante di un solo secondo (-108.23 ± 2.53 mV a 27°C e -87.52 ± 2.00 mV a 37°C, figura 27) sono molto vicini a quelli indicati da Watts, a conferma del fatto che il protocollo utilizzato da questo Autore determina una reale sottostima della probabilità di apertura dei canali HCN e restituisce un profilo cinetico della corrente h meno verosimile di quello che noi abbiamo dettagliatamente descritto.

4.1.4 Effetto della temperatura sul tempo di deattivazione

Dall'analisi del tempo di deattivazione è emerso che, anche, la τ di deattivazione a 37°C (0.456 ± 0.07 s, n=5) è almeno tre volte più piccola rispetto a quella misurata a 27°C (1.46 ± 0.1 s, n=4) determinando un Q_{10} di 3.2 (figura 29). Per questo dato non è stato possibile un confronto con dati di letteratura in quanto nessun autore, a nostra conoscenza, ha studiato l'andamento cinetico della deattivazione della corrente I_h nelle cellule dopaminergiche della substantia nigra pars compacta.

Dalla nostra analisi si può concludere che la I_h nei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta è stata finora sottostimata in ampiezza, velocità e probabilità di attivazione a potenziali e in condizioni di interesse fisiologico, e che le registrazioni elettrofisiologiche a 37°C certamente restituiscono un quadro più attendibile ed accurato della I_h .

4.2 Modulazione diretta del cAMP

I canali HCN sono direttamente modulati dal cAMP intracellulare (DiFrancesco & Tortora 1991). Per valutare l'entità di tale modulazione nei neuroni dopaminergici della SNc abbiamo condotto esperimenti in patch perforato incrementando i livelli di adenosina monofosfato ciclico con forskolina, attivatore dell'adenilato ciclasi, e 3-isobutil-1-metil-xantina, inibitore delle fosfodiesterasi.

Dopo 2 minuti di applicazione nel bagno di forskolina e IBMX, l'ampiezza della corrente aumenta significativamente (da -178.53 ± 23.48 pA in condizioni di controllo a -227.01 ± 34.17 pA in presenza di aumentati livelli di cAMP a -130 mV, n = 8) (figura 34), si verifica uno spostamento del potenziale di metà attivazione in senso depolarizzante di $+6.33 \pm 0.68$ mV (n = 8; figura 35) e una riduzione delle costanti di tempo di attivazione di circa il 19% a -100 mV (n = 8; figura 36).

Questi risultati sono in accordo con i dati riportati da Cathala e Paupardin-Tritsch (Cathala & Paupardin-Tritsch 1997), i quali hanno dimostrato che, in neuroni DA della SNc di ratto, la forskolina induce un aumento percentuale dell'ampiezza della corrente I_h del 25 ± 5 % a -95 mV, e che questo incremento è il risultato di uno spostamento in senso depolarizzante della curva di attivazione di $+5.33 \pm 0.4$ mV (da -91.6 ± 1 mV a -86 ± 2 mV; n = 3). L'aumento da noi registrato è di circa il doppio: 51.6% a -100 mV e mediamente del 56 % per comandi da -70 a -130 mV; la maggiore entità di questo incremento può essere attribuita sia alla presenza concomitante di forskolina e IBMX, sia all'aver effettuato le registrazioni elettrofisiologiche a 37°C anziché a temperatura ambiente.

Watts (Watts et al. 1996), invece, afferma che la forskolina applicata per 20 minuti, e più in generale, la concentrazione intracellulare di cAMP, non hanno effetti sull'ampiezza e sulla curva di attivazione della I_h nei neuroni DA della substantia nigra. Questa discrepanza potrebbe essere attribuita alle diverse condizioni sperimentali impiegate. Watts, infatti, ha effettuato gli esperimenti di *patch-clamp* nella configurazione *whole cell*, che non si presta allo studio di correnti modulate da sistemi a secondi messaggeri, in quanto la soluzione contenuta nella pipetta di registrazione dilava il citoplasma della cellula modificando la concentrazione intracellulare di ioni e macromolecole.

I nostri dati indicano che la concentrazione intracellulare dei nucleotidi ciclici modula in maniera rilevante la corrente h dei neuroni DA della SNc e che le condizioni sperimentali migliori per salvaguardare l'integrità funzionale dei canali HCN consistono nel ricorrere all'utilizzo del *perforated patch* (patch perforato) che non perturba l'ambiente intracellulare, e nell'effettuare le registrazioni elettrofisiologiche a 37°C.

4.3 Effetto di alcuni neurotrasmettitori sulla corrente h

I canali HCN sono modulati da molti neurotrasmettitori e molecole che regolano l'attività delle cellule DA (Okamoto et al. 2006, Liu et al. 2003, Cathala & Paupardin-Tritsch 1999, Cathala & Paupardin-Tritsch 1997). Poiché abbiamo dimostrato che la I_h risente in modo significativo di modificazioni della concentrazione intracellulare di cAMP, abbiamo ritenuto interessante valutare se vi fossero neurotrasmettitori che, mediante legame a recettori accoppiati a proteine G, potessero determinare modificazioni della corrente h .

