UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

L'inibizione selettiva dell'interazione tra JNK2-STX1A come bersaglio molecolare contro l'eccitotossicità in neuroni primari di topo

Relatore:
Prof. Riccardo Brambilla

Correlatore:
Prof. Marco Feligioni

Tesi Sperimentale di
Federica Pattaro

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

CAPITOLO 1 4
1. Introduzione 4
1.1.1 Sintesi del glutammato 4
1.1.2 Rilascio del glutammato a livello sinaptico 5
1.1.3 Ricaptazione e riciclaggio del glutammato (sinapsi tripartita) 8
1.2 Recettori del glutammato 10
1.2.1 Recettori metabotropici 11
1.2.2 Recettori ionotropici 12
1.2.2.1 Recettori AMPA 13
1.2.2.2 Recettori kainato 14
1.2.2.3 Recettori NMDA 14
1.3 Eccitotossicità NMDA-dipendente 17
1.3.1 Nuovi meccanismi molecolari nell'eccitotossicità NMDA-dipendente 18
1.3.1.1 Il ruolo degli astrociti nella genesi dell'eccitotossicità 18
1.3.1.2 Il contributo del compartimento presinaptico 19
1.4 Ruolo dell'eccitotossicità nelle patologie neurologiche 20
1.4.1 Morbo di Alzheimer 21
1.4.2 Morbo di Parkinson 21
1.4.3 Sclerosi laterale amiotrofica 22
1.4.4 Epilessia 23
1.4.5 Ictus 23
1.4.6 Sclerosi multipla 24
1.5 Farmacologia del recettore NMDA 25
1.5.1 Riluzolo 26
1.5.2 Ketamina 26
1.5.3 Destrometorfano 26
1.5.4 Amantadina 26
1.5.5 Memantina 27
1.6 Nuovi approcci farmacologici 28
1.6.1 AP5 ed MK-801 28
1.6.2 Glunomab 29

1.6.3 JGRi1 29
CAPITOLO 2 31
2. Scopo della tesi 31
CAPITOLO 3 32
3. Materiali e Metodi 32
3.1 Animali da laboratorio. 32
3.2 Allestimento e trattamento delle colture neuronali primarie. 32
3.3 Disegno e sintesi dei peptidi. 32
3.4 Saggio di vitalità cellulare. 33
3.5 Saggio di citotossicità. 33
3.6 Misurazione del rilascio di glutammato 33
3.7 Immunofluorescenza 34
3.8 Saggio terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL). 34
3.9 Saggio di permeabilità cellulare 34
3.10 Misurazione del calcio intracellulare 35
3.11 Monitoraggio del traffico vescicolare 35
3.12 Preparazione dei lisati cellulari 35
3.13 Western Blot 36
3.14 Saggio di assemblaggio del complesso SNARE 36
3.15 Proximity Ligation Assay (PLA) 37
3.16 Analisi di co-localizzazione di Pearson 37
3.17 Analisi statistica 37
3.18 Anticorpi primari 37
CAPITOLO 4 39
4. Risultati 39
4.1 Alte concentrazioni di NMDA innescano i meccanismi dell'eccitotossicità e il rilascio aberrante di glutammato in neuroni primari di topo 39
4.2 Il trattamento con alte dosi di NMDA promuove l'attivazione del pathway nPING nei neuroni primari di topo 43
4.3 La Memantina e JGRi1 proteggono i neuroni primari di topo dall'eccitotossicità NMDA-indotta 48
4.4 Mem e JGRi1 riducono l'interazione JNK2-STX1A indotta da NMDA nei neuroni primari di topo 51

4.5 Mem e JGRi1 riducono il tasso di formazione del complesso SNARE e il rilascio di glutammato innescati dalla stimolazione con NMDA nei neuroni primari di topo.....55
4.6 JGRi1, a differenza di Mem, preserva l'afflusso di calcio NMDA-dipendente nei neuroni primari ……..58
CAPITOLO 5 60
5. Conclusioni 60
BIBLIOGRAFIA.....62

CAPITOLO 1

1. Introduzione

1.1 Il glutammato

Il glutammato è uno dei principali neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale (SNC): all'interno del SNC, molteplici sottopopolazioni neuronali comunicano con le altre cellule rilasciando nello spazio sinaptico il glutammato, che è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso (SN), contrapposto all'acido γ-amminobutirrico (GABA), neurotrasmettitore che svolge prettamente funzione inibitoria. Per questo motivo, il glutammato è coinvolto in numerose funzioni neurologiche basilari, tra cui la percezione, la nocicezione, il controllo motorio e la regolazione dell'umore, nonché in funzioni cognitive più complesse, come apprendimento e memoria (Jv et al., 2021).

1.1.1 Sintesi del glutammato

Il glutammato non attraversa la barriera ematoencefalica; per questo motivo deve essere sintetizzato direttamente dal tessuto nervoso, all'interno dei neuroni. La sua produzione avviene principalmente attraverso due principali vie biosintetiche (Figura 1):

Sintesi a partire dall'α-chetoglutarato. Una minima quota di glutammato all'interno del SNC deriva dall'α-chetoglutarato, un intermedio del ciclo di Krebs, che può essere trasportato all'interno del neurone o generato nei mitocondri. L'α-chetoglutarato viene trasformato in glutammato tramite una reazione di transaminazione, catalizzata dall'aspartato aminotransferasi (Asp-AT) oppure mediante una reazione catalizzata dall'enzima glutammato deidrogenasi (GDH) (Andersen et al., 2021);

Sintesi a partire dalla glutammina. Questa seconda via di sintesi del glutammato, costituisce un efficiente sistema di riciclo del glutammato rilasciato a livello sinaptico e da essa deriva la maggior parte del glutammato presente all'interno del SNC. Inoltre, questa via biosintetica richiede una sinergia funzionale tra neuroni e cellule gliali che vanno a formare quella che viene chiamata sinapsi tripartita (vedi in seguito). Le cellule gliali, come ad esempio gli astrociti, ricaptano attivamente il glutammato e lo trasformano in glutammina, un amminoacido non essenziale, che viene a sua volta trasportato attivamente nei neuroni.

All’interno del neurone, la glutammina viene trasportata nei mitocondri, dove l’enzima glutaminasi la scinde in glutammato e ammoniaca (Andersen et al., 2021).

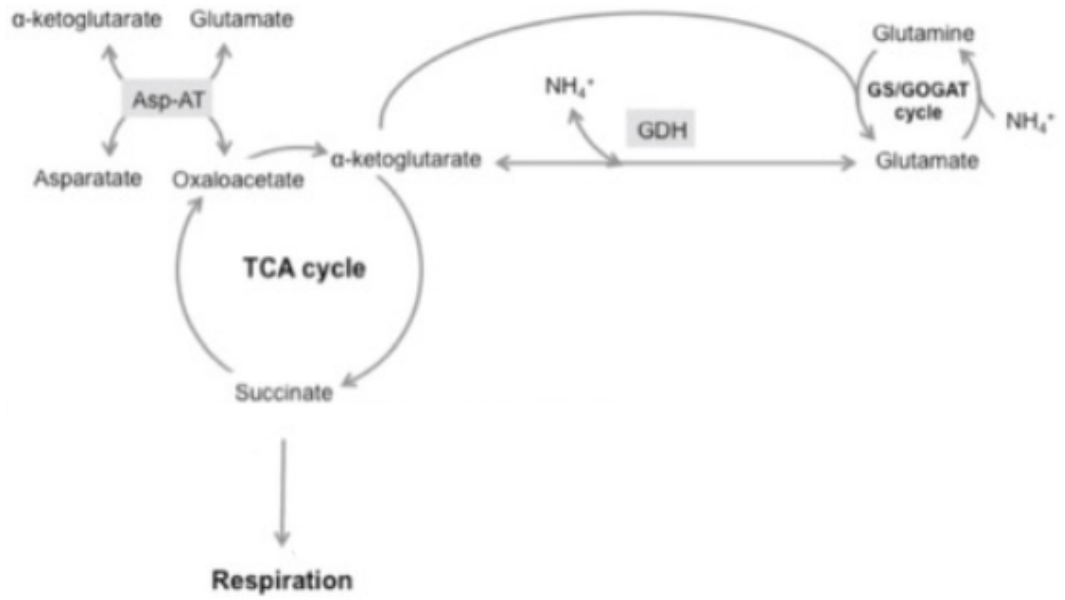


Figura 1. Metabolismo del glutammato nel sistema nervoso (modificata da Takayama e Ezura et, Frontiers, 2015)

Il glutammato prodotto viene poi impiegato per la neurotrasmissione. A tal scopo, esso viene immagazzinato all’interno vescicole presinaptiche grazie ai trasportatori vescicolari del glutammato (vGLUT; vGLUT1-3), proteine caratterizzate da bassa affinità per il glutammato, che si attivano solo quando quest’ultimo si accumula all’interno del terminale presinaptico. I trasportatori vGLUT sono degli antiporter accoppiano il trasporto contro gradiente del glutammato all’interno della vescicola con la fuoriuscita, secondo gradiente, di protoni: infatti, all’interno delle vescicole è presente un gradiente protonico generato da una serie di pompe protoniche ad attività ATPasica inserite all’interno della membrana vescicolare, che mantiene il lume vescicolare acido (ph~5,5) rispetto al citosol (ph~7,4) (Eriksen et al., 2020).

1.1.2 Rilascio del glutammato a livello sinaptico

Il glutammato viene rilasciato nella fessura sinaptica tramite un meccanismo di esocitosi calcio (Ca^{2+}) -dipendente. L’arrivo di un potenziale d’azione determina l’apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, permettendo l’ingresso rapido dello ione nel bottone

presinaptico. Il Ca^{2+} entrante viene immediatamente legato da proteine della famiglia delle sinaptotagmine (SYT1–10), che agiscono come veri sensori del Ca^{2+} attraverso una specifica porzione strutturale citoplasmatica costituita da due domini in tandem denominati C_2A e C_2B (Chapman, 2002).

Entrambi i domini condividono un ripiegamento a β-foglietto formato da 8 filamenti antiparalleli (Sutton et al., 1995) e svolgono ruoli complementari:

- C_2A (il dominio più vicino alla membrana vescicolare) presenta un sito di legame per il Ca^{2+} formato da anse ricche di residui di acido aspartico conservati. Il legame con il Ca^{2+} neutralizza le cariche negative dell'aspartato e consente a queste anse di inserirsi direttamente nella membrana presinaptica.
- C_2B (il dominio C-terminale) contribuisce al legame con il Ca^{2+} ed è fondamentale per l'interazione con i fosfolipidi di membrana (come il PIP_2), guidando inoltre l'oligomerizzazione della sinaptotagmina necessaria per la fusione vescicolare.

La sinaptotagmina, in particolare SYT1, mediante il dominio C_2B interagisce poi con le proteine del complesso Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor (SNARE), il quale media la fusione delle vescicole alla membrana del bottone presinaptico. In questo modo, le sinaptotagmine costituiscono l'anello di congiunzione tra l'ingresso del Ca^{2+} e il rilascio del neurotrasmettitore (Chapman, 2002).

Il complesso SNARE è costituito da tre proteine principali, che sono le proteine della famiglia Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa (SNAP25), sinaptobrevina-1 e sinaptobrevina-2 (VAMP1 e VAMP2) e, in ultimo, proteine della famiglia delle sintassine (STX1-19), principalmente STX1A. Le tre proteine SNARE possiedono un dominio N-terminale di ancoraggio alla membrana e un dominio C-terminale denominato H3 o dominio SNARE, indispensabile per l'assemblaggio del complesso multiproteico. La loro distribuzione subcellulare è altamente specifica: le sintassine e SNAP25 sono localizzate sul versante citosolico della membrana presinaptica, mentre VAMP1/2 è inserita nella membrana delle vescicole contenenti il neurotrasmettitore (Ungar and Hughson, 2003).

Durante la fusione vescicolare, le proteine SNARE unendosi formano un fascio di quattro eliche risultante in una struttura superavvolta detta "SNAREpin", che agendo come un verricello avvicina progressivamente la membrana vescicolare a quella presinaptica fino alla

formazione del poro di fusione e al conseguente rilascio del contenuto vescicolare nella fessura sinaptica (Figura 2) (Ramakrishnan et al., 2012; Ungar and Hughson, 2003).

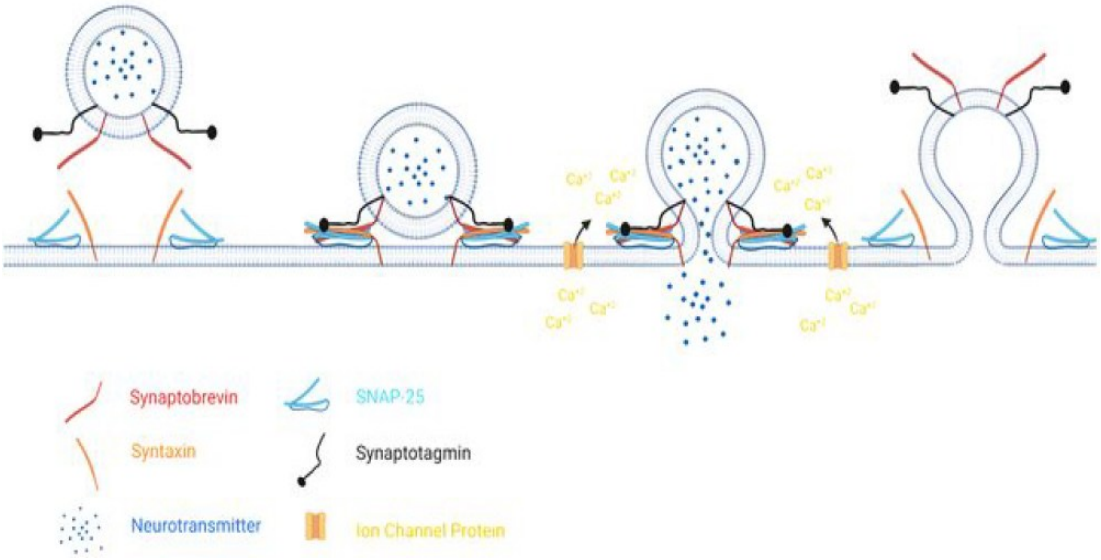


Figura 2. Rilascio del neurotrasmettitore mediato dal complesso SNARE (da Ozdemir et al., Mol Biol Rep, 2022)

In questo meccanismo, STX1A funge da vero e proprio interruttore molecolare caratterizzato da due distinte conformazioni funzionali: quando si trova nella conformazione chiusa, inattiva, il suo dominio N-terminale Habc si ripiega su sé stesso e nasconde la regione centrale costituita dal motivo H3. Tale ripiegamento impedisce il legame con altre proteine del complesso, SNAP25 e VAMP1/2, bloccando così il rilascio del neurotrasmettitore. Nella forma aperta, invece, che è attiva, il dominio Habc si sposta e lascia libera la regione H3, che diventa disponibile per l'assemblaggio del complesso trans-SNARE a quattro eliche, necessario per la fusione delle vescicole.

L'attività del complesso SNARE è finemente regolata da diverse proteine, tra cui Mammalian Uncoordinated 18-1 (Munc18-1), che interagisce con STX1A, esercitando una azione regolatoria. Il legame di Munc18-1 a STX1A avviene mediante due modalità distinte: la cosiddetta "mode 1" è caratterizzata da un'interazione ad alta affinità con la conformazione chiusa di STX1A. Questo legame impedisce stericamente l'assemblaggio con gli altri partner SNARE, traducendosi in un'inibizione del processo esocitico; al contrario, la configurazione "mode 2/3", identificata in tempi più recenti, comporta un'associazione dinamica e transitoria con l'estremità N-terminale della proteina, promuovendo attivamente

la fusione tra le membrane vescicolari e quella plasmatica (Khvotchev et al., 2007; Shi et al., 2011).

La transizione tra questi due stati funzionali è finemente modulata da modificazioni post-traduzionali: in particolare, la fosforilazione del residuo di serina 14 (Ser14) su STX1A sposta preferenzialmente l'equilibrio verso la modalità 2/3, amplificando così l'azione pro-esocitica esercitata da Munc18-1 (Khvotchev et al., 2007a). Inoltre, tale modifica sembra facilitare l'interazione di STX1A con altre proteine SNARE, specialmente SNAP25A (Risinger and Bennett, 1999).