4.3.1 Attivazione dei recettori D2

Tra i recettori dopaminergici, i D2 sono i più abbondantemente espressi nel mesencefalo, ed in particolare nella SNc e nella VTA (Meador-Woodruff et al. 1989, Mengod et al. 1989).

Aghajanian e B. S. Bunney hanno prodotto la prima evidenza della presenza di autorecettori DA sul soma e sui dendriti delle cellule DA (Aghajanian & Bunney 1977, Aghajanian & Bunney 1977). Studi condotti su fettine di cervello hanno dimostrato che l'attivazione di questi recettori causa una iperpolarizzazione del potenziale di membrana (Lacey et al. 1988, Lacey et al. 1987, Silva & Bunney 1988) e ciò è stato ulteriormente confermato dalla constatazione che gli effetti iperpolarizzanti dell'apomorfina sono bloccati anche dalla tossina della pertosse che inibisce selettivamente le proteine G_i e G_o (Innis & Aghajanian 1987).

Studi in vitro hanno suggerito che l'attivazione di autorecettori incrementa la conduttanza di membrana al potassio (Lacey et al. 1988, Lacey et al. 1987). Un lavoro recente ha fornito prove, invece, che la dopamina rilasciata endogenamente iperpolarizza i neuroni dopaminergici vicini mediante inibizione della I_h (Vandecasteele et al. 2008).

In generale è quindi possibile che i recettori D2 siano collegati a diversi sistemi effettori.

Abbiamo, a tal riguardo, indagato l'effetto dell'attivazione dei recettori D2 sulla corrente h effettuando registrazioni elettrofisiologiche a temperatura controllata (37 °C) ed in patch perforato. Dai risultati è emerso che il quinpirolo, il cui legame al recettore D2 determina una inibizione dell'adenilato ciclasi, causa una riduzione dell'ampiezza della I_h registrata a -130 mV di circa il 15 % (n=6; figura 38), risultato in accordo con l'ipotesi di Vandecasteele .

Alcuni Autori, invece, affermano che questa inibizione potrebbe essere solo apparente in quanto secondaria all'attivazione della corrente K_{ir} , poiché in presenza di Bario, bloccante dei canali K_{ir} , e nella configurazione di patch perforato il quinpirolo non ha effetti sulla corrente h (Cathala & Paupardin-Tritsch 1999). La difformità dei nostri risultati dai dati riportati da Cathala, nonostante l'utilizzo di condizioni sperimentali simili, si può attribuire al fatto che noi abbiamo effettuato le registrazioni elettrofisiologiche a 37°C ed è risaputo che la maggior parte delle reazioni biologiche subiscono un'accelerazione incrementando la temperatura.

Ad ulteriore conferma dei nostri risultati, abbiamo anche dimostrato che il sulpiride, antagonista D2, blocca l'effetto dell'agonista. In realtà dai nostri dati sperimentali emerge che il sulpiride non solo antagonizza l'effetto dell'agonista ma determina un aumento della corrente h (figura 39). Non essendo, però, il sulpiride un attivatore dell'adenilato ciclasi, l'effetto registrato correla con l'ipotesi che in quest'area cerebrale si verifichi un rilascio spontaneo di dopamina la cui azione sull'autorecettore determini una costante inibizione della ciclasi, e una minore propensione all'apertura dei canali HCN.

4.3.2 Effetto della 5HT

Abbiamo anche esaminato l'effetto sulla corrente h della 5-idrossitriptamina ponendoci sempre nelle stesse condizioni sperimentali (37°C e patch perforato). È noto che la serotonina inibisce i canali HCN nelle cellule dopaminergiche della VTA attraverso l'attivazione dei recettori 5-HT_{2A} (Liu et al. 2003). Nedergaard e collaboratori (Nedergaard et al. 1991) affermano, invece, che nei neuroni dopaminergici della substantia nigra di cavia, peraltro identificati indirettamente, in base

alle caratteristiche elettrofisiologiche (Grace & Onn 1989), la 5HT determina un aumento della corrente I_h .

Dai nostri dati sperimentali è emerso che l'applicazione di serotonina, nella maggior parte delle cellule testate, causa una riduzione di ampiezza della I_h di circa il 20 % a -130 mV (n=5; figura 41). Si potrebbe, quindi, ipotizzare che tale riduzione sia dovuta all'azione della serotonina su recettori accoppiati a una proteina G_i come alcune sottoclassi dei recettori 5HT1 e 5HT2. Ciò sarebbe in accordo con la presenza nella substantia nigra pars compacta dei sottotipi recettoriali 5HT1B (Sari et al. 1999) e 5HT2C (Pompeiano et al. 1994, Cornea-Hebert et al. 1999).

4.3.3 Modulazione noradrenergica della I_h

Abbiamo analizzato l'effetto della noradrenalina sulla corrente I_h ponendoci nelle medesime condizioni sperimentali utilizzate per testare tutti i neurotrasmettitori (37°C e patch perforato). Diversi studi hanno dimostrato che la noradrenalina modula la I_h poiché la sua interazione col recettore determina un'attivazione o un'inibizione dell'adenilato ciclasi (McCormick & Pape 1990, Wang et al. 1999, Yagi & Sumino 1998). Uno studio recente in cellule DA della SNc ha evidenziato la presenza funzionale di recettori adrenergici alfa-2 (Cathala et al. 2002). Tuttavia, l'attivazione di questi recettori non è associata con l'inibizione di I_h (Cathala & Paupardin-Tritsch 1999), perché secondo Cathala i recettori alfa-2 nelle cellule DA attivano un percorso a secondo messaggero che non coinvolge il cAMP.

Dai nostri dati sperimentali è emerso che l'applicazione di norepinefrina, nella maggior parte delle cellule testate (8 di 10), causa un aumento di ampiezza della I_h di circa il 12 % a -130 mV (n = 8, figura 42).

La discordanza dei nostri risultati da quelli riportati da Cathala che, applicando NA in patch perforato, non ha registrato modificazioni della corrente I_h , può essere attribuita alle diverse condizioni sperimentali. Noi infatti abbiamo effettuato registrazioni elettrofisiologiche a 37°C, temperatura che accelera la maggior parte delle reazioni fisiologiche.

Abbiamo ipotizzato che questo aumento sia dovuto all'azione della NA su recettori beta adrenergici accoppiati a una proteina G_s . A supporto della nostra teoria esistono evidenze in letteratura della diffusa presenza di recettori beta adrenergici nel mesencefalo (Asanuma et al. 1991) e in particolare nella substantia nigra (Goffinet & Caviness, Jr. 1986, Palacios & Kuhar 1980, Johnson et al. 1989).

4.4 Ruolo della corrente h nell' autoritmicità dei neuroni dopaminergici della SNc

I neuroni dopaminergici della substantia nigra sono in genere spontaneamente attivi ed esiste una differenza importante tra la fisiologia dei neuroni DA registrati in vivo e quella riportata in vitro: nel primo caso l'attività è in *burst*, (Grace & Bunney 1984, Grace & Bunney 1984), nel secondo l'attività spontanea ha una frequenza costante (Grace & Onn 1989).

Non è ancora chiaro se vi sia un coinvolgimento dei canali HCN nell' autoritmicità di questi neuroni. Al fine di capire il ruolo ricoperto dalla I_h nell' autoritmicità, abbiamo effettuato delle registrazioni in current clamp dell'attività spontanea sia in presenza di forskolina e IBMX, per valutare quali fossero gli effetti di un incremento del cAMP, sia applicando ivabradina, un bloccante dei canali HCN .

Forskolina e IBMX, di cui abbiamo dimostrato l'effetto sulla I_h , causano una depolarizzazione di circa 6 mV del potenziale di membrana di riposo che correla con una maggiore attivazione dei canali HCN, che in condizioni ioniche fisiologiche tendono a portare la membrana verso il proprio potenziale di equilibrio e quindi a depolarizzarla.

Diversi Autori hanno, inoltre, dimostrato che l'attivazione di recettori D2 causa una iperpolarizzazione del potenziale di membrana dei neuroni DA della SNc (Lacey et al. 1987, Lacey et al. 1988, Silva & Bunney 1988), bloccata dalla tossina della pertosse che inibisce selettivamente le proteine Gi e Go (Innis & Aghajanian 1987). Vandecasteele ha provato che la dopamina rilasciata endogenamente iperpolarizza i neuroni dopaminergici vicini mediante inibizione della I_h (Vandecasteele et al. 2008). I nostri dati indicano che agonisti D2 effettivamente riducono l'ampiezza della corrente h. Ciò avvalorava l'ipotesi che la I_h incida notevolmente sul mantenimento del potenziale di membrana di riposo.

Abbiamo, anche dimostrato, che il blocco della corrente h con ivabradina induce una iperpolarizzazione di circa 10 mV con arresto dell'attività spontanea (figura 43); se, però, in presenza di ivabradina, che iperpolarizza la cellula, si inietta una corrente depolarizzante, per riportare il potenziale al valore di V_{rest} iniziale, si ha ripresa dell'attività spontanea (figura 44).

Puopolo (Puopolo et al. 2007) ha testato l'effetto di ZD7288 sull'attività spontanea di neuroni DA della substantia nigra pars compacta dissociati e in 17 neuroni su 22 ha dimostrato che il bloccante della I_h determina una riduzione del firing del 52% e una iperpolarizzazione di 1.1 ± 0.2 mV, mentre nelle altre 5 cellule non ha registrato effetti sulla frequenza di scarica ma solo una piccola depolarizzazione del potenziale di riposo (1.2 ± 0.4 mV). I risultati di Puopolo sono in accordo con

studi in fettina di SNc (Seutin et al. 2001, Neuhoff et al. 2002, Mercuri et al. 1995). La maggiore iperpolarizzazione da noi registrata potrebbe essere, ancora una volta, attribuita alle diverse condizioni sperimentali adottate: infatti noi abbiamo studiato l'effetto della ivabradina sull'attività spontanea a 37°C, temperatura alla quale la corrente I_h è più ampia, ha una cinetica di attivazione più veloce e si attiva a potenziali più depolarizzati rispetto a quella registrata a temperatura ambiente, e utilizzando il patch perforato che non perturba la concentrazione intracellulare dei nucleotidi ciclici.