1.1.3 Ricaptazione e riciclaggio del glutammato (sinapsi tripartita)

Una volta secreto nello spazio sinaptico, il glutammato interagisce con i propri recettori localizzati sulla membrana post-sinaptica, inducendo una variazione del potenziale di membrana che consente la trasmissione del segnale nervoso. Al termine della segnalazione, il neurotrasmettitore viene prontamente rimosso dalla fessura sinaptica ad opera degli astrociti. Queste cellule gliali svolgono un ruolo strutturale e funzionale fondamentale nella sinapsi glutammatergica, definita proprio per questo motivo "sinapsi tripartita" (Figura 3) (Di Maio, 2021).

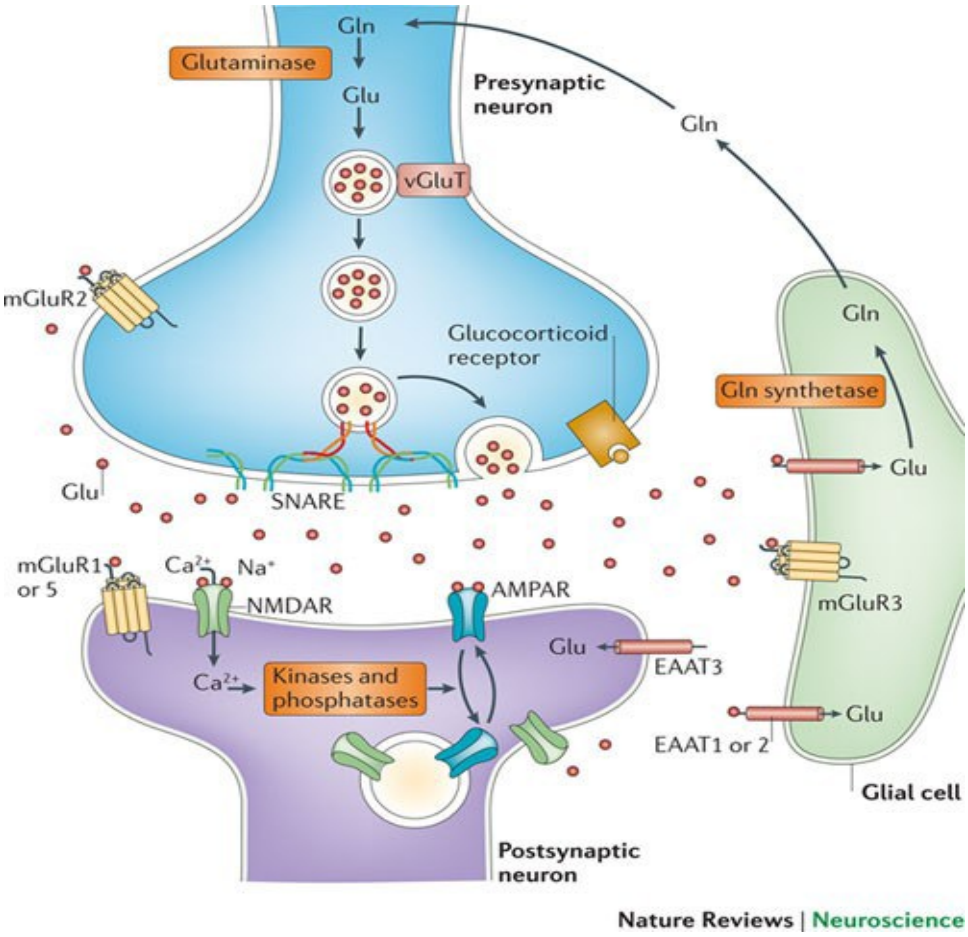


Figura 3. Struttura della sinapsi glutammatergica o "tripartita" (da Popoli et al., Nat Rev Neurosci, 2011)

Gli astrociti che partecipano alla sinapsi tripartita esprimono un ampio repertorio di trasportatori per il glutammato, in particolare le proteine della famiglia degli Excitatory Amino Acid Transporter (EAAT). Tale famiglia consta di 5 membri, da EAAT1 a EAAT5, caratterizzati da una diversa distribuzione cerebrale e da differenti affinità per il ligando. Sulla membrana astrocitaria si trovano i trasportatori ad alta affinità EAAT1 (conosciuto anche come Glutamate-Aspartate Transporter, GLAST) ed EAAT2 (noto come Glutamate Transporter 1, GLT-1), i quali garantiscono una rapida ed efficiente rimozione del glutammato in eccesso dalla fessura sinaptica. Tali trasportatori agiscono come un sistema antiporter che accoppia l'estrusione del potassio secondo gradiente (K^+) all'ingresso secondo gradiente di sodio (Na^+) e di glutammato, in quanto quest'ultimo è presente ad alte concentrazioni all'interno della fessura sinaptica al momento del suo rilascio (Perego et al., 2000), consentendone così la ricaptazione.

Una volta internalizzato negli astrociti, il glutammato viene convertito in glutammina dall'enzima glutammina sintetasi. La glutammina prodotta viene quindi rilasciata nello spazio extracellulare tramite trasportatori quali ASCT2 Alanine-Serine-Cysteine Transporter 2 (ASCT2) e membri della famiglia dei System N Transporters (SNAT), in particolare SNAT3. Successivamente, la glutammina viene ricaptata dal terminale presinaptico attraverso i trasportatori di membrana SNAT1 e SNAT2. Una volta all'interno del neurone, l'enzima mitocondriale glutamminasi idrolizza la glutammina rigenerando il glutammato, che viene così reintegrato nel pool di neurotrasmettitore pronto per essere impacchettato nelle vescicole sinaptiche (Andersen, 2025).

1.2 Recettori del glutammato

I recettori del glutammato sono suddivisi in due classi: recettori metabotropici e recettori ionotropici (Figura 4).

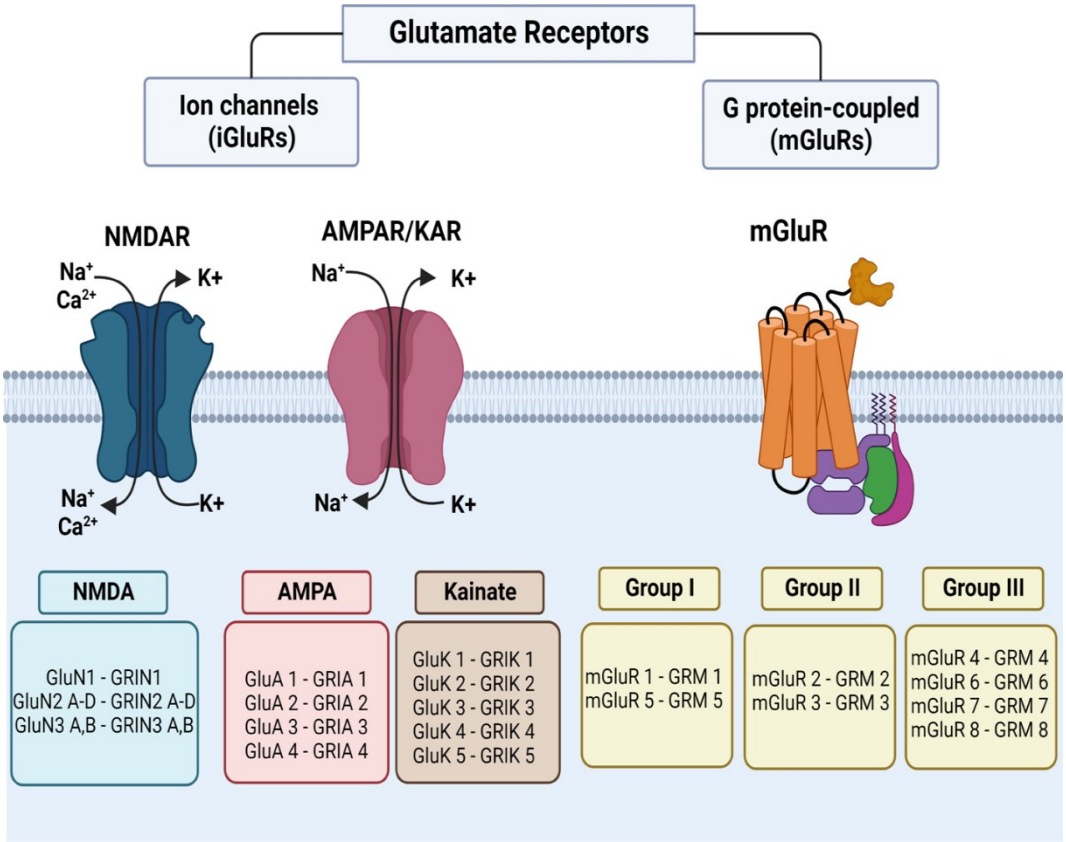


Figura 4. Famiglie di recettori del glutammato (modificato da Garcia-Gaytan et al., Front. Endocrinol, 2022).

1.2.1 Recettori metabotropici

I recettori metabotropici del glutammato (mGlu) appartengono alla classe dei recettori accoppiati a proteina G (G Protein-coupled Receptors - GPCR). A differenza dei recettori ionotropici (si veda il paragrafo successivo), inducono risposte più lente poiché non sono dotati un poro-canale, bensì attivano una o più cascate di secondi messaggeri sostenuti da reazioni enzimatiche intracellulari. Dal punto di vista evolutivo, si ritiene che siano comparsi più tardivamente rispetto ai recettori ionotropici (Niswender and Conn, 2010).

La famiglia dei recettori metabotropici del glutammato (mGlu) comprende otto distinti sottotipi, definiti da mGlu1 a mGlu8, suddivisi in tre gruppi principali in base all'omologia di sequenza, alle proprietà farmacologiche e ai pathway di trasduzione del segnale associati. Tali gruppi includono il Gruppo I, rappresentato dai recettori mGlu1 e mGlu5, il Gruppo II, rappresentato dai recettori mGlu2 e mGlu3, e, infine, il Gruppo III, rappresentato dai recettori mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8.

Pur essendo diffusamente espressi nel sistema nervoso centrale (SNC), i recettori mGlu presentano una compartimentalizzazione subcellulare peculiare: i recettori del Gruppo I mostrano una localizzazione prevalentemente post-sinaptica, dove modulano positivamente la trasmissione glutammatergica e orchestrano i processi di plasticità sinaptica (Crupi et al., 2019a); i recettori dei gruppi II e III sono collocati principalmente a livello presinaptico, dove esercitano un'azione inibitoria sul rilascio del neurotrasmettitore agendo come autorecettori. Tuttavia, essi possono operare anche come eterorecettori: ad esempio, i recettori mGlu2 espressi sui neuroni GABAergici sopprimono la secrezione di GABA, mentre i mGlu3 sono ampiamente rappresentati sul compartimento astrocitario. Tra i membri del gruppo III fa eccezione il sottotipo mGlu6, la cui espressione è pressoché limitata alle cellule bipolari della retina (Crupi et al., 2019; Palazzo et al., 2020).

Oltre al distretto nervoso centrale, i recettori mGlu sono stati identificati in diversi tessuti periferici tra cui miocardio, timo, pancreas, fegato e papille gustative della lingua, nei quali mediano risposte fisiologiche specifiche, come la percezione del gusto (Julio-Pieper et al., 2011).

Dal punto di vista strutturale, i recettori mGlu formano dimeri omo- o eteromerici, spesso consolidati da ponti disolfuro intercatena. Ciascuna subunita mGlu è poi costituita da una porzione N-terminale extracellulare, sette domini transmembrana (7TM) ed una coda C-terminale intracellulare. L'estremità N-terminale include il caratteristico dominio globulare bilobato noto come ″Venus Flytrap" (VFT): in assenza del ligando, tale dominio permane in una conformazione "aperta", mentre il legame del glutammato all'interfaccia tra i due lobi ne promuove la chiusura. La porzione transmembrana è invece deputata all'accoppiamento con le diverse proteine G eterotrimeriche deputate alla trasduzione intracellulare del segnale. L'interazione con il glutammato attiva molteplici cascate di segnalazione intracellulari, conferendo ai recettori mGlu non solo un ruolo esclusivamente eccitatorio, come i recettori ionotropici (si veda il paragrafo seguente), ma anche un ruolo modulatorio cruciale per il controllo dell'eccitabilità neuronale (Niswender and Conn, 2010; Crupi et al., 2019).

1.2.2 Recettori ionotropici

I recettori ionotropici del glutammato (iGlu) sono complessi macromolecolari tetramerici costituiti dall'assemblaggio di quattro subunità proteiche. A differenza dei recettori metabotropici, essi presentano un poro-canale intrinseco: ciò consente il passaggio diretto di cationi e la generazione di risposte elettriche estremamente rapide, traducendosi in variazioni immediate della depolarizzazione della membrana post-sinaptica.

Delle varie possibili classificazioni dei recettori ionotropici del glutammato, la più accreditata si basa sulla selettività per specifici agonisti farmacologici. Si distinguono pertanto tre sottofamiglie principali di recettori ionotropici del glutammato i recettori AMPA, attivati dall'acido l'α-ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionico (AMPA), i recettori kainato, attivati dall'acido kainico (KA), ed i recettori NMDA: attivati dall'N-metil-D-aspartato (NMDA) (Yelshanskaya and Sobolevsky, 2022).

Generalmente, i canali ionici del glutammato sono dei tetrameri costituiti da subunità identiche o tra loro diverse. Le subunità che compongono gli iGlu sono glicoproteine transmembrana. Ciascuna subunità presenta un dominio di legame per il ligando (LBD, Ligand-Binding Domain) che forma una struttura bilobata, essenziale per il legame del neurotrasmettitore. È formato da due segmenti distinti, la regione S1, situata prima del primo dominio transmembrana, e la regione S2, localizzata nell’ansa extracellulare tra il terzo e il quarto segmento transmembrana. Seguono poi tre segmenti idrofobici che attraversano

interamente il doppio strato lipidico della membrana cellulare (M1, M3, M4). Il segmento M2 non attraversa completamente la membrana, ma forma un'ansa a "forcina" che si affaccia dal lato citoplasmatico e contribuisce a delimitare il poro di conduzione ionica. L'estremità C-terminale sita nel citoplasma partecipa alla regolazione del canale tramite siti di fosforilazione e interazioni con altre proteine. L'interazione del glutammato o dell'agonista specifico con l'LBD induce una variazione conformazionale che promuove l'apertura del poro-canale e il conseguente flusso ionico transmembrana. Questo rapido movimento di carica modifica il potenziale di membrana, generando i potenziali post-sinaptici eccitatori (EPSP) responsabili della trasmissione sinaptica veloce (Krieger et al., 2015; Yelshanskaya and Sobolevsky, 2022).

1.2.2.1 Recettori AMPA

I recettori AMPA sono degli omo/eterotetrameri le cui subunità formati da diverse combinazioni delle quattro subunità disponibili (GluA1-4). Tra queste, la GluA2 è la più abbondante nel SNC e svolge un ruolo cruciale nel determinare la permeabilità ionica del recettore: la sua presenza rende infatti il canale impermeabile ai cationi bivalenti come il Ca^{2+}. I recettori AMPA sono generalmente associati a proteine ausiliarie note come Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Proteins (TARPs), che agiscono come subunità regolatorie essenziali, regolandone il funzionamento (Kamalova and Nakagawa, 2021).

Dal punto di vista funzionale, i recettori AMPA sono caratterizzati da una cinetica di attivazione e inattivazione molto rapida, e rappresentano quindi i principali mediatori della trasmissione eccitatoria veloce nel sistema nervoso centrale. Essi sono permeabili ai cationi monovalenti come Na^+ e K^+, sono localizzati nella membrana del neurone postsinaptico e sono coinvolti nella risposta eccitatoria depolarizzante rapida tipica delle sinapsi glutammatergiche. I recettori AMPA sono ampiamente distribuiti in tutto il cervello, in particolare, nell'ippocampo contribuiscono ai processi di apprendimento e memoria; nei gangli della base partecipano al controllo motorio; nel bulbo olfattivo intervengono nella

percezione degli odori; e nell'amigdala sono implicati nella processazione delle emozioni (Francis et al., 2025).

1.2.2.2 Recettori kainato

I recettori kainato sono costituiti da cinque diverse subunità (GluK1-5) capaci di combinarsi a formare recettori omomerici o eteromerici, permeabili principalmente ai cationi monovalenti Na^+ e K^+. Come gli AMPA, anche i recettori kainato contribuiscono alla neurotrasmissione eccitatoria rapida (Gangwar et al., 2025).

Sono espressi sia a livello pre- che post-sinaptico in numerose regioni cerebrali, tra cui lo striato, i nuclei reticolari del talamo, l'ipotalamo, gli strati profondi della corteccia cerebrale, lo strato delle cellule granulari del cervelletto, il giro dentato e lo strato lucido dell'ippocampo. In particolare, la loro presenza nell'ippocampo è ritenuta rilevante nei processi di apprendimento e memoria. Inoltre, si ritiene che, a livello presinaptico, i recettori kainato svolgano un'importante azione modulatoria: l'attivazione dei recettori contenenti la subunità GluK2 sembra infatti ridurre in modo significativo il rilascio di glutammato e sopprimere le correnti eccitatorie postsinaptiche. Infine, poiché questi recettori appaiono coinvolti in fasi critiche dello sviluppo del sistema nervoso, si ritiene che svolgano un ruolo chiave nella formazione e nella maturazione dei circuiti neuronali (Lerma, 2003).

1.2.2.3 Recettori NMDA

I recettori per l'N-metil-D-aspartato (NMDA) sono eterotetrameri formati da combinazioni delle tre diverse subunità (GluN1-3), ognuna delle quali dotata di diverse isoforme generate tramite splicing alternativo dell'mRNA. Generalmente, un recettore NMDA funzionale è costituito da due subunità GluN1 e due subunità GluN2, con GluN2A e GluN2B che rappresentano le isoforme più abbondanti (Zhou and Tajima, 2023). Esistono inoltre le subunità GluN2C e GluN2D, caratterizzate da una distribuzione più selettiva: le GluN2C sono espresse a livello corticale, dove contribuiscono alla regolazione dell'equilibrio eccitatorio-inibitorio, mentre le GluN2D si trovano principalmente nei gangli della base, nel nucleo subtalamico, nel globo pallido, nello striato e nella substantia nigra (Suryavanshi et al., 2014).

Una caratteristica strutturale comune a tutte le subunità NMDA è la presenza di un residuo di asparagina nel segmento transmembrana M2, situato nel poro del canale: questo amminoacido è essenziale per conferire al recettore la notevole permeabilità al Ca^{2+}, che

distingue i recettori NMDA dagli altri recettori ionotropici del glutammato. Inoltre, a differenza dei recettori AMPA e kainato, il solo legame del glutammato non è sufficiente per l'attivazione dei recettori NMDA, che richiedono una serie di condizioni concomitanti: essi infatti richiedono innanzitutto il legame simultaneo del glutammato alla subunità GluN2 e della glicina o della D-serina alla subunità GluN1, agendo così da co-agonisti del recettore; in secondo luogo, è necessaria una depolarizzazione preliminare della membrana neuronale, che consente la rimozione di uno ione magnesio (Mg^{2+}) che interagisce con il residuo di asparagina situato nel segmento transmembrana M2, andando ad ostruire il poro del canale del recettore. Tali necessità fanno sì che l'attivazione dei recettori NMDA presenti una cinetica più lenta rispetto ai recettori AMPA e kainato, la cui rapida attivazione favorisce la seguente attivazione di questi recettori (Zhou and Tajima, 2023).

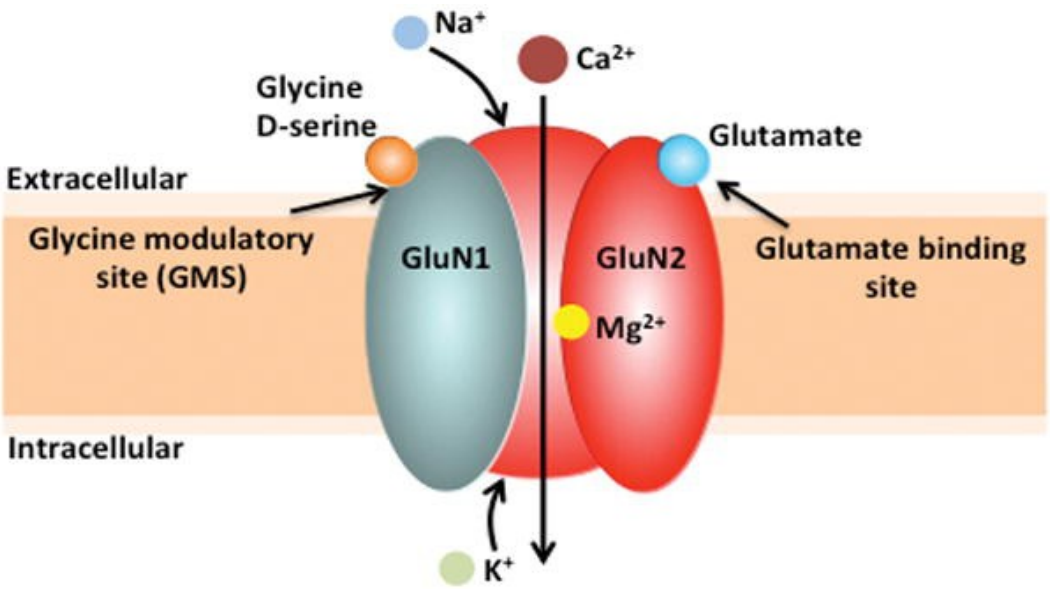


Figura 5. Struttura del recettore NMDA (da Balu, Adv Pharmacol, 2017).

Nelle sinapsi glutammatergiche, i recettori NMDA sono espressi sia sul bottone presinaptico che sulla membrana postsinaptica. Tali sottopopolazioni sottendono a precise e distinte funzioni: i recettori postsinaptici sono preposti alla trasduzione del segnale e alla plasticità dipendente dall'attività, mentre quelli presinaptici operano come autorecettori, finemente preposti al controllo del quantitativo di glutammato rilasciato all'interno della fessura sinaptica (Madara and Levine, 2008).

La caratteristica più rilevante dei recettori NMDA è la loro elevata permeabilità al Ca^{2+}. Il Ca^{2+}, una volta entrato nel neurone, agisce come secondo messaggero regolando numerosi enzimi e processi intracellulari. Tra gli enzimi che rispondono al Ca^{2+} intracellulare, un ruolo di primo piano è svolto dal complesso Ca^{2+}/Calmodulina-proteina chinasi dipendente da calmodulina II (CaMKII). Il Ca^{2+} entrante attiva la calmodulina, la quale attiva a sua volta CaMKII. Una volta attiva, CaMKII rimane funzionante anche quando i livelli intracellulari di Ca^{2+} diminuiscono; essa inoltre si associa ai recettori NMDA postsinaptici, promuovendone la fosforilazione e attivando complesse vie di trasduzione intracellulari che favoriscono modificazioni a carico della sinapsi, in primis l'inserimento di nuovi recettori AMPA nella stessa e l'ingrandimento delle spine dendritiche. Tali fenomeni di rimodellamento strutturale e funzionale della sinapsi prendono il nome di long term potentiation (LTP), il quale sottende ai processi funzionali di apprendimento e memoria (Lisman et al., 2012).

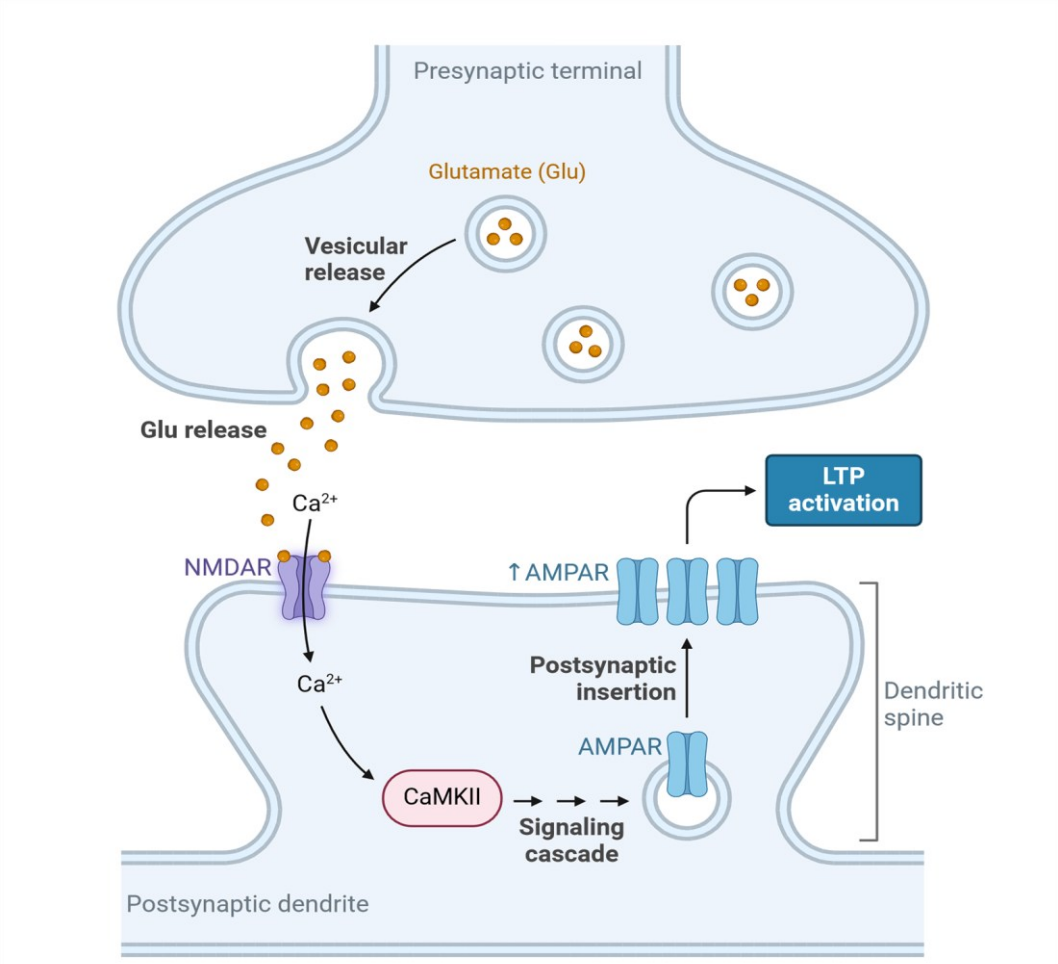


Figura 6. Rappresentazione del meccanismo di induzione dell'LTP nel neurone postsinaptico (modificato da BioRender).

1.3 Eccitotossicità NMDA-dipendente

Il controllo della concentrazione extracellulare di glutammato rappresenta un requisito fisiologico critico per il tessuto nervoso. Ciò è chiaramente evidenziato dalla presenza di recettori NMDA presinaptici deputati alla modulazione del rilascio del neurotrasmettitore, unita all'azione di sistemi di ricaptazione del glutammato nelle cellule gliali, le quali esprimono trasportatori ad alta affinità come GLAST e GLT-1 (Perego et al., 2000).

Un incremento prolungato o eccessivo di glutammato determina infatti un'iperattivazione dei recettori NMDA postsinaptici, innescando un imponente afflusso intraneuronale di Ca^{2+}. Sebbene quest'ultimo sia un secondo messaggero fondamentale, il suo accumulo citosolico incontrollato attiva? una serie di enzimi Ca^{2+}-dipendenti la cui attività innesca la cascata di morte cellulare. Tra questi enzimi troviamo le m-calpaine, delle proteasi che degradano proteine strutturali, le lipossigenasi, che convertono l'acido arachidonico in intermedi pro-infiammatori e sono responsabili dell'ossidazione dei lipidi di membrana, le DNAsi, responsabili della frammentazione genomica, e le fosfolipasi che destrutturano i fosfolipidi di membrana, compromettendo irreversibilmente l'integrità cellulare. Contestualmente, il sovraccarico mitocondriale di Ca^{2+} promuove l'apertura dei pori di transizione di permeabilità, causando la dissipazione del potenziale di membrana, l'aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'estrusione nel citosol di fattori pro-apoptotici come il citocromo c. Quest'ultimo, interagendo con la proteina Apoptotic Protease Activating Factor-1 (APAF-1), assembla l'apoptosoma, la cui formazione attiva la cascata delle caspasi e orchestra la morte cellulare programmata. L'insieme di questi eventi degenerativi, avviati dall'ingresso patologico di Ca^{2+} attraverso il recettore NMDA nel comparto postsinaptico, definisce il fenomeno dell'eccitotossicità NMDA-dipendente (Dong et al., 2009).

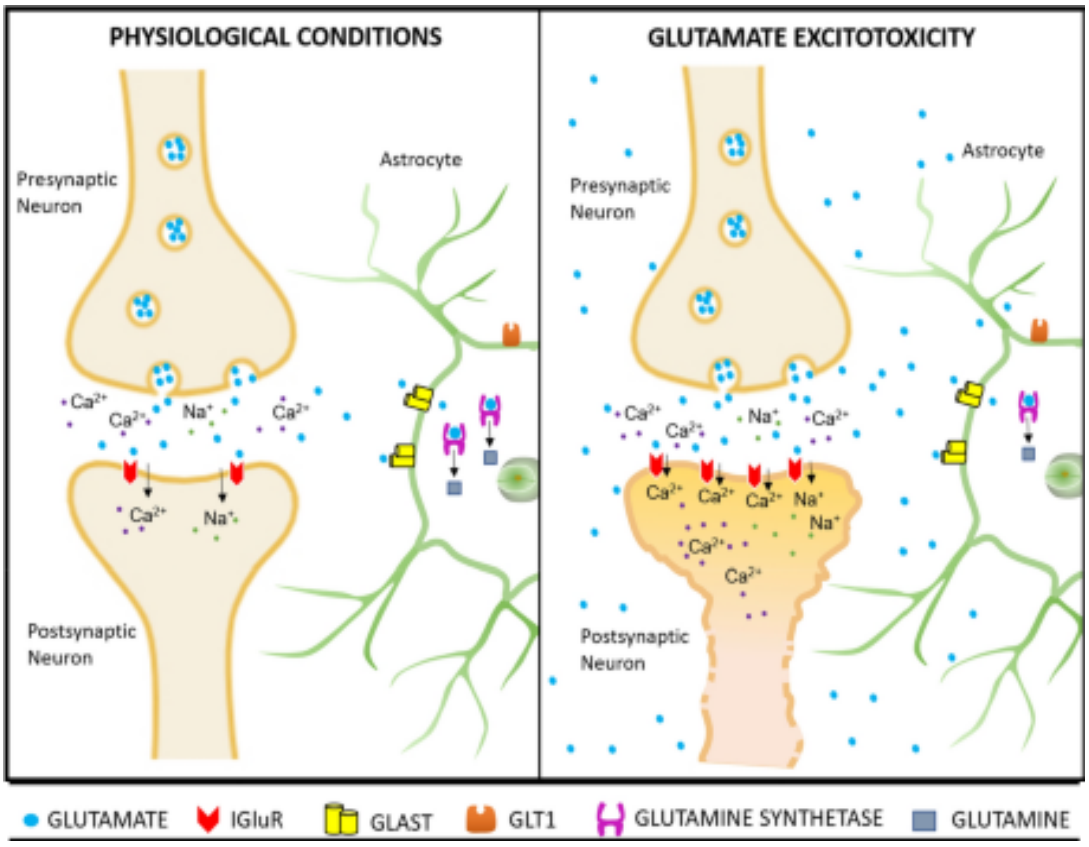


Figura 7. Meccanismo dell'eccitotossicità NMDA-dipendente (modificato da Ferreira et al., Mol Biol Rep, 2021)

1.3.1 Nuovi meccanismi molecolari nell'eccitotossicità NMDA-dipendente

1.3.1.1 Il ruolo degli astrociti nella genesi dell'eccitotossicità

Sebbene l'eccitotossicità sia stata storicamente interpretata come un fenomeno prevalentemente postsinaptico, evidenze scientifiche recenti hanno messo in luce il ruolo attivo e determinante sia degli astrociti che del terminale presinaptico. In diverse patologie neurodegenerative caratterizzate da danno eccitotossico, si osserva infatti una compromissione della ricaptazione astrocitaria del glutammato, dovuta principalmente alla riduzione dell'espressione dei trasportatori gliali EAAT1 ed EAAT2 (Das et al., 2025; Rosenblum and Trotti, 2017; Wood et al., 2022). Inoltre, è stato riscontrato che gli astrociti rilasciano anch'essi glutammato, seppur in minima quantità, con diversi meccanismi: tra questi troviamo l'esocitosi vescicolare Ca^{2+}-dipendente, il rilascio attraverso canali come i membri della famiglia Volume-regulated Anion Channels (VRAC), i quali trasportano

anioni e metaboliti organici come il glutammato al fine di garantire il mantenimento delle dimensioni cellulari, l'antiporter cisteina-glutammato, che estrude glutammato importando cisteina all'interno dell'astrocita, il rovesciamento della normale funzione dei trasportatori EEAT1 e EEAT2 qualora i gradienti chimici siano alterati, la secrezione attiva attraverso pompe ad attività ATPasica e, in ultimo, il rilascio attraverso connessioni non appaiati (Takano et al., 2005; Malarkey and Parpura, 2008). Non è pertanto da escludere che in condizioni di patologiche tali meccanismi possano contribuire all'accumulo di glutammato nello spazio sinaptico, favorendo in questo modo il processo di eccitotossicità.