Tali osservazioni sperimentali permettono di concludere che la I_h apporta un significativo contributo all'attività *pacemaker* dei neuroni dopaminergici della SNc perché stabilizza il potenziale di membrana di riposo, ma non costituisce una corrente *pacemaker*. Quindi, ogni neurotrasmettitore che modula la corrente I_h , potrebbe avere un marcato effetto sul potenziale di membrana di riposo e, di conseguenza, sulla frequenza di scarica.

5 CONCLUSIONI

Negli ultimi decenni si è sentito sempre più spesso parlare di “terapia cellulare” per la cura di malattie neurodegenerative. Alla base del potenziale impiego terapeutico delle cellule staminali in queste patologie vi deve essere una minuziosa conoscenza delle proprietà “funzionali” dei neuroni che si intendono sostituire. L’obiettivo di questo lavoro è stato quello di aggiungere un tassello alla comprensione dei meccanismi fisiologici che presiedono al funzionamento delle cellule dopaminergiche della substantia nigra pars compacta.

Questo studio rappresenta un passo avanti nella conoscenza delle proprietà cinetiche e farmacologiche della I_h , corrente che contraddistingue i neuroni DA della SNC, di cui in letteratura non esiste una descrizione soddisfacente ed univoca. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un topo transgenico che esprime la GFP sotto il promotore della tirosina idrossilasi. L’impiego di questo modello animale non ha solo facilitato l’attività sperimentale ma ha soprattutto fornito una maggiore certezza nella identificazione dei neuroni dopaminergici.

Un dato interessante è costituito dal fatto che per la prima volta le registrazioni elettrofisiologiche sono state effettuate a 37 °C, condizione sperimentale particolarmente difficile ma che permette di ottenere informazioni fisiologiche importanti, dato che i canali HCN sono particolarmente sensibili alla temperatura. Alla temperatura fisiologica, infatti, la corrente I_h ha rivelato una ampiezza maggiore e una cinetica di attivazione più veloce rispetto ai dati ottenuti a temperatura ambiente e presenti in letteratura.

Da esperimenti condotti in *patch* perforato è emerso che l’ampiezza e la cinetica della corrente sono significativamente influenzate dalla concentrazione intracellulare di nucleotidi ciclici, sia quando i livelli di cAMP sono incrementati per attivazione diretta della ciclasi con Forskolina, sia soprattutto quando il legame di neurotrasmettitori al proprio recettore determini l’attivazione di una cascata a secondo messaggero. In particolare, agonisti di recettori D2 e la serotonina determinano una riduzione dell’ampiezza della corrente mentre la noradrenalina media un aumento della I_h .

La I_h svolge un ruolo importante nell’autoritmicità dei neuroni dopaminergici della SNC perché, pur non essendo una corrente *pacemaker*, stabilizza il potenziale di membrana di riposo.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Aghajanian GK, Bunney BS. 1977. Dopamine "autoreceptors": pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 297(1):1-7
2. Aghajanian GK, Bunney BS. 1977. Pharmacological characterization of dopamine "autoreceptors" by microiontophoretic single-cell recording studies. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 16:433-8
3. Allen TJ, Mikala G. 1998. Effects of temperature on human L-type cardiac Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 436(2):238-47
4. Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C et al. 2003. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 549(Pt 2):347-59
5. Asanuma M, Ogawa N, Mizukawa K, Haba K, Hirata H, Mori A. 1991. Distribution of the beta-2 adrenergic receptor messenger RNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry: effects of chronic reserpine treatment. *Neurochem. Res.* 16(12):1253-6
6. Bader CR, Bertrand D. 1984. Effect of changes in intra- and extracellular sodium on the inward (anomalous) rectification in salamander photoreceptors. *J. Physiol* 347:611-31
7. Banks MI, Pearce RA, Smith PH. 1993. Hyperpolarization-activated cation current (I_h) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *J. Neurophysiol.* 70(4):1420-32
8. Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. 2005. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol. Ther.* 107(1):59-79
9. Beaumont V, Zhong N, Froemke RC, Ball RW, Zucker RS. 2002. Temporal synaptic tagging by I_h activation and actin: involvement in long-term facilitation and cAMP-induced synaptic enhancement. *Neuron* 33(4):601-13
10. Beaumont V, Zucker RS. 2000. Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I_h channels. *Nat. Neurosci.* 3(2):133-41

11. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. 2009. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev.* 89(3):847-85
12. Bobker DH, Williams JT. 1989. Serotonin augments the cationic current I_h in central neurons. *Neuron* 2(6):1535-40
13. BoSmith RE, Briggs I, Sturgess NC. 1993. Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I_f) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br. J. Pharmacol.* 110(1):343-9
14. Brejc K, Sixma TK, Kitts PA, Kain SR, Tsien RY et al. 1997. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(6):2306-11
15. Broomand A, Mannikko R, Larsson HP, Elinder F. 2003. Molecular movement of the voltage sensor in a K channel. *J. Gen. Physiol* 122(6):741-8
16. Brown H, DiFrancesco D. 1980. Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J. Physiol. (Lond.)* 308:331-51.:331-51
17. Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. 1979. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 19;280(5719):235-6
18. Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. 2002. Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine. *J. Gen. Physiol* 120(1):1-13
19. Bucchi A, Tognati A, Milanesi R, Baruscotti M, DiFrancesco D. 2006. Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels. *J. Physiol* 572(Pt 2):335-46
20. Budde T, White JA, Kay AR. 1994. Hyperpolarization-activated Na(+)-K+ current (I_h) in neocortical neurons is blocked by external proteolysis and internal TEA. *J. Neurophysiol.* 72(6):2737-42
21. Cathala L, Guyon A, Eugene D, Paupardin-Tritsch D. 2002. Alpha2-adrenoceptor activation increases a cationic conductance and spontaneous GABAergic synaptic activity in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. *Neuroscience* 115(4):1059-65