1.3.1.2 Il contributo del comparto presinaptico

Recenti evidenze hanno dimostrato come l'accumulo di glutammato nello spazio extracellulare abbia un effetto pro-eccitotossico anche a livello presinaptico, potenziando ulteriormente il rilascio del neurotrasmettitore stesso. A questo riguardo, Kennedy e collaboratori hanno dimostrato che la stimolazione dei recettori NMDA presinaptici recluta la proteina scaffold JNK Interacting Protein 1 (JIP1) la quale funge da piattaforma strutturale intracellulare per l'attivazione delle proteine della famiglia delle c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Kennedy et al., 2007). La famiglia delle JNK include tre isoforme ad elevata omologia di sequenza (JNK1, JNK2 e JNK3), comunemente coinvolte nella risposta adattativa a molteplici insulti cellulari, quali stress ossidativo, osmotico, metabolico e da radiazioni (Barr and Bogoyevitch, 2001), oltre che nella segnalazione innescata dall'iperattivazione dei recettori NMDA in presenza di dosi tossiche di glutammato (Centeno et al., 2007).

Più nel dettaglio, il gruppo guidato dal Prof. Feligioni (2015) ha chiarito che l'attivazione dei recettori NMDA presinaptici induce la fosforilazione e la conseguente attivazione specifica dell'isoforma JNK2. Una volta attivata, JNK2 interagisce direttamente con la proteina STX1A, promuovendone la fosforilazione sul residuo di Serina 14 (Ser14) (Nisticò et al., 2015; Marcelli et al., 2019; Cimino and Feligioni, 2024). Tale modificazione post-traduzionale determina molteplici conseguenze funzionali: da un lato modula l'interazione tra STX1A e Munc18-1, favorendo la configurazione di legame definita *mode 2/3* pro-esocitotica (Khvotchev et al., 2007; Shi et al., 2011); dall'altro stabilizza l'interazione con la proteina SNAP-25, guidando la formazione del complesso SNAREpin e promuovendo la riorganizzazione del complesso SNARE, favorendo così la fusione vescicolare (Risinger and Bennett, 1999) (Fig 8).

L'insieme di tali eventi culmina nell'innesco di un circuito auto-alimentante: l'eccesso di glutammato promuove un'ulteriore e aberrante esocitosi di neurotrasmettitore dal versante presinaptico, amplificando il danno sul neurone postsinaptico fino al raggiungimento dell'esito apoptotico. Tale meccanismo è stato definito non-canonical presynaptic-induced glutamate spillover (nPING) (Marcelli et al., 2019; Cimino and Feligioni, 2024).

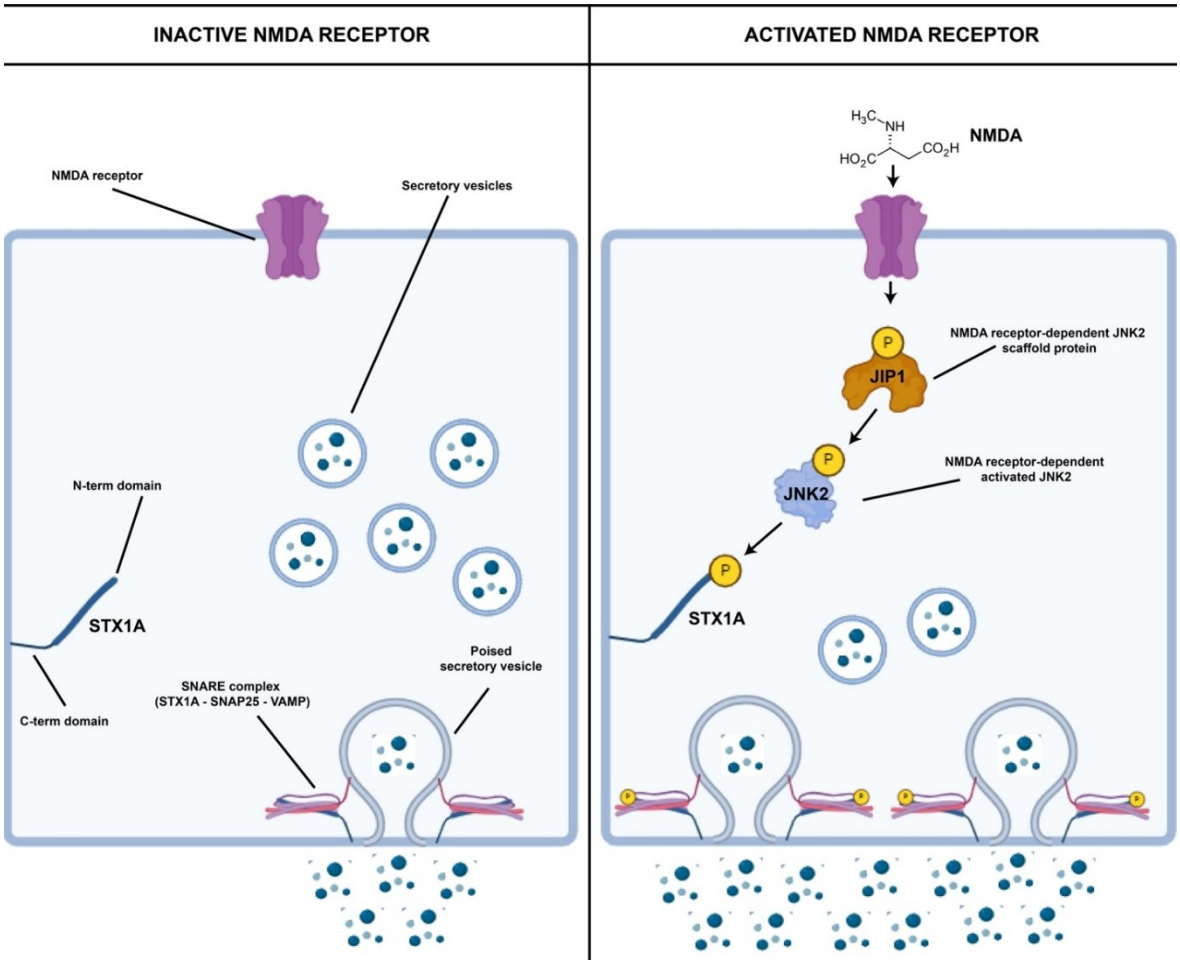


Figura 8. Rappresentazione grafica del meccanismo nPING (modificato da Cimino e Feligioni., Neurochemist Int, 2024).

1.4 Ruolo dell'eccitotossicità nelle patologie neurologiche

L'eccitotossicità NMDA-dipendente rappresenta un importante fattore patogenetico nello sviluppo e nella progressione di numerose malattie neurologiche, poiché il danno ai circuiti neuronali tipico di queste malattie compromette anche la normale regolazione dei livelli di glutammato.

1.4.1 Morbo di Alzheimer

Il morbo di Alzheimer è una malattia neurodegenerativa progressiva e rappresenta la principale causa di demenza nei Paesi sviluppati. La patologia è caratterizzata dall'accumulo di aggregati proteici anomali nelle regioni ippocampali e corticali; In particolare, la deposizione extracellulare del peptide β-amiloide (Aβ) e la formazione di grovigli neurofibrillari intracellulari formati dalla proteina *tau* sono ritenute responsabili del neurodegenerativo alla base della patologia. Tra le conseguenze di tale processo, vi è una progressiva deplezione sinaptica nelle aree interessate, con conseguente compromissione dei processi di apprendimento e memoria (Chen and Mobley, 2019).

L'eccitotossicità mediata dal glutammato svolge un ruolo chiave almeno nelle fasi prodromiche della malattia. Gli oligomeri di β-amiloide, infatti, inibiscono la ricaptazione del glutammato da parte degli astrociti alterando la funzionalità del trasportatore EAAT2; ciò comporta un aumento della concentrazione di glutammato nello spazio sinaptico (Wood et al., 2022). L'attivazione completa del recettore NMDA, tuttavia, richiede non solo il legame del glutammato ma anche quello di un co-agonista, D-serina o glicina. È stato osservato che la presenza di Aβ induce un incremento dell'espressione della serina racemasi, responsabile della conversione del L-serina a D-serina, determinando così un aumento dei livelli di D-serina (Wu et al., 2004).

Nelle fasi più avanzate della patologia si verifica, al contrario, una riduzione dell'espressione di diversi fattori coinvolti nel rilascio del glutammato, tra cui STX1A, sinaptofisina e SYT1 (Heinonen et al., 1995; Huang et al., 2026). Di conseguenza, i livelli di glutammato diminuiscono, favorendo la perdita sinaptica caratteristica del morbo di Alzheimer. Inoltre, l'iperattivazione iniziale dei recettori NMDA conduce a una loro progressiva desensibilizzazione e successiva internalizzazione, riducendone la disponibilità sulla membrana neuronale, in particolare a livello ippocampale. Questo meccanismo contribuisce al progressivo declino cognitivo associato alla patologia (Capó et al., 2025).

1.4.2 Morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson è caratterizzato da una marcata perdita dei neuroni dopaminergici situati nella pars compacta della substantia nigra, i quali proiettano, attraverso i propri assoni, verso lo striato dorsale e regolano le vie motorie sotto il controllo dei gangli della base. Tale degenerazione neuronale è principalmente attribuita all'accumulo di aggregati della proteina

α-sinucleina, responsabili della formazione di inclusioni intracellulari denominate corpi di Lewy, tipicamente osservate nei pazienti affetti da questa patologia (Maiti et al., 2017).

Numerose evidenze indicano che anche le alterazioni della neurotrasmissione glutammatergica contribuiscono in modo significativo alla progressione del Parkinson. Il glutammato, infatti, è implicato nei nodi funzionali dei circuiti deputati alla modulazione dei movimenti volontari. Si ritiene che lo squilibrio nella trasmissione glutammatergica sia correlato a danni o mutazioni dei trasportatori astrocitari del glutammato, in particolare EAAT2 (Das et al., 2025).

1.4.3 Sclerosi laterale amiotrofica

La sclerosi laterale amiotrofica è una patologia neurodegenerativa progressiva che interessa sia i motoneuroni superiori, localizzati nella corteccia motoria, sia i motoneuroni inferiori, situati nel tronco encefalico e nel midollo spinale. La degenerazione di queste cellule nervose determina una progressiva perdita della funzione motoria, che si manifesta con debolezza muscolare, atrofia e coinvolgimento dei muscoli degli arti, del torace e della parete addominale.

Numerosi studi suggeriscono che l'eccitotossicità glutammatergica rappresenti uno dei principali meccanismi coinvolti nella patogenesi della malattia. Tra le alterazioni più rilevanti è stata descritta una ridotta funzionalità del trasportatore astrocitario del glutammato EAAT2. Inoltre, i motoneuroni presentano una limitata capacità di tamponare il Ca^{2+} intracellulare, risultando particolarmente suscettibili ai danni indotti dall'eccessivo ingresso dello ione (Van Den Bosch et al., 2006).

Nei soggetti affetti da SLA sono stati inoltre identificati livelli alterati di alcuni metaboliti, tra cui l'N-acetil-aspartil-glutammato (NAAG), che possono contribuire ad aumentare la disponibilità di glutammato (Rothstein et al., 1990). Nelle forme associate a mutazioni del gene superossido dismutasi 1 (SOD1), è stata osservata anche un'espressione anomala di recettori AMPA permeabili al Ca^{2+}, condizione che amplifica ulteriormente la vulnerabilità dei motoneuroni all'eccitotossicità (Roy et al., 1998).

Il processo eccitotossico è ulteriormente aggravato dal contesto neuroinfiammatorio caratteristico della malattia. L'attivazione della microglia determina infatti il rilascio di citochine pro-infiammatorie in grado di aumentare l'attività dei recettori NMDA.

Parallelamente, la stimolazione degli astrociti riduce l'efficienza dei trasportatori EAAT2, favorendo l'accumulo di glutammato (Mathis et al., 2017).

1.4.4 Epilessia

L'epilessia è una sindrome neurologica caratterizzata dalla comparsa ricorrente di crisi epilettiche, conseguenza di un'attività elettrica anomala e sincronizzata di gruppi di neuroni ipereccitabili. Le manifestazioni cliniche possono comprendere spasmi muscolari associati o meno a perdita di coscienza. In base all'estensione del focus epilettico, le crisi vengono distinte in parziali, quando interessano specifiche aree cerebrali, oppure generalizzate, qualora coinvolgano entrambi gli emisferi. Le forme focali rappresentano la tipologia più frequente. L'origine dell'epilessia può essere attribuita a cause genetiche, traumatiche, infiammatorie, neoplastiche, ischemiche oppure rimanere sconosciuta (Shariff et al., 2024).

Durante l'attività convulsiva, l'intensa attivazione dei neuroni piramidali determina un rilascio eccessivo di glutammato, con conseguente iperattivazione dei recettori NMDA (Barker-Haliski and White, 2015). Analogamente a quanto osservato in altre patologie del sistema nervoso centrale, anche nell'epilessia gli astrociti mostrano una ridotta capacità di rimuovere il glutammato dallo spazio extracellulare a causa della diminuzione dell'espressione del trasportatore EAAT2 e dell'enzima glutammina sintetasi. In condizioni patologiche, inoltre, gli stessi astrociti possono acquisire un fenotipo reattivo e contribuire al rilascio di ulteriore glutammato, amplificando il fenomeno dell'eccitotossicità (Green et al., 2021).

A tale processo si associa l'attivazione della microglia, che rilascia citochine pro-infiammatorie capaci di incrementare l'attività dei recettori NMDA e di compromettere ulteriormente la funzionalità dei trasportatori EAAT2. L'insieme di questi eventi determina un marcato danno neuronale, accompagnato da modificazioni della connettività cerebrale, formazione di circuiti sinaptici aberranti e perdita degli interneuroni GABAergici. Di conseguenza, anche una singola crisi epilettica può indurre cambiamenti permanenti che favoriscono l'evoluzione verso una forma cronica della malattia (Green et al., 2021).

1.4.5 Ictus

L'ictus rappresenta una delle principali cause di mortalità e di disabilità permanente nei Paesi industrializzati. Dal punto di vista clinico si distinguono due forme principali: l'ictus

ischemico e quello emorragico. La variante ischemica è la più frequente, costituendo circa l'87% dei casi, ed è generalmente provocata dall'occlusione trombotica delle arterie cerebrali (Capirossi et al., 2023).

La riduzione del flusso ematico conseguente all'ostruzione vascolare innesca una complessa cascata di eventi fisiopatologici, tra cui un marcato incremento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+}. Tale aumento è dovuto principalmente al rilascio del Ca^{2+} immagazzinato nel reticolo endoplasmatico, fenomeno favorito dalla carenza energetica conseguente all'interruzione dell'apporto di ossigeno e nutrienti. L'accumulo di Ca^{2+} rende i neuroni maggiormente suscettibili alla depolarizzazione, promuovendo il rilascio di glutammato e l'attivazione dei processi eccitotossici (Szydlowska and Tymianski, 2010).

È stato inoltre osservato che nei pazienti affetti da ischemia cerebrale cronica si verifica un incremento dell'espressione del trasportatore EAAT2 nella sostanza bianca. Tale risposta potrebbe rappresentare un meccanismo compensatorio finalizzato a limitare il danno neuronale indotto dall'ischemia (Yatomi et al., 2013).

1.4.6 Sclerosi multipla

La sclerosi multipla è una malattia infiammatoria demielinizzante del sistema nervoso centrale caratterizzata dalla comparsa di deficit neurologici distribuiti nel tempo e localizzati in differenti aree del sistema nervoso. Le lesioni tipiche della patologia sono rappresentate da placche di demielinizzazione, nelle quali si osservano infiltrazione di cellule immunitarie, perdita degli oligodendrociti e degenerazione degli assoni (Ghasemi et al., 2017).

Sembra che l'eccitotossicità da glutammato svolga un ruolo determinante nei processi di demielinizzazione. Nelle fasi acute della malattia sono stati infatti rilevati livelli aumentati di glutammato nel liquido cerebrospinale. Inoltre, macrofagi e microglia attivati rappresentano una fonte significativa di glutammato durante la risposta infiammatoria, rilasciandolo attraverso specifici emicanali presenti nelle giunzioni comunicanti (Kostic et al., 2013).