22. Cathala L, Paupardin-Tritsch D. 1997. Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J Physiol* 503 (Pt 1):87-97
23. Cathala L, Paupardin-Tritsch D. 1999. Effect of catecholamines on the hyperpolarization-activated cationic I_h and the inwardly rectifying potassium I(Kir) currents in the rat substantia nigra pars compacta. *Eur. J Neurosci.* 11(2):398-406
24. Cervetto L, Demontis GC, Gargini C. 2007. Cellular mechanisms underlying the pharmacological induction of phosphenes. *Br. J. Pharmacol.* 150(4):383-90
25. Chen J, Mitcheson JS, Tristani-Firouzi M, Lin M, Sanguinetti MC. 2001. The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98(20):11277-82
26. Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. 2001. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 117(5):491-504
27. Cheng L, Kinard K, Rajamani R, Sanguinetti MC. 2007. Molecular mapping of the binding site for a blocker of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated pacemaker channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322(3):931-9
28. Chiodo LA, Freeman AS, Bunney BS. 1987. Electrophysiological studies on the specificity of the cholecystinin antagonist proglumide. *Brain Res.* 410(2):205-11
29. Clapham DE. 1998. Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron* 21(1):5-7
30. Cornea-Hebert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L. 1999. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J. Comp. Neurol.* 409(2):187-209
31. Craven KB, Olivier NB, Zagotta WN. 2008. C-terminal movement during gating in cyclic nucleotide-modulated channels. *J. Biol. Chem.* 283(21):14728-38
32. Cuevas J, Harper AA, Trequattrini C, Adams DJ. 1997. Passive and active membrane properties of isolated rat intracardiac neurons: regulation by H- and M-currents. *J. Neurophysiol.* 78(4):1890-902
33. Demontis GC, Gargini C, Paoli TG, Cervetto L. 2009. Selective Hcn1 channels inhibition by ivabradine in mouse rod photoreceptors. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 50(4):1948-55

34. Dickson CT, Magistretti J, Shalinsky MH, Fransen E, Hasselmo ME, Alonso A. 2000. Properties and role of I(h) in the pacing of subthreshold oscillations in entorhinal cortex layer II neurons. *J. Neurophysiol.* 83(5):2562-79
35. DiFrancesco D. 1981. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 314:359-76.:359-76
36. DiFrancesco D. 1981. A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 314:377-93:377-93
37. DiFrancesco D. 1982. Block and activation of the pace-maker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J. Physiol* 329:485-507
38. DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. 1986. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol. (Lond.)* 377:61-88
39. DiFrancesco D, Tortora P. 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351(6322):145-7
40. Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A. 1982. Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *Brain Res. Bull.* 9(1-6):xi-xv
41. Fletcher GH, Chiappinelli VA. 1992. An inward rectifier is present in presynaptic nerve terminals in the chick ciliary ganglion. *Brain Res.* 575(1):103-12
42. Flynn GE, Black KD, Islas LD, Sankaran B, Zagotta WN. 2007. Structure and rearrangements in the carboxy-terminal region of SpIH channels. *Structure.* 15(6):671-82
43. Frace AM, Maruoka F, Noma A. 1992. External K⁺ increases Na⁺ conductance of the hyperpolarization-activated current in rabbit cardiac pacemaker cells. *Pflugers Arch* 421(2-3):97-9
44. Franz O, Liss B, Neu A, Roeper J. 2000. Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (I_h) in central neurons. *Eur. J Neurosci* 12(8):2685-93
45. Garratt JC, Alreja M, Aghajanian GK. 1993. LSD has high efficacy relative to serotonin in enhancing the cationic current I_h: intracellular studies in rat facial motoneurons. *Synapse* 13(2):123-34

46. Gasparini S, DiFrancesco D. 1997. Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Arch.* 435(1):99-106
47. Gauss R, Seifert R, Kaupp UB. 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393(6685):583-7
48. Geffen LB, Jessell TM, Cuello AC, Iversen LL. 1976. Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature* 260(5548):258-60
49. Goffinet AM, Caviness VS, Jr. 1986. Autoradiographic localization of beta 1 and alpha 1-adrenoceptors in the midbrain and forebrain of normal and reeler mutant mice. *Brain Res.* 366(1-2):193-202
50. Grace AA. 1988. In vivo and in vitro intracellular recordings from rat midbrain dopamine neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 537:51-76
51. Grace AA, Bunney BS. 1983. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10(2):301-15
52. Grace AA, Bunney BS. 1983. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. *Neuroscience* 10(2):317-31
53. Grace AA, Bunney BS. 1984. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci.* 4(11):2877-90
54. Grace AA, Bunney BS. 1984. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci.* 4(11):2866-76
55. Grace AA, Bunney BS. 1985. Low doses of apomorphine elicit two opposing influences on dopamine cell electrophysiology. *Brain Res.* 333(2):285-98
56. Grace AA, Onn SP. 1989. Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci.* 9(10):3463-81
57. Gulbis JM, Mann S, MacKinnon R. 1999. Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. *Cell* 97(7):943-52

58. Hainsworth AH, Roper J, Kapoor R, Ashcroft FM. 1991. Identification and electrophysiology of isolated pars compacta neurons from guinea-pig substantia nigra. *Neuroscience* 43(1):81-93
59. Halliwell JV, Adams PR. 1982. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250(1):71-92
60. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 391:85-100
61. Harris NC, Webb C, Greenfield SA. 1989. A possible pacemaker mechanism in pars compacta neurons of the guinea-pig substantia nigra revealed by various ion channel blocking agents. *Neuroscience* 31(2):355-62
62. Ho WK, Brown HF, Noble D. 1994. High selectivity of the i(f) channel to Na⁺ and K⁺ in rabbit isolated sinoatrial node cells. *Pflugers Arch.* 426(1-2):68-74
63. Innis RB, Aghajanian GK. 1987. Pertussis toxin blocks autoreceptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Brain Res.* 411(1):139-43
64. Ishii TM, Takano M, Ohmori H. 2001. Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J. Physiol* 537(Pt 1):93-100
65. Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. 1999. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem.* 274(18):12835-9
66. Jiang ZG, Pessia M, North RA. 1993. Dopamine and baclofen inhibit the hyperpolarization-activated cation current in rat ventral tegmental neurones. *J. Physiol* 462:753-64
67. Johnson EW, Wolfe BB, Molinoff PB. 1989. Regulation of subtypes of beta-adrenergic receptors in rat brain following treatment with 6-hydroxydopamine. *J. Neurosci.* 9(7):2297-305
68. Kaupp UB, Seifert R. 2001. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* 63:235-57
69. Lacey MG, Mercuri NB, North RA. 1987. Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol* 392:397-416

70. Lacey MG, Mercuri NB, North RA. 1988. On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *J. Physiol* 401:437-53
71. Lacey MG, Mercuri NB, North RA. 1989. Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9(4):1233-41
72. Larkman PM, Kelly JS. 1992. Ionic mechanisms mediating 5-hydroxytryptamine- and noradrenaline-evoked depolarization of adult rat facial motoneurones. *J. Physiol* 456:473-90
73. Larkman PM, Kelly JS. 1997. Modulation of IH by 5-HT in neonatal rat motoneurones in vitro: mediation through a phosphorylation independent action of cAMP. *Neuropharmacology* 36(4-5):721-33
74. Larkman PM, Kelly JS, Takahashi T. 1995. Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate mediates a 5-hydroxytryptamine-induced response in neonatal rat motoneurones. *Pflugers Arch.* 430(5):763-9
75. Liu Z, Bunney EB, Appel SB, Brodie MS. 2003. Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (I_h) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT₂ receptors and protein kinase C. *J. Neurophysiol.* 90(5):3201-12
76. Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M. 1999. Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol. Biochem.* 9(4-5):179-86
77. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393(6685):587-91
78. Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. 1999. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* 18(9):2323-9
79. Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, DiFrancesco D. 1993. Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 69(6):2129-36
80. MacKinnon R. 2004. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 43(33):4265-77

81. Magee JC. 1998. Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 18(19):7613-24
82. Mannikko R. 2002. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages.
83. Matsushita N, Okada H, Yasoshima Y, Takahashi K, Kiuchi K, Kobayashi K. 2002. Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J Neurochem.* 82(2):295-304
84. Mayer ML, Westbrook GL. 1983. A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 340:19-45
85. McCormick DA, Pape HC. 1990. Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 431:319-42
86. Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ, Jr., Civelli O. 1989. Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 86(19):7625-8
87. Mengod G, Martinez-Mir MI, Vilaro MT, Palacios JM. 1989. Localization of the mRNA for the dopamine D2 receptor in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 86(21):8560-4
88. Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stefani A, Bernardi G. 1995. Properties of the hyperpolarization-activated cation current I_h in rat midbrain dopaminergic neurons. *Eur. J Neurosci.* 7(3):462-9
89. Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stratta F, Stefani A, Bernardi G. 1994. Effects of dihydropyridine calcium antagonists on rat midbrain dopaminergic neurones. *Br. J. Pharmacol.* 113(3):831-8
90. Mercuri NB, Calabresi P, Bernardi G. 1990. Effects of glycine on neurons in the rat substantia nigra zona compacta: in vitro electrophysiological study. *Synapse* 5(3):190-200
91. Mercuri NB, Calabresi P, Bernardi G. 1990. Responses of rat substantia nigra compacta neurones to L-DOPA. *Br. J. Pharmacol.* 100(2):257-60