Il trasportatore EAAT2, oltre ad essere espresso negli astrociti, è presente anche negli oligodendrociti della sostanza bianca, dove contribuisce al mantenimento dell'omeostasi del glutammato. Nelle lesioni attive della sclerosi multipla è stata osservata una riduzione della sua espressione, estesa anche alle aree circostanti, favorendo così l'accumulo extracellulare

del neurotrasmettitore e il conseguente danno eccitotossico. Tale riduzione sembra essere correlata ai meccanismi immunitari propri della malattia; in particolare, l'aumento del TNF-α determina una diminuzione dell'espressione di EAAT2 negli oligodendrociti, compromettendo ulteriormente la ricaptazione del glutammato (Pitt et al., 2003).

Nelle lesioni sia acute sia croniche è stata inoltre documentata una diminuzione dell'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo del glutammato, quali la glutammina sintetasi e la glutammato deidrogenasi. La ridotta conversione del glutammato in glutammina contribuisce al mantenimento dell'eccitotossicità anche dopo la risoluzione della fase infiammatoria (Kostic et al., 2013).

1.5 Farmacologia del recettore NMDA

La modulazione farmacologica del recettore NMDA può esser svolta da un'ampia varietà di molecole caratterizzate da differenti meccanismi d'azione; molte di queste trovano già un impiego consolidato nella prassi clinica.

1.5.1 Riluzolo

il riluzolo è un farmaco ad azione neuroprotettiva in grado di bloccare la trasmissione glutammatergica nel SNC. Attualmente, esso è impiegato nella parte clinica nel trattamento della sclerosi multipla amiotrofica, dove ha dimostrato di prolungare l'aspettativa di vita e di ritardare il ricorso alla ventilazione forzata nei pazienti.

In particolare, si è visto che, a livello postsinaptico, il riluzolo agisce come antagonista non competitivo dei recettori NMDA. Esso, inoltre, inibisce il rilascio di acido glutammico attraverso un meccanismo pleiotropico legato all'inattivazione dei canali del sodio voltaggio-dipendenti situati sui terminali nervosi glutammatergici, oltre che all'attivazione di un processo di trasduzione del segnale dipendente dalle proteine G.

Studi in vivo hanno mostrato come il riluzolo mostri proprietà neuroprotettive, anticonvulsivanti e sedative. In un modello animale di ischemia cerebrale globale transitoria. In questi animali si è osservata una soppressione completa del picco di acido glutammico indotto dall'ischemia stessa. Infine, studi in vitro indicano che il riluzolo è in grado di proteggere i neuroni in coltura dal danno anossico, dalla tossicità causata dagli inibitori della

ricaptazione del glutammato e dall'azione dei fattori tossici presenti nel liquido cefalorachidiano dei pazienti affetti da SLA (Doble, 1996).

1.5.2 Ketamina

Tra le molecole maggiormente note figura la ketamina, un composto a spiccata azione anestetica e dissociativa. Agendo come antagonista non competitivo, la ketamina si lega a un sito allosterico specifico per la glicina o la D-serina all'interno del recettore NMDA; tale interazione ne inibisce la funzionalità anche in presenza del glutammato. La conseguente riduzione neurotrasmissione glutammatergica sottende alle sue proprietà analgesiche ed anestetiche. Ciononostante, il profilo farmacologico del farmaco include lo sviluppo di manifestazioni psicotomimetiche, quali distorsioni percettive ed allucinazioni, probabilmente derivanti dalle sue interferenze sul sistema dopaminergico (Pribish et al., 2020).

1.5.3 Destrometorfano

Il destrometorfano è un principio attivo comunemente formulato come sedativo della tosse che, tuttavia, se somministrato ad alte dosi, riscontra un'attività rilevante sui recettori NMDA del sistema nervoso centrale. Si tratta di un antagonista debole non competitivo in grado di bloccare la trasmissione eccitatoria bloccando l'attivazione del canale ionotropico. Il superamento dei dosaggi terapeutici standard può determinare la comparsa di effetti di tipo dissociativo, euforizzante o allucinogeno per via della sua interazione con i recettori oppioidi $\sigma 1$ e $\sigma 2$ (Taylor et al., 2016).

1.5.4 Amantadina

L'amantadina è un antagonista debole non competitivo che esplica un'azione protettiva contro l'eccitotossicità indotta da un eccesso di glutammato. Sebbene presenti valori inferiori sia in termini di affinità sia di potenza verso il recettore NMDA, essa presenta alcuni impieghi bella pratica clinica: è infatti impiegata prevalentemente nel trattamento per via orale delle discinesie indotte da Levodopa nelle fasi iniziali del morbo di Parkinson (Marmol et al., 2021); inoltre, studi clinici hanno dimostrato una discreta efficacia nel prevenire la fatica in pazienti affetti da sclerosi multipla (Generali and Cada, 2014).

1.5.5 Memantina

Nel contesto terapeutico della malattia di Alzheimer, la memantina rappresenta uno dei farmaci di riferimento, costituendo attualmente l'unico presidio anti-eccitotossico commercializzato nel territorio europeo. Il suo utilizzo è volto al rallentamento del decadimento cognitivo fin dalle fasi prodromiche della patologia (Tang et al., 2023).

Dal punto di vista meccanicistico, la memantina agisce come antagonista non competitivo in modo dose-dipendente, legandosi al medesimo sito riconosciuto dallo ione Mg^{2+} e bloccando selettivamente il recettore NMDA quando questo si trova nella conformazione aperta. Gli studi evidenziano una spiccata selettività d'azione: la molecola rispetta l'attivazione fisiologica del recettore, concentrando la propria attività inibitoria esclusivamente nei contesti di iperattivazione patologica. Rispetto a molecole come la ketamina, presenta un'affinità recettoriale più contenuta; questa proprietà favorisce un rapido distacco dal canale durante gli eventi di segnalazione fisiologici, preservando le normali funzioni cognitive (Johnson and Kotermanski, 2006).

Inibendo la conduttanza degli NMDA, la memantina previene l'ingresso massivo di Ca^{2+}, riducendo l'eccitotossicità glutammato-dipendente, la neurodegenerazione da stimoli pro-apoptotici e il danno sinaptico associato (Johnson and Kotermanski, 2006).

La somministrazione avviene per via orale (sotto forma di compresse o soluzioni) con un valido assorbimento a livello gastrointestinale. Nonostante la buona tollerabilità generale, il farmaco può indurre eventi avversi a carico del sistema gastrointestinale, ipertensione e manifestazioni psichiatriche o del SNC, imputabili principalmente alla soppressione del tono glutammatergico (Tang et al., 2023).

Un limite farmacologico rilevante della memantina risiede nell'incapacità di discriminare tra la popolazione recettoriale presinaptica e quella postsinaptica. Tale assenza di selettività topografica potrebbe spiegare la mancanza di efficacia significativa riscontrata nei trial clinici condotti per patologie quali la sclerosi multipla e la sclerosi laterale amiotrofica (Bhai et al., 2025; Turalde et al., 2020).

1.6 Nuovi approcci farmacologici

In aggiunta ai presidi terapeutici già impiegati nella pratica clinica, la ricerca si avvale di composti di nuova sintesi. Sebbene tali molecole non abbiano ancora ottenuto l'approvazione per l'uso sull'uomo, esse costituiscono fondamentali strumenti farmacologici che hanno consentito di chiarire nel dettaglio il coinvolgimento dei recettori NMDA nei processi fisiopatologici del sistema nervoso.

1.6.1 AP5 ed MK-801

L'acido (2R)-amino-5-fosfonovalerico (AP5) e la dizocilpina (nota con la sigla MK-801) rappresentano due importanti antagonisti dei recettori NMDA, caratterizzati tuttavia da differenti meccanismi d'azione. L'AP5 si distingue per essere l'unico antagonista di tipo competitivo attualmente disponibile, in grado di impedire il legame del ligando endogeno (glutammato) sul sito di riconoscimento recettoriale. Al contrario, l'MK-801 agisce come antagonista non competitivo, ostruendo direttamente il poro ionico a canale aperto (Tonkiss and Rawlins, 1991).

Un lavoro chiave ha evidenziato come l'inibizione recettoriale indotta dall'AP5 comprometta i processi di formazione della memoria spaziale in modelli murini (Davis et al., 1992). Ulteriori evidenze sperimentali hanno inoltre dimostrato che la somministrazione intracerebrale di AP5 a livello del tronco encefalico promuove l'assunzione di cibo nel ratto, suggerendo una partecipazione dei recettori NMDA anche nei circuiti di regolazione del comportamento alimentare (Hung et al., 2006).

Per quanto concerne l'MK-801, la molecola ha mostrato significative proprietà neuroprotettive in svariati modelli sperimentali *in vitro* ed *in vivo* (Mukhin et al., 1997; Kocaeli et al., 2005). Ciononostante, il suo impiego cronico in modelli animali induce alterazioni comportamentali e neurochimiche sovrapponibili al quadro sintomatologico della schizofrenia, rendendolo un modello farmacologico ampiamente utilizzato per lo studio di tale patologia (Braun et al., 2007).

1.6.2 Glunomab

Il Glunomab è un anticorpo monoclonale murino ingegnerizzato per inibire l'attivazione del recettore NMDA a livello delle cellule neuroendoteliali, innescata dall'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) nel contesto dell'ictus ischemico (Lebrun et al., 2024).

Dal punto di vista molecolare, il Glunomab riconosce e lega un dominio regolatorio specifico presente sulla subunità GluN1 del recettore NMDA, ostacolando stericamente la successiva interazione con il tPA. Questo blocco previene il reclutamento e la trasmigrazione dei leucociti attraverso la barriera emato-encefalica (BEE), fenomeno comunemente riscontrato nelle fasi acute e croniche di diverse malattie neurodegenerative (Mehra et al., 2020). In più, il trattamento con Glunomab ha evidenziato marcati effetti neuroprotettivi in modelli murini di morbo di Parkinson (Torrente et al., 2025). Attualmente, le linee di ricerca sono orientate allo sviluppo e all'ottimizzazione di versioni umanizzate e ad alta affinità dell'anticorpo, propedeutiche a un futuro impiego traslazionale.

1.6.3 JGRi1

Nel 2019, uno studio condotto dal gruppo del prof. Feligioni ha portato alla caratterizzazione di un nuovo strumento farmacologico progettato per modulare i meccanismi presinaptici responsabili del rilascio aberrante di glutammato. Nello specifico, mediante approcci di docking molecolare focalizzati sull'interazione tra JNK2 e STX1A, è stato sintetizzato un peptide in grado di mimare la regione N-terminale di STX1A. Tale costrutto interagisce direttamente con JNK2, impedendo l'associazione fisica tra le due proteine target. Per garantire la necessaria permeabilità cellulare, la sequenza amminoacidica così ingegnerizzata, denominata "JGRi1", è stata coniugata alla sequenza della proteina Tat derivata dal virus HIV-1 (Marcelli et al., 2019) (Fig. 9).

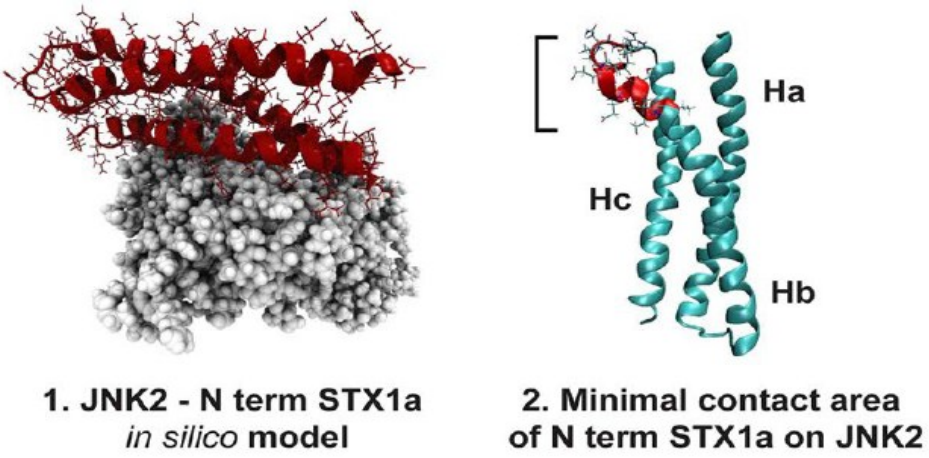


Figura 9. Identificazione della superficie minima di contatto tra JNK2 e STX1A per lo sviluppo del peptide JGRi1 (modificato da Marcelli et al., Sci Rep, 2019).

Dal punto di vista funzionale, il peptide cellulo-permeabile JGRi1 ha mostrato un'elevata efficacia nel prevenire il complesso STX1A-JNK2 indotto dallo stimolo con NMDA, determinando un'incisiva riduzione dell'esocitosi di glutammato in molteplici sistemi sperimentali, comprese le frazioni sinaptosomiali isolate da modelli murini e modelli cellulari di neuroblastoma (Marcelli et al., 2019c; Cimino and Feligioni, 2024c). Inoltre, prove *in vivo* hanno attestato che la somministrazione per via intraperitoneale nel topo consente al peptide di superare efficacemente la barriera emato-encefalica e raggiungere il tessuto cerebrale (Marcelli et al., 2019).

CAPITOLO 2

2. Scopo della tesi

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso l'European Brain Research Institute (EBRI) "Rita Levi-Montalcini" di Roma.

In questo studio, è stato impiegato un modello cellulare costituito da neuroni primari di topo per caratterizzare nel dettaglio l'effetto neuroprotettivo del peptide JGRi1 contro l'eccitotossicità indotta da NMDA. L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quindi quello di valutare la capacità del peptide JGRi1 di penetrare all'interno dei neuroni e di attenuarne la morte cellulare NMDA-dipendente andando a modulare l'asse funzionale JNK2/STX1A, comparandone contestualmente l'effetto protettivo a quello del ben noto antagonista del recettore NMDA memantina.

CAPITOLO 3

3. Materiali e Metodi

3.1 Animali da laboratorio.

Per l'allestimento delle colture primarie di neuroni corticali sono state utilizzate femmine gravide di topi C57BL/6J. Gli animali sono stati stabulati in condizioni controllate di temperatura e umidità, con un ciclo luce/buio di 12 ore e con accesso a cibo e acqua.

3.2 Allestimento e trattamento delle colture neuronali primarie.

Le colture primarie di neuroni corticali sono state preparate secondo il protocollo precedentemente descritto (Beaudoin et al., 2012). Brevemente, le cortecce cerebrali sono state isolate da embrioni di topo al giorno di gestazione 17.5 (E17.5), lavate in terreno di dissezione (HBSS privo di Ca^{2+}/ Mg^{2+} con l'aggiunta di sodio piruvato 1X, glucosio 0,1% p/v e HEPES 10 mM, pH = 7,3) e digerite enzimaticamente con papaina (20 U/mL, 20 min, 37 °C; Applichem). Successivamente, il tessuto è stato tritato e piastrato su piastre prerivestite di poli-L-lisina (Merck). Dopo 4 ore, il terreno di piastratura (Dulbecco's Modified Eagle Medium con l'aggiunta di 10% di siero fetale bovino, glucosio 0,45% p/v, sodio piruvato 1X, pennicillina/streptomicina 1X, L-glutammina 1X) è stato sostituito con il terreno di mantenimento (Neurobasal con l'aggiunta di B-27 1X, penicillina/streptomicina 1X e L-glutammina 1X). I neuroni sono stati mantenuti in coltura fino al quattordicesimo giorno *in vitro* (DIV14) e successivamente trattati con memantina (24 h; Merck) o JGRi1 (1 h) prima della stimolazione con NMDA (10 μM / 100 μM NMDA + 2 μM glicina, 3 h).

3.3 Disegno e sintesi dei peptidi.

L'identificazione e la produzione della sequenza amminoacidica del peptide JGRi1 sono state descritte in precedenza (Marcelli et al., 2019). Brevemente, mediante l'utilizzo del software Rosetta 3.427 sono state condotte simulazioni di docking molecolare tra JNK2 e STX1A, che hanno consentito di identificare l'area di contatto minima tra JNK2 e la porzione N-terminale di STX1A. Sulla base dell'output computazionale, è stato progettato un piccolo peptide in grado di interferire con l'interazione JNK2-STX1A. La sequenza effettrice (IEQSIEQEEGLNRS), corrispondente alla regione N-terminale di STX1A coinvolta nel

contatto con JNK2, è stata coniugata a una sequenza di 12 residui amminoacidici (GRKKRRQRRRPP) derivata dalla proteina Tat di HIV-1 per conferire permeabilità cellulare. Il peptide F-JGRi1 è stato ottenuto coniugando l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) all'estremità N-terminale della proteina. Il controllo negativo ΔTat-F-JGRi1 è stato prodotto rimuovendo la sequenza Tat e legando il fluoroforo FITC direttamente all'estremità N-terminale del peptide.