92. Mercuri NB, Calabresi P, Bernardi G. 1992. The electrophysiological actions of dopamine and dopaminergic drugs on neurons of the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Life Sci.* 51(10):711-8
93. Mistrik P, Mader R, Michalakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M. 2005. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 280(29):27056-61
94. Monteggia LM, Eisch AJ, Tang MD, Kaczmarek LK, Nestler EJ. 2000. Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 81(1-2):129-39
95. Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. 1999. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol. Chem.* 380(7-8):975-80
96. Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L et al. 2003. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem.* 278(44):43781-6
97. Munsch T, Pape HC. 1999. Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH. *J. Physiol* 519 Pt 2:493-504
98. Nedergaard S, Flatman JA, Engberg I. 1991. Excitation of substantia nigra pars compacta neurones by 5-hydroxy-tryptamine in-vitro. *Neuroreport* 2(6):329-32
99. Nedergaard S, Flatman JA, Engberg I. 1993. Nifedipine- and omega-conotoxin-sensitive Ca²⁺ conductances in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones. *J Physiol.* 466:727-47
100. Neuhoff H, Neu A, Liss B, Roeper J. 2002. I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci.* 22(4):1290-302
101. Notomi T, Shigemoto R. 2004. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol.* 471(3):241-76
102. Okamoto T, Harnett MT, Morikawa H. 2006. Hyperpolarization-activated cation current (Ih) is an ethanol target in midbrain dopamine neurons of mice. *J. Neurophysiol.* 95(2):619-26

103. Palacios JM, Kuhar MJ. 1980. Beta-adrenergic-receptor localization by light microscopic autoradiography. *Science* 208(4450):1378-80
104. Pape HC. 1996. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58:299-327
105. Pape HC, McCormick DA. 1989. Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature* 340(6236):715-8
106. Pena F, Amuzescu B, Neaga E, Flonta ML. 2006. Thermodynamic properties of hyperpolarization-activated current (I_h) in a subgroup of primary sensory neurons. *Exp. Brain Res.* 173(2):282-90
107. Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. 1994. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 23(1-2):163-78
108. Preston RJ, McCrea RA, Chang HT, Kitai ST. 1981. Anatomy and physiology of substantia nigra and retrorubral neurons studied by extra- and intracellular recording and by horseradish peroxidase labeling. *Neuroscience* 6(3):331-44
109. Prole DL, Yellen G. 2006. Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. *J. Gen. Physiol* 128(3):273-82
110. Puopolo M, Raviola E, Bean BP. 2007. Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* 27(3):645-56
111. Pusch M, Ludewig U, Jentsch TJ. 1997. Temperature dependence of fast and slow gating relaxations of ClC-0 chloride channels. *J. Gen. Physiol* 109(1):105-16
112. Robinson RB, Siegelbaum SA. 2003. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu. Rev Physiol* 65:453-80
113. Rodriguez BM, Sigg D, Bezanilla F. 1998. Voltage gating of Shaker K⁺ channels. The effect of temperature on ionic and gating currents. *J. Gen. Physiol* 112(2):223-42
114. Ruta V, Jiang Y, Lee A, Chen J, MacKinnon R. 2003. Functional analysis of an archaebacterial voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 422(6928):180-5

115. Sakmann B, Edwards F, Konnerth A, Takahashi T. 1989. Patch Clamp Techniques Used for Studying Synaptic Transmission in Slices of Mammalian Brain. *Q. J. EXP. PHY.* 74:1107-18
116. Sakmann B, Neher E. 1984. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol* 46:455-72
117. Sanchez-Alonso JL, Halliwell JV, Colino A. 2008. ZD 7288 inhibits T-type calcium current in rat hippocampal pyramidal cells. *Neurosci. Lett.* 439(3):275-80
118. Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP et al. 2000. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci.* 20(14):5264-75
119. Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER et al. 1998. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93(5):717-29
120. Santoro B, Tibbs GR. 1999. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868:741-64
121. Sari Y, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Ruiz G, Doucet E et al. 1999. Cellular and subcellular localization of 5-hydroxytryptamine_{1B} receptors in the rat central nervous system: immunocytochemical, autoradiographic and lesion studies. *Neuroscience* 88(3):899-915
122. Sawamoto K, Nakao N, Kobayashi K, Matsushita N, Takahashi H et al. 2001. Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98(11):6423-8
123. Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. 1999. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96(16):9391-6
124. Seutin V, Massotte L, Renette MF, Dresse A. 2001. Evidence for a modulatory role of I_h on the firing of a subgroup of midbrain dopamine neurons. *Neuroreport* 12(2):255-8
125. Shin KS, Rothberg BS, Yellen G. 2001. Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J. Gen. Physiol* 117(2):91-101