3.4 Saggio di vitalità cellulare.

I neuroni piastrati in piastre da 96 pozzetti al giorno DIV0 sono stati fatti maturare in coltura ed esposti a NMDA (10 o 100 μM) in presenza di glicina per valutare l'eccitotossicità. Per i saggi di neuroprotezione, le cellule sono state pre-trattate con memantina (20–80 μM, 24 h) o JGRi1 (5–80 μM, 1 h) prima della stimolazione con NMDA. La vitalità cellulare è stata valutata mediante l'aggiunta del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (0,5 mg/mL; Biotium), seguita da un'incubazione di 4 ore a 37 °C. La reazione è stata bloccata con DMSO (Merck) e l'assorbanza è stata misurata mediante un lettore di micropiastre alla lunghezza d'onda di 570 nm.

3.5 Saggio di citotossicità.

I neuroni piastrati in piastre da 96 pozzetti al DIV0 sono stati coltivati fino a maturazione, stimolati con NMDA. Per i saggi di neuroprotezione, le cellule sono state pre-trattate con memantina (20–80 μM, 24 h) o JGRi1 (5–80 μM, 1 h) prima della stimolazione con NMDA. In seguito, per dosare il rilascio di lattato deidrogenasi (LDH), è stato prelevato un volume di terreno di coltura (50 μL) cui è stato aggiunto il substrato di reazione (50 μL; Roche). Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37 °C, l'assorbanza è stata letta a 409 nm.

3.6 Misurazione del rilascio di glutammato

Il rilascio di glutammato è stato quantificato mediante un kit commerciale (Abcam). I neuroni sono stati piastrati in piastre da 96 pozzetti al DIV0, coltivati fino a maturazione e trattati con Memantina o JGRi1 prima della stimolazione con NMDA. Un'aliquota di terreno di coltura (50 μL) è stata prelevata e incubata con la miscela di reazione (100 μL per 30 min a 37 °C); l'assorbanza è stata successivamente letta a 450 nm mediante un lettore di micropiastre.

3.7 Immunofluorescenza

Al termine dei vari trattamenti, i neuroni coltivati in piastre da 12 pozzetti sono stati fissati in paraformaldeide al 4% (PFA; Santa Cruz), permeabilizzati con una soluzione di Triton X-100 allo 0,5% in PBS (Merck) e incubati in soluzione di blocco (0,1 M glicina, 2% BSA, 2% FCS, 0,1% Triton X-100) per 1 ora. I campioni sono stati poi incubati con gli anticorpi primari overnight a 4 °C, e successivamente con gli anticorpi secondari coniugati a fluorofori Alexa Fluor 488/594 (Invitrogen) per 1 ora a temperatura ambiente. I vetrini coprioggetto sono stati montati con un terreno di montaggio contenente DAPI (Fluoromount, Invitrogen) e analizzati mediante microscopia confocale a scansione laser (ingrandimento 63×; Olympus; Confocal System FV500). L'intensità di fluorescenza è stata quantificata come valore medio di grigio previa sottrazione del fondo, analizzando ≥50 cellule per condizione. Per quantificare la fluorescenza del L-glutammato nei domini presinaptici, le regioni neuronali positive per il marcatore presinaptico Synaptosome Associated Protein of 25 kDa (SNAP25) sono state selezionate e isolate mediante il software ImageJ; la fluorescenza è stata quindi calcolata come valore medio di grigio previa sottrazione del fondo su ≥30 cellule per condizione.

3.8 Saggio terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL).

Il saggio è stato eseguito utilizzando un kit commerciale (Biotium) secondo le istruzioni del produttore. I neuroni sono stati fissati in PFA al 4%, permeabilizzati con Triton X-100 allo 0,5% e incubati con la miscela di reazione contenente l'enzima deossiribonucleotidil transferasi terminale (TdT) (1 h, 37 °C). Dopo opportuni lavaggi, i vetrini sono stati montati con terreno contenente DAPI e acquisiti al microscopio confocale (lunghezza d'onda 488 nm). Le cellule TUNEL-positive sono state quantificate come percentuale sul totale delle cellule analizzate (≥100 cellule per condizione).

3.9 Saggio di permeabilità cellulare

Per valutare la permeabilità cellulare del peptide JGRi1, i neuroni sono stati incubati con il peptide FITC-JGRi1 ad una concentrazione di 40 μM per 1 ora a 37 °C. Il peptide ΔTat-FITC-JGRi1 è stato impiegato come controllo negativo. Le cellule sono state fissate in PFA

al 4%, montate con un montante contenente DAPI e analizzate al microscopio confocale (488 nm).

3.10 Misurazione del calcio intracellulare

I livelli di Ca^{2+} intracellulare sono stati valutati mediante l'indicatore fluorescente Fluo-3/AM (Invitrogen). I neuroni sono stati pre-incubati con Fluo-3/AM ad una concentrazione di 5 μM per 30 minuti prima del trattamento con NMDA. I campioni sono stati lavati due volte con PBS desalinizzato (Aurogene), fissati in PFA al 4%, montati con un montante contenente DAPI e acquisiti al microscopio confocale (488 nm). Per la chelazione del Ca^{2+} extracellulare, i neuroni sono stati trattati con acido etilendiamminotetracetico (EDTA) concentrato 1 mM (ScyTek Laboratories) per 3 ore prima della stimolazione con NMDA; il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari è stato invece inibito mediante pre-trattamento con dantrolene 10 μM (Merck) per 1 ora. Per quantificare i livelli di Ca^{2+} nei domini post-sinaptici, le regioni positive per la proteina Postsynaptic Density Protein of 95 kDa (PSD95) sono state selezionate e isolate mediante ImageJ, calcolando l'intensità di fluorescenza come valore medio di grigio (previa sottrazione del fondo) su ≥30 cellule per condizione.

3.11 Monitoraggio del traffico vescicolare

Il traffico delle vescicole sinaptiche è stato monitorato mediante l'impiego del tracciante fluorescente FM1-43 (Synaptogreen C4, Merck). I neuroni sono stati pre-incubati con FM1-43 ad una concentrazione di 50 μM per 5 minuti e successivamente stimolati con NMDA (5 min) per indurre l'internalizzazione del tracciante. I campioni sono stati lavati tre volte con PBS desalinizzato, fissati in PFA al 4%, montati con un montante contenente DAPI e acquisiti al microscopio confocale (488 nm). Per quantificare la ricaptazione di FM1-43 nei terminali presinaptici, i domini neuronali positivi per il marcatore presinaptico sinaptotagmina 1 (SYT1) sono stati selezionati e isolati mediante ImageJ, calcolando l'intensità di fluorescenza come valore medio di grigio (previa sottrazione del fondo) su ≥30 cellule per condizione.

3.12 Preparazione dei lisati cellulari

I neuroni a DIV14 sono stati lisati in buffer RIPA (Invitrogen) addizionato con una miscela di inibitori delle proteasi (Serva) e delle fosfatasi (Roche). I lisati sono stati sottoposti a sonicazione, incubati in ghiaccio per 30 minuti e centrifugati (10.000 rpm per 10 min). I

surnatanti sono stati raccolti e conservati a −20 °C; la concentrazione proteica totale è stata determinata mediante saggio di Bradford (Serva).

3.13 Western Blot

Durante la fase di preparazione, a ciascun estratto proteico (50 μg) è stato aggiunto un buffer di caricamento costituito da Laemmli 1X contenente il 2,5% di β-mercaptoetanolo; in seguito, i campioni sono stati denaturati al calore (95 °C per 5 min) e separati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) e trasferiti su membrane di polivinil-denfluoruro (PVDF). Le membrane sono state incubate in soluzione di blocco costituita da latte in polvere al 5% in tampone Tris-salino con tween 0.1 % (TBS-T) per 1 ora a temperatura ambiente e successivamente incubate overnight a 4 °C con gli anticorpi primari diluiti in tampone di blocco o in soluzione di BSA al 3% in TBS-T. Per la rivelazione sono stati utilizzati anticorpi secondari coniugati all'enzima perossidasi di rafano (HRP; anti-mouse o anti-rabbit, Bio-Rad), ed i segnali luminescenti sono stati visualizzati mediante chemiluminescenza amplificata (ECL; Invitrogen). La β-tubulina è stata impiegata come controllo di caricamento. L'intensità delle bande è stata quantificata tramite il software ImageJ ed espressa come variazione relativa (fold change) normalizzata rispetto al controllo di caricamento. Lo stato di attivazione di JNK (p-JNK) e STX1A (p-STX1A) è stato espresso come rapporto tra la forma fosforilata della proteina e la proteina totale.

3.14 Saggio di assemblaggio del complesso SNARE

Per valutare l'effetto dei diversi trattamenti sull'assemblaggio del complesso SNARE, gli estratti proteici sono stati risospesi in un tampone non denaturante (0,5 M Tris-HCl, 15% v/v glicerolo e 1% v/v bromofenolo blu, pH = 6.8) senza esser sottoposti a bollitura, al fine di preservare le interazioni proteina-proteina. Le proteine sono state quindi separate mediante SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa. I complessi SNARE sono stati identificati impiegando un anticorpo anti-STX1A e le bande con peso molecolare ≥66kDa sono state quantificate come indice di assemblaggio del complesso. La β-tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. La formazione del complesso SNARE è stata espressa come rapporto tra STX1A integrata nel complesso e STX1A libera.

3.15 Proximity Ligation Assay (PLA)

Il saggio PLA è stato eseguito seguendo le istruzioni del produttore (Merck). In breve, i campioni sono stati incubati con gli anticorpi primari overnight a 4 °C, e successivamente con le sonde PLA PLUS/MINUS per 1 ora a 37 °C. Sono state quindi condotte le reazioni di ligazione (30 min a 37 °C) e di amplificazione (100 min a 37 °C). Il citoscheletro neuronale è stato controcolorato con Falloidina-488 e i campioni sono stati montati su vetrino. I puncta della rezione PLA sono stati segmentati mediante ImageJ e quantificati come numero di puncta per cellula, dividendo il numero totale di puncta per il numero di cellule analizzate (≥50).

3.16 Analisi di co-localizzazione di Pearson

Per quantificare la co-localizzazione tra JNK2 e STX1A, i neuroni sono stati sottoposti a immunocolorazione doppia per entrambe le proteine; successivamente, i prolungamenti neuronali sono stati isolati e selezionati tramite ImageJ ed è stato calcolato il coefficiente di Pearson mediante il plug-in BioP-JACOP (≥30 cellule per condizione). Per l'analisi di co-localizzazione JIP1/p-JNK, i neuroni sono stati marcati per entrambe le proteine ed i somi neuronali sono stati selezionati per determinare il coefficiente di Pearson (≥30 cellule per condizione).

3.17 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta mediante il software GraphPad Prism 9. Le comparazioni multiple sono state analizzate tramite analisi della varianza ad una via (ANOVA ad una via) seguita dal test post-hoc di Tukey.

3.18 Anticorpi primari

Gli anticorpi primari utilizzati nel presente studio sono elencati nella Tabella 1.

Anticorpo	Ospite	Numero di catalogo	Produttore	RRID
anti-JIP1	Topo	sc-25267	Santa Cruz	AB_627838
anti-cleaved CASP3	Coniglio	9661	Cell Signaling	AB_2341188
Anti-BCL-XL	Coniglio	2762	Cell Signaling	AB_10694844
anti-Tubulin β3 (TUJ1)	Coniglio	ab18207	Abcam	AB_444319
anti-p-JNK	Topo	sc-6254	Santa Cruz	AB_628232
anti-p-JNK (Thr183/Thr185)	Coniglio	9251	Cell Signaling	AB_331659
anti-JNK1	Coniglio	06-748	Millipore	AB_310235
anti-JNK2	Topo	sc-827	Santa Cruz	AB_2141042
anti-JNK2	Coniglio	GTX107477	GeneTex	AB_1950881
anti-JNK3	Coniglio	2305	Cell Signaling	AB_2281744
anti-p-STX1A (Ser14)	Coniglio	CSB-PA053965	Cusabio	---
anti-STX1A	Coniglio	110302	Synaptic System	AB_887846
anti-STX1A	Topo	S0664	Merck	AB_477483
Anti-glutamate (L-glut)	Coniglio	ab9440	Abcam	AB_307256
Anti-SNAP25	Coniglio	S9684	Merck	AB_261576
Anti-SYT1	Topo	sc-136480	Santa Cruz	AB_10611453
Anti-PSD95	Topo	sc-71933	Santa Cruz	AB_10611453
Anti-H3	Coniglio	ab1791	Abcam	AB_302613
Anti-GFAP	Coniglio	12389S	Cell Signaling	AB_2631098

Tabella 1. Lista degli anticorpi primari.

CAPITOLO 4

4. Risultati

4.1 Alte concentrazioni di NMDA innescano i meccanismi dell'eccitotossicità e il rilascio aberrante di glutammato in neuroni primari di topo.

Per studiare l'eccitotossicità indotta da NMDA, i neuroni primari di topo sono stati trattati con NMDA a concentrazioni di 10 µM o 100 µM; successivamente, la vitalità e la morte cellulare sono state valutate rispettivamente tramite il saggio MTT e il saggio di rilascio della LDH. I saggi hanno evidenziato che, mentre l'NMDA a 10 µM è stato ben tollerato, ad una concentrazione di 100 µM esso produce tossicità nei neuroni primari (Fig. 1A-B), come confermato anche dal seguente saggio TUNEL (Fig. 1C-D).

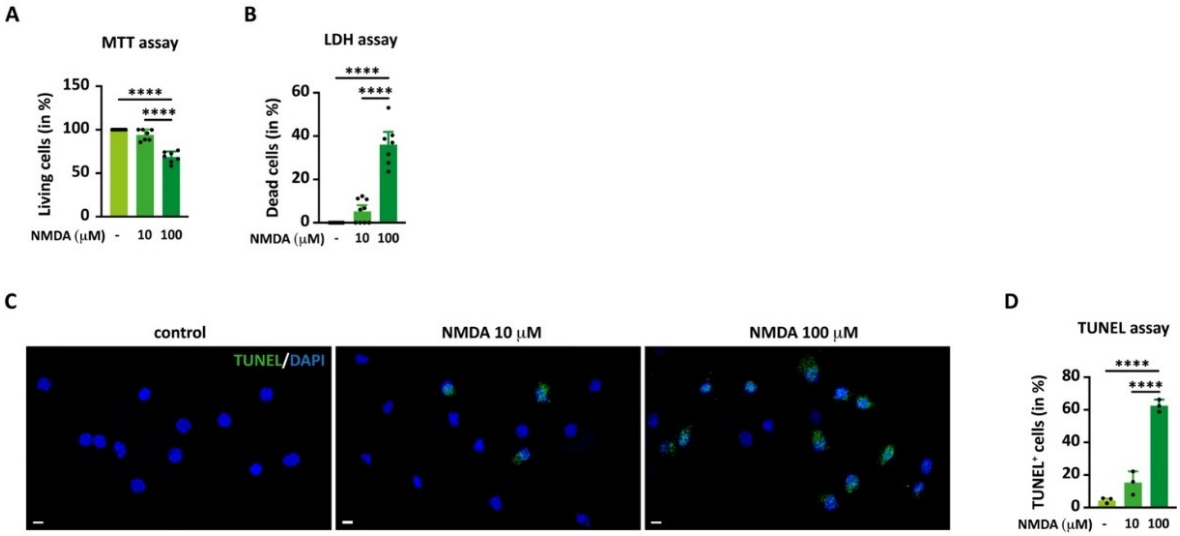


Figura 1. Tossicità dell'NMDA su neuroni primari di topo. A Saggio MTT su neuroni primari. **B** Saggio LDH su neuroni primari. **C-D** Immagini rappresentative del saggio TUNEL su neuroni primari (C). La quantificazione è mostrata in D. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 µM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. **** = $p<0.0001$.

Per chiarire se la morte cellulare NMDA-indotta fosse dovuta ad eccitotossicità, è stato valutato l'influsso di Ca^{2+} nelle regioni poststinaptiche, il quale innesca l'attivazione delle vie apoptotiche Ca^{2+}-dipendenti. Come previsto, l'NMDA a 100 µM ha generato un imponente afflusso di Ca^{2+} nei neuroni, misurato tramite il tracciante Ca^{2+}-sensibile Fluo-

3/AM. Nei vari esperimenti, il segnale del Fluo-3/AM co-localizzava con il marcatore post-sinaptico PSD95, confermando che il Ca^{2+} si localizzava specificamente nei domini post-sinaptici (Fig. 2A-B).