126. Silva NL, Bunney BS. 1988. Intracellular studies of dopamine neurons in vitro: pacemakers modulated by dopamine. *Eur. J. Pharmacol.* 149(3):307-15
127. Silva NL, Pechura CM, Barker JL. 1990. Postnatal rat nigrostriatal dopaminergic neurons exhibit five types of potassium conductances. *J. Neurophysiol.* 64(1):262-72
128. Stieber J, Stockl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. 2005. Functional expression of the human HCN3 channel. *J. Biol. Chem.* 280(41):34635-43
129. Thollon C, Bedut S, Villeneuve N, Coge F, Piffard L et al. 2007. Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. *Br. J. Pharmacol.* 150(1):37-46
130. Tran N. 2002. A conserved domain in the NH2 terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels.
131. Ulens C, Tytgat J. 2001. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem.* 276(9):6069-72
132. Vandecasteele M, Glowinski J, Deniau JM, Venance L. 2008. Chemical transmission between dopaminergic neuron pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(12):4904-9
133. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430(7001):748-54
134. Wahl-Schott C, Biel M. 2009. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol. Life Sci.* 66(3):470-94
135. Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. 2001. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411(6839):805-10
136. Wang J, Chen S, Siegelbaum SA. 2001. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J. Gen. Physiol* 118(3):237-50
137. Wang P, Barks JD, Silverstein FS. 1999. Tat, a human immunodeficiency virus-1-derived protein, augments excitotoxic hippocampal injury in neonatal rats. *Neuroscience* 88(2):585-97

138. Washio H, Takigachi-Hayashi K, Konishi S. 1999. Early postnatal development of substantia nigra neurons in rat midbrain slices: hyperpolarization-activated inward current and dopamine-activated current. *Neurosci Res.* 34(2):91-101
139. Watts AE, Williams JT, Henderson G. 1996. Baclofen inhibition of the hyperpolarization-activated cation current, I_h, in rat substantia nigra zona compacta neurons may be secondary to potassium current activation. *J. Neurophysiol.* 76(4):2262-70
140. Williams SR, Christensen SR, Stuart GJ, Hausser M. 2002. Membrane potential bistability is controlled by the hyperpolarization-activated current I(H) in rat cerebellar Purkinje neurons in vitro. *J. Physiol* 539(Pt 2):469-83
141. Yagi J, Sumino R. 1998. Inhibition of a hyperpolarization-activated current by clonidine in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* 80(3):1094-104
142. Yanagida H, Inoue R, Tanaka M, Ito Y. 2000. Temperature-sensitive gating of cation current in guinea pig ileal muscle activated by hyperpolarization. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 278(1):C40-C48
143. Yanagihara K, Irisawa H. 1980. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 385(1):11-9
144. Yu FH, Catterall WA. 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4(3):207
145. Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B et al. 2001. MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ. Res.* 88(12):E84-E87
146. Yu X, Chen XW, Zhou P, Yao L, Liu T et al. 2007. Calcium influx through I_f channels in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 292(3):C1147-C1155
147. Yu X, Duan KL, Shang CF, Yu HG, Zhou Z. 2004. Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I_h channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101(4):1051-6
148. Yung WH, Hausser MA, Jack JJ. 1991. Electrophysiology of dopaminergic and non-dopaminergic neurones of the guinea-pig substantia nigra pars compacta in vitro. *J Physiol.* 436:643-67

149. Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425(6954):200-5
150. Zhou L, Siegelbaum SA. 2007. Gating of HCN channels by cyclic nucleotides: residue contacts that underlie ligand binding, selectivity, and efficacy. *Structure*. 15(6):655-70
151. Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M. 2001. A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J. Biol. Chem.* 276(9):6313-9

Sito web:

http://www.sulzerlab.org/Sulzer_VM_culture_protocol_book_version5.pdf



Your E-Mail Address

gmbest@unife.it

Subject

Dichiarazione di conformità

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Gambardella Cristina

nato a

San Giuseppe Vesuviano

Provincia

Napoli

il giorno

21/11/1982

avendo frequentato il corso di Dottorato di Ricerca in:

Scienze Biomediche, curriculum Neurobiologia e biofisica cellulare

Ciclo di Dottorato

XXIII

Titolo della tesi in Italiano

Caratterizzazione della corrente h in neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta

Titolo della tesi in Inglese

H-current characterization in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons

Titolo della tesi in altra Lingua Straniera

Tutore - Prof:

Belluzzi Ottorino

Settore Scientifico Disciplinare (SSD)

BIO/09

Parole chiave (max 10)

neuroni dopaminergici, substantia nigra, corrente h, patch clamp; dopaminergic neurons, substantia nigra, h-current, patch clamp

Consapevole - Dichiaro

CONSAPEVOLE --- 1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; -- 2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; -- 3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 4 copie di cui una in formato cartaceo e tre in formato .pdf, non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito : <http://www.unife.it/dottorati/dottorati.htm> alla voce ESAME FINALE - disposizioni e modulistica; -- 4) del fatto che l'Università sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali

14/03/2011

DICHIARAZIONE DI CONFORMITÀ ---

Centrali di Roma e Firenze. --- DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITA' --- 1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo, è del tutto identica a quelle presentate in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrò in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; -- 2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie; -- 3) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non compromette in alcun modo i diritti di terzi, ivi compresi quelli relativi alla sicurezza dei dati personali; che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà da me tenuta indenne da qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi; -- 4) che la tesi di dottorato non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata prodotta nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazioni di tipo brevettale o di tutela. --- PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Firma Dottorando

Ferrara, lì 14/03/2011 Firma del Dottorando

Cristina Gambardella

Firma Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore