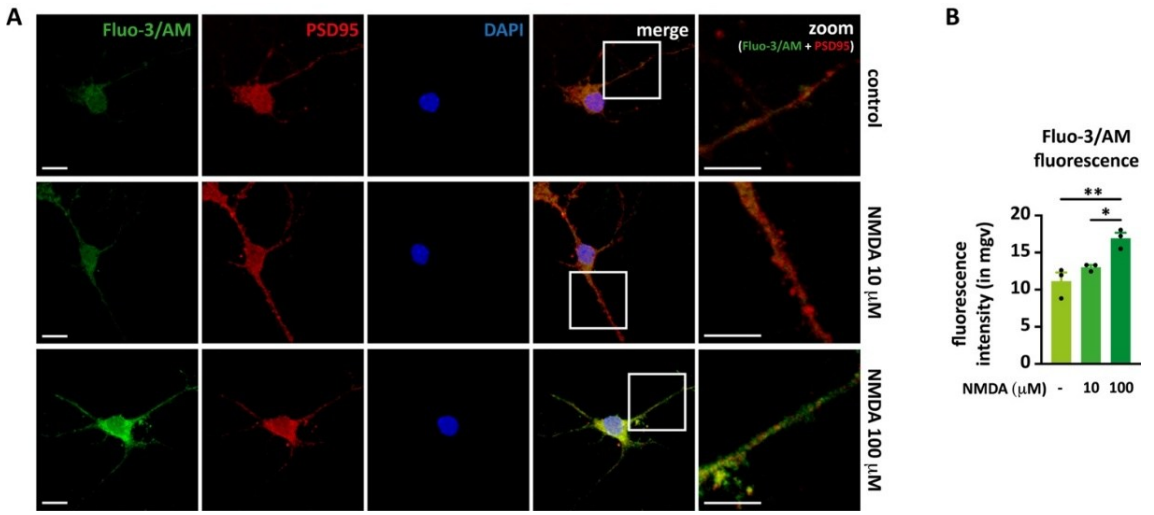


Figura 2. Lo stimolo con NMDA induce un ingresso di Ca^{2+} in maniera dose-dipendente in neuroni primari di topo. A-B Immagini rappresentative del saggio con Fluo-3/AM. I neuroni sono stati dapprima incubati col tracciante (verde) e poi marcati per il marker postsinaptico PSD95 (A). La quantificazione è mostrata in B. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$.

In linea con l'attivazione dell'apoptosi Ca^{2+}-dipendente, il marcatore pro-apoptotico caspasi-3 attivata (c-CASP3) si è accumulato nei nuclei dei neuroni trattati con 100 μM NMDA, ma non con 10 μM NMDA (Fig. 3A-D). Al contempo, l'NMDA a 100 μM ha ridotto l'espressione del fattore anti-apoptotico B-cell lymphoma extra-large (BCL-XL) (Fig. 3E-F).

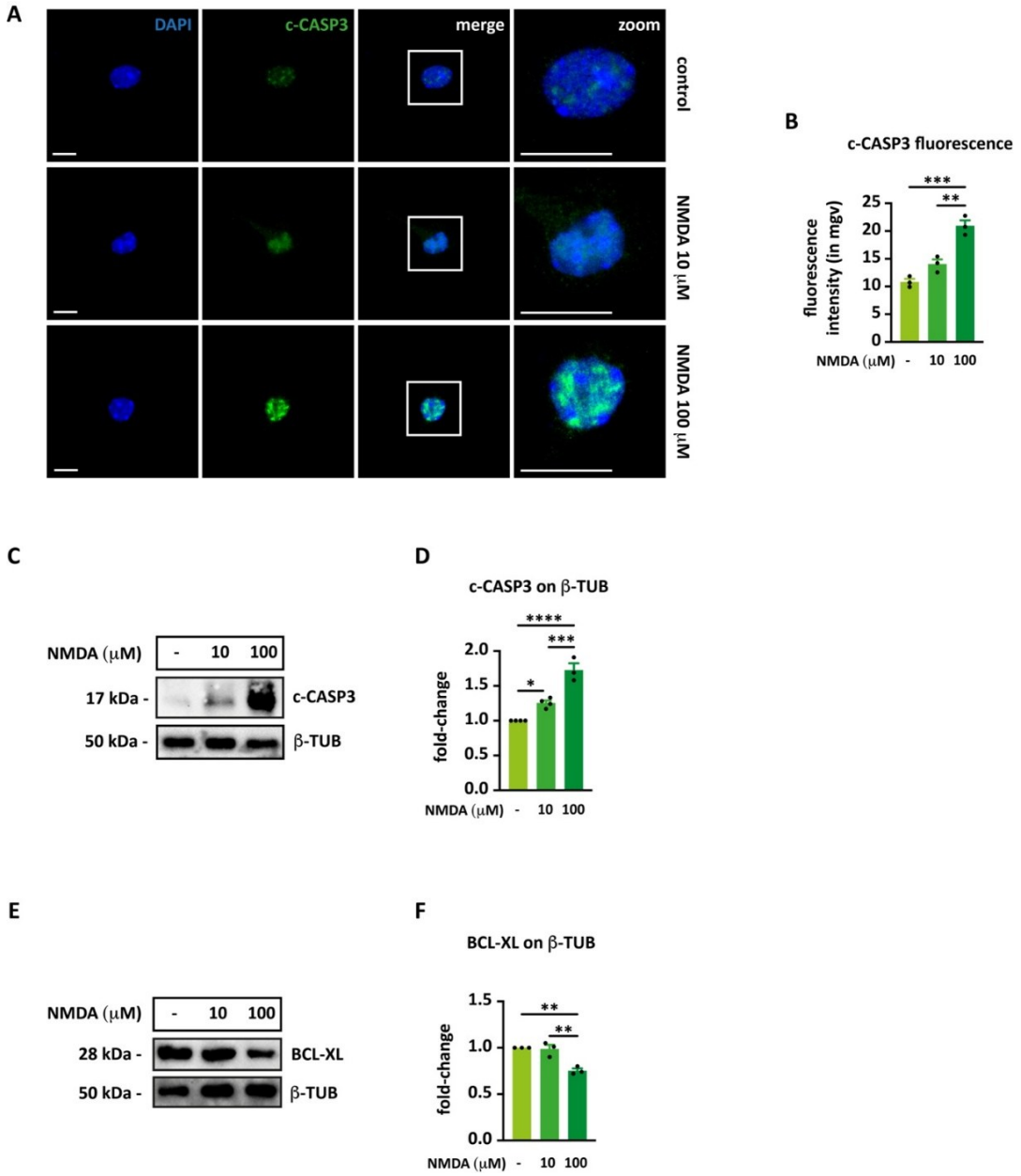


Figura 3. Alte dosi di NMDA inducono l'attivazione dell'apoptosi su neuroni primari di topo. A-B Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza per c-CASP3. La quantificazione è mostrata in B. **C-D** Western blot rappresentativo per c-CASP3 e β-TUB (loading control) (C). L'analisi densitometrica è mostrata in D. **E-F** Western blot rappresentativo per BCL-XL e β-TUB (loading control) (E). L'analisi densitometrica è mostrata in F. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 µM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. ** = p<0.01; *** = p<0.001; **** = p<0.0001.

Per studiare l'effetto dell'NMDA sul traffico delle vescicole sinaptiche, è stato impiegato il tracciante FM1-43, che viene internalizzato attivamente dalle vescicole sinaptiche al momento della loro fusione con la membrana presinaptica. Il trattamento con NMDA ha indotto un aumento dose-dipendente del traffico di vescicole pre-sinaptiche nei neuroni,

come evidenziato dal tracciante FM1-43. Inoltre, le vescicole cariche di FM1-43 hanno mostrato co-localizzazione con il marcatore presinaptico sinaptotagmina 1 (SYT1) (Fig. 4A-B), suggerendo una loro localizzazione presinaptica.

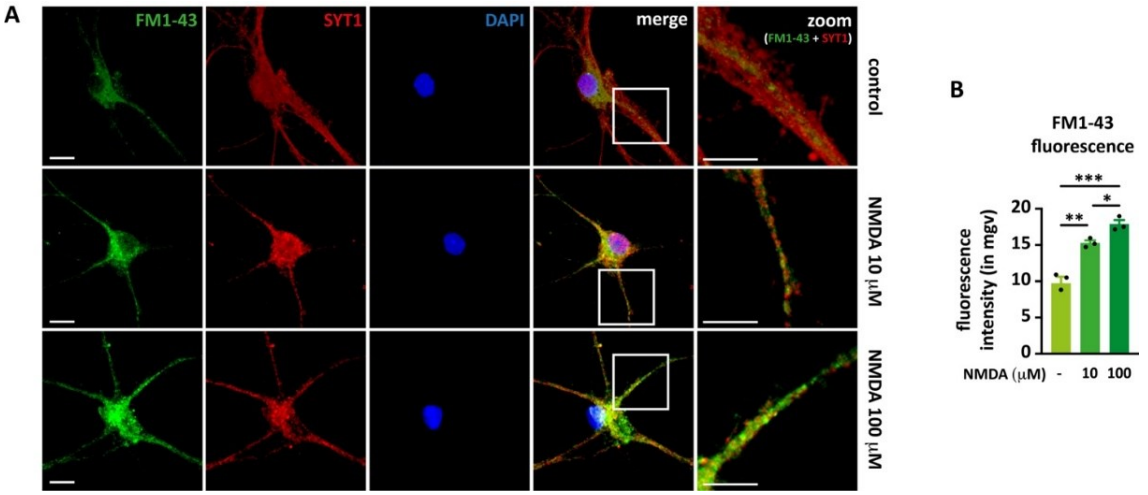


Figura 4. Valutazione dell'afflusso di Ca^{2+} indotto da stimolo NMDA su neuroni primari di topo. A-B Immagini rappresentative del saggio con FM1-43. I neuroni sono stati dapprima incubati col tracciante (verde) e poi marcati per il marker postsinaptico PSD95 (A). La quantificazione è mostrata in B. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 µM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$.

Infine, l'effetto dell'NMDA sul glutammato è stato valutato mediante due approcci. In primo luogo, la quantità di glutammato rilasciata dai neuroni nel loro terreno di coltura è stata valutata tramite saggio colorimetrico, evidenziando un rilascio dose-dipendente di L-glutammato (L-glut) a seguito dello stimolo con NMDA (Fig. 5A). In parallelo, i livelli intracellulari di L-glut nei neuroni sono stati valutati mediante immunofluorescenza. L'immunoreattività per L-glut si è ridotta in modo dose-dipendente dopo il trattamento con NMDA, in coerenza con un suo maggiore rilascio dai domini presinaptici, identificati dal marcatore SNAP25 (Fig. 5B-C).

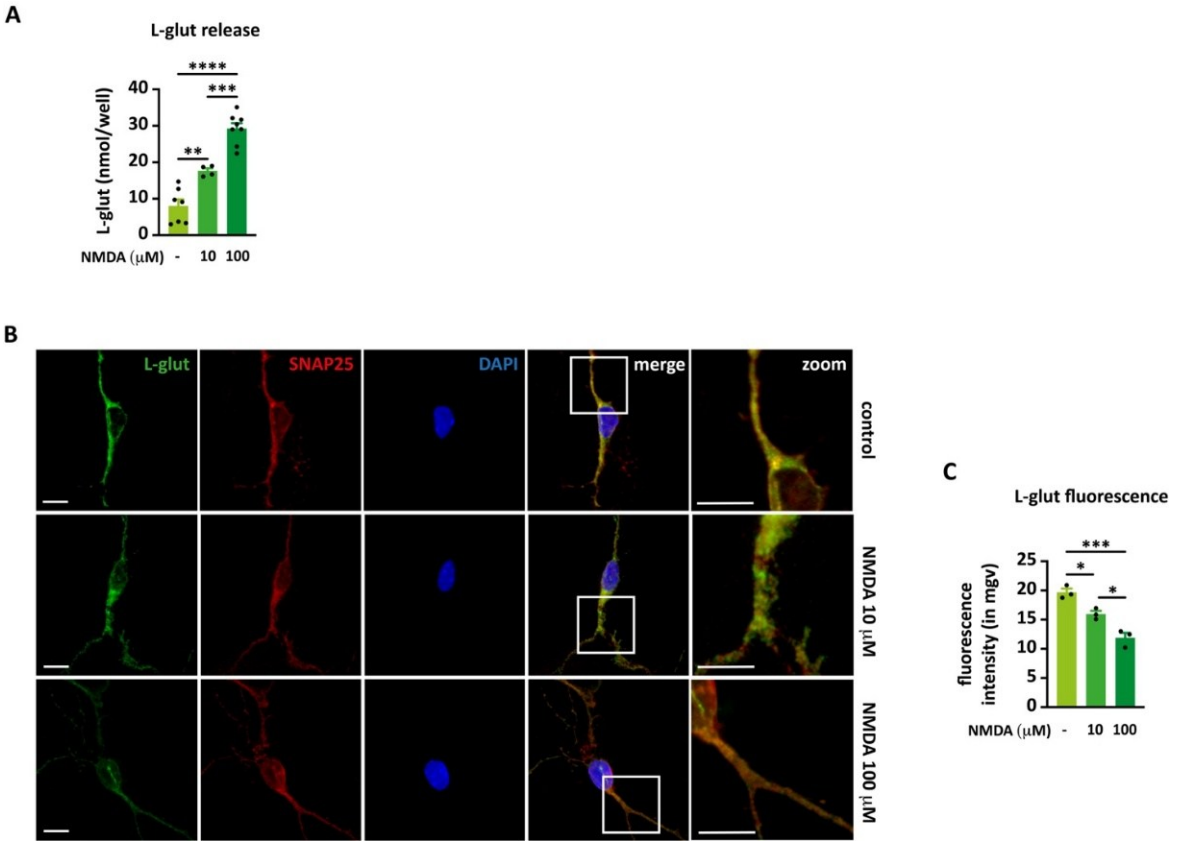


Figura 5. L'NMDA induce un rilascio di glutammato dose-dipendente da parte di neuroni primari di topo. A Saggio di rilascio di glutammato su neuroni primari. **B-C** Co-immunofluorescenza rappresentativa per L-glut (verde) e SNAP25 (rosso) (B). La quantificazione è mostrata in C. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; *** = $p<0.001$.

4.2 Il trattamento con alte dosi di NMDA promuove l'attivazione del pathway nPING nei neuroni primari di topo

Secondo il modello nPING, a seguito dell'attivazione del recettore NMDA, JNK2 interagisce con STX1A (Marcelli et al., 2019; Cimino and Feligioni, 2024). STX1A è risultata espressa in modo uniforme sia nel soma cellulare sia nei prolungamenti neuronali, senza mostrare variazioni in seguito all'applicazione di NMDA (Fig. 6A-B). All'analisi mediante Western Blot, STX1A è comparsa come una doppia banda a circa 35 kDa; non sono state notate alterazioni dopo il trattamento con NMDA (Fig. 6C-D).

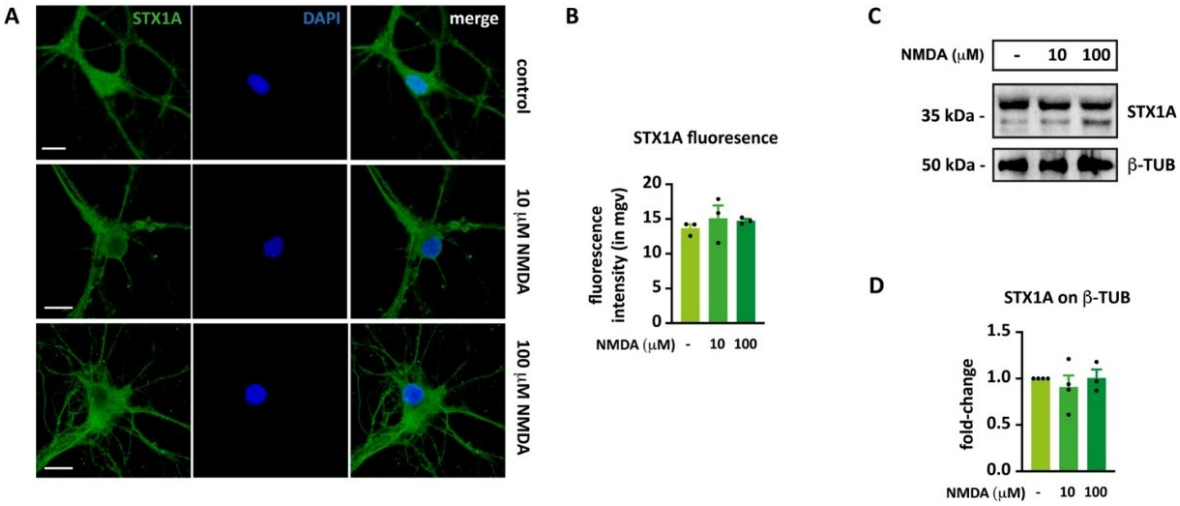


Figura 6. Il trattamento con NMDA non inficia l'espressione di STX1A in neuroni primari di topo. A-B Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza per STX1A. La quantificazione è mostrata in B. **C-D** Western blot rappresentativo per STX1A e β-TUB (loading control) (C). L'analisi densitometrica è mostrata in D. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot.

A differenza di STX1A, in condizioni basali JNK2 era debolmente espressa nel solo soma neuronale. Il trattamento con NMDA ha indotto un aumento dose-dipendente dell'espressione di JNK2 e ne ha promosso la ridistribuzione lungo i prolungamenti neuronali (Fig. 7A-B). Nell'immunoblotting, JNK2 ha mostrato le canoniche bande delle varianti di splicing a ~46 (p46), ~48-49 (p48) e ~51-54 kDa (p54) (Björkblom et al., 2008). La banda a ~51-54 kDa corrisponde all'isoforma alfa 2 (α2) di JNK2, per la quale è nota l'interazione con STX1A (Marcelli et al., 2019). Anche in questo caso, l'espressione di JNK2 è risultata aumentata in seguito alla stimolazione con NMDA (Fig. 7C-D).

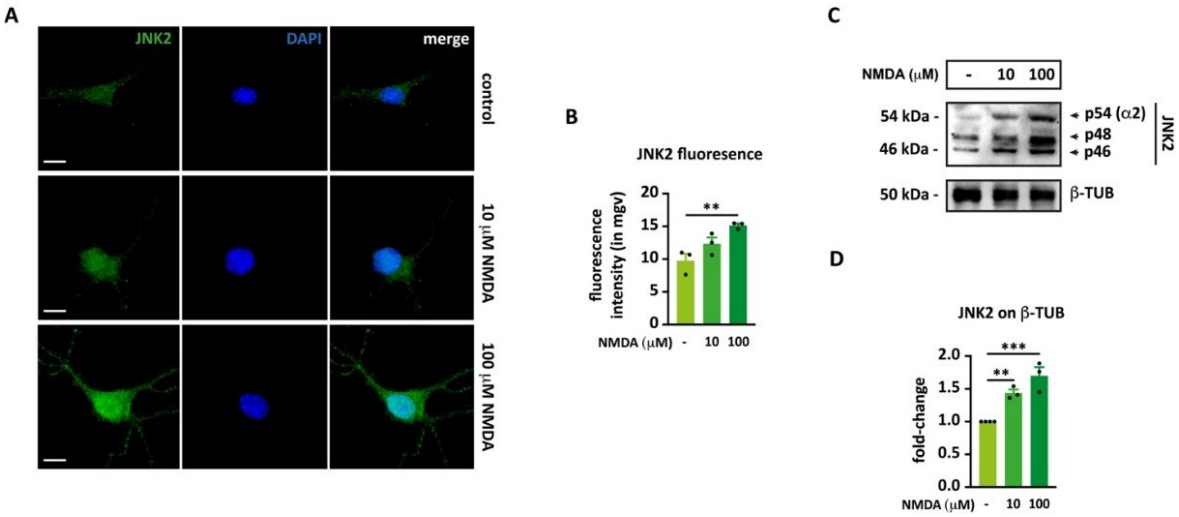


Figura 7. Il trattamento con NMDA induce l'espressione di JNK2 in neuroni primari di topo. A-B Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza per JNK2. La quantificazione è mostrata in B. **C-D** Western blot rappresentativo per JNK2 e β-TUB (loading control) (C). L'analisi densitometrica è mostrata in D. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$.

Per verificare se la stimolazione con NMDA promuovesse l'associazione tra JNK2 e STX1A, è stata eseguita un'analisi di co-immunofluorescenza, la quale ha mostrato che solo l'NMDA alla concentrazione di 100 μM incrementava la co-localizzazione tra le due proteine (Fig. 8A – ingrandimento, frecce bianche). Per quantificare tale co-localizzazione, i prolungamenti neuronali sono stati segmentati ed è stato calcolato l'indice di Pearson mediante strumenti di analisi d'immagine. Il calcolo ha confermato che l'NMDA 100 μM aumenta la co-localizzazione JNK2-STX1A nei prolungamenti neuronali (Fig. 8B). L'interazione JNK2-STX1A è stata evidenziata anche tramite il saggio PLA. In condizioni di controllo sono apparsi alcuni puncta di PLA, suggerendo che le due proteine interagiscono fisiologicamente entro certi limiti; l'NMDA a 10 μM non ha modificato il numero dei puncta di PLA, mentre l'NMDA a 100 μM li ha quasi raddoppiati (Fig. 8C-D).

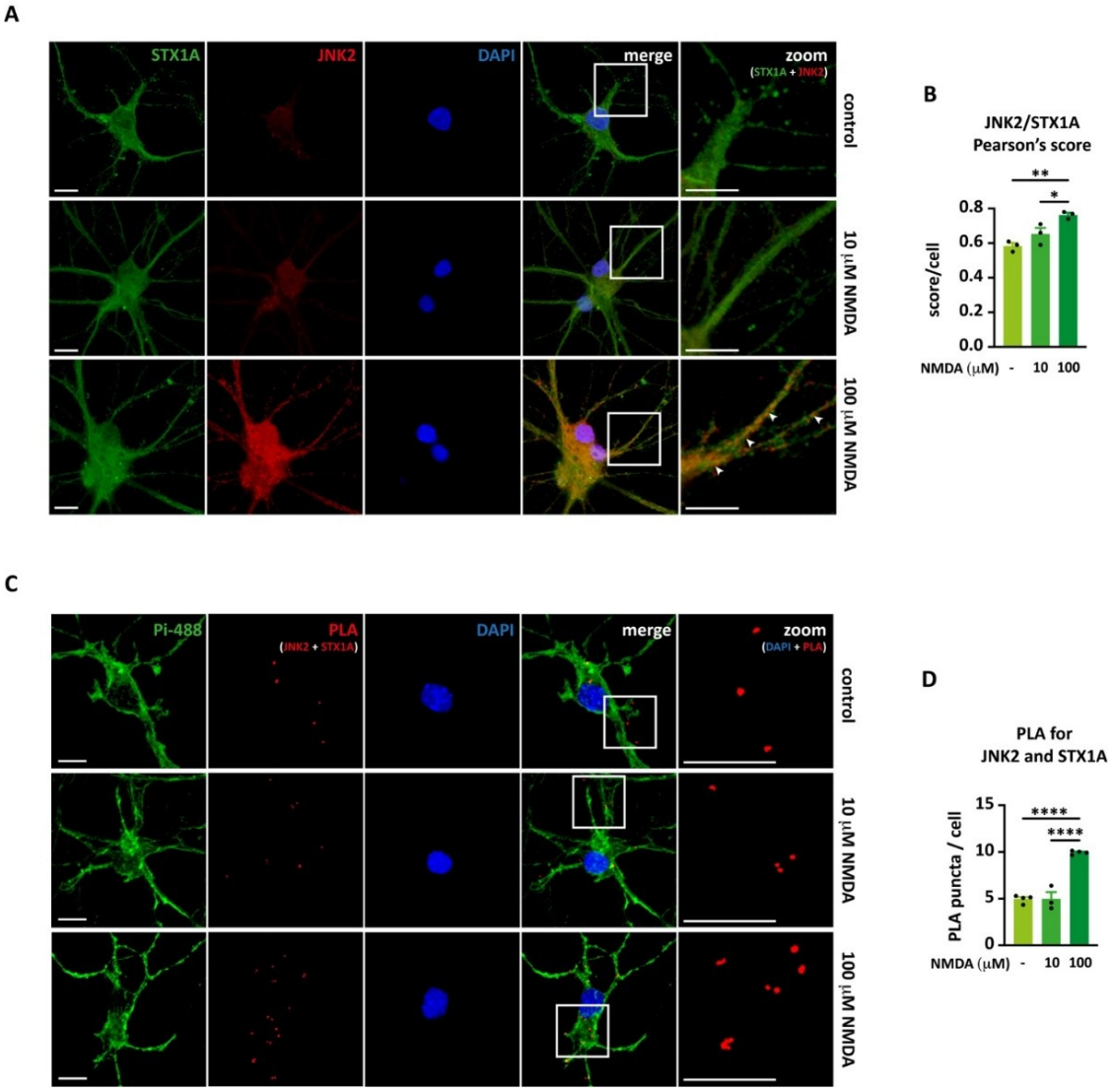


Figura 8. Alte dosi di NMDA favoriscono l'interazione tra JNK2 e STX1A in neuroni primari di topo. A Co-immunofluorescenza rappresentativa per STX1A (verde) e JNK2 (rosso). **B** Calcolo del Pearson's score per JNK2 e STX1A all'interno dei processi neuronali. Lo score è stato calcolato sulle immagini mostrate in A. **C-D** Immagini rappresentative della PLA su neuroni primari (rosso). Il citoscheletro è stato controcolorato con la Pi-488 (verde). La quantifica è mostrata in D. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; **** = $p<0.0001$.

In base al modello nPING, la stimolazione eccitotossica con NMDA innesca l'attivazione di JNK2 e la fosforilazione JNK2-dipendente di STX1A. In accordo con ciò, solo l'NMDA a 100 μM ha aumentato i livelli di STX1A fosforilata (p-STX1A), come mostrato dal Western blot (Fig. 9A-B). Allo stesso modo, l'NMDA a 100 μM ha incrementato anche la fosforilazione di JNK (p-JNK), in particolare dell'isoforma p54 (Fig. 9C-E).

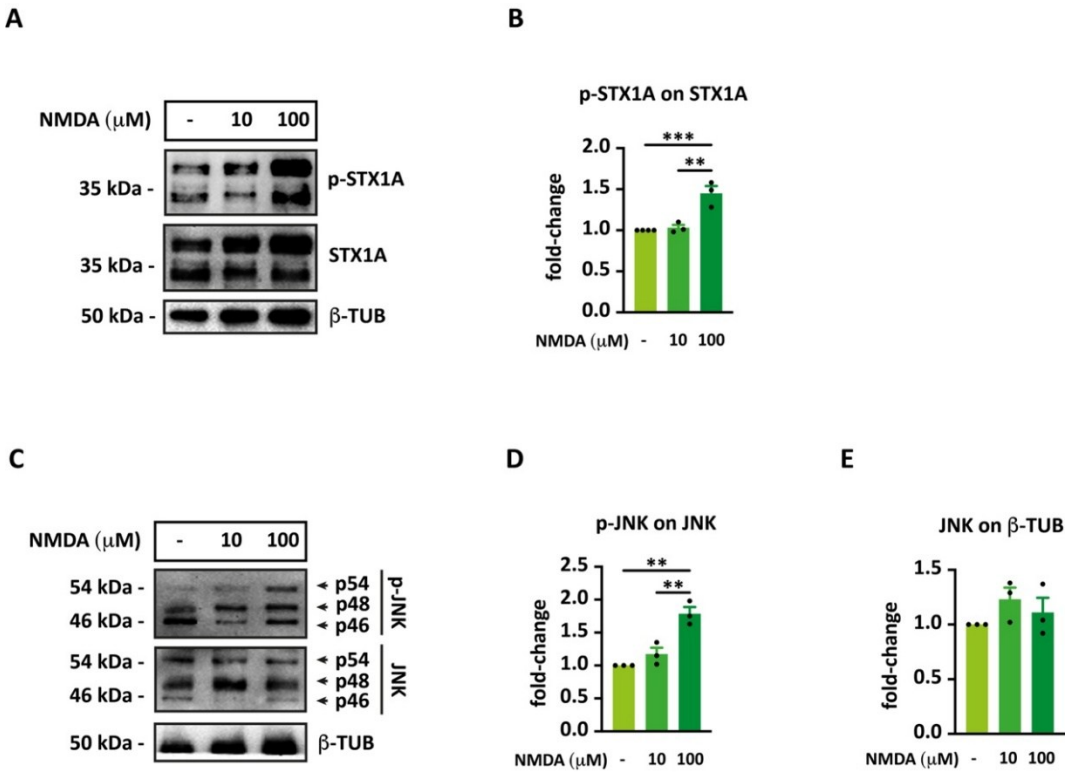


Figura 9. Alte dosi di NMDA inducono l'attivazione di JNK e STX1A nei neuroni murini primari. A-B Western blot rappresentativo per p-STX1A, STX1A e β-TUB (loading control) (A). L'analisi densitometrica di p-STX1A rispetto a STX1A è mostrata in D. **C-E** Western blot rappresentativo per p-JNK, JNK e β-TUB (loading control) (C). L'analisi densitometrica di p-JNK su JNK è mostrata in D, mentre JNK su β-TUB è mostrata in E. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$.

L'upregolazione di p-JNK e p-STX1A è stata confermata anche mediante co-immunofluorescenza, la quale ha anche mostrato come in risposta a stimolazione con l'NMDA a 100 μM l'attivazione delle due proteine aumenti significativamente e che queste co-localizzino nei processi neuronali (Fig. 10A - ingrandimento, frecce bianche), come confermato dal seguente calcolo dell'intensità di fluorescenza e del Pearson's score nei processi neuronali (Fig. 10B-D)

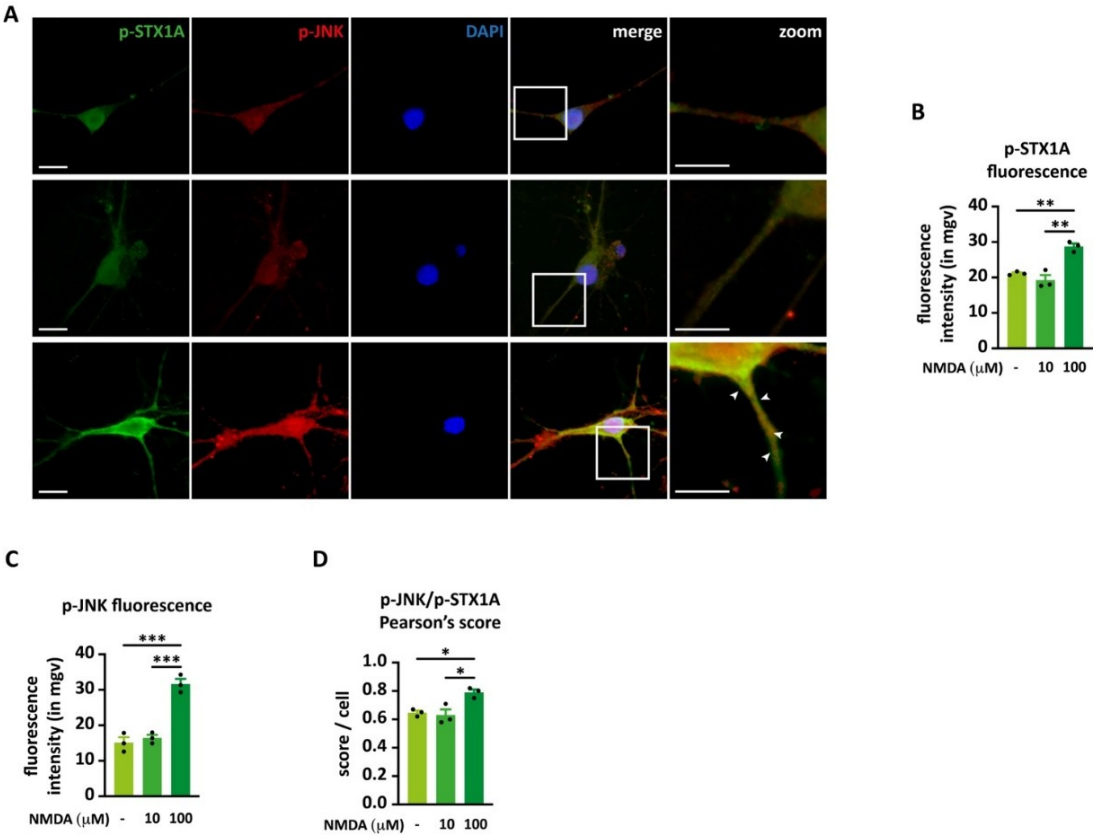


Figura 10. Alte dosi di NMDA favoriscono l'espressione e la co-localizzazione tra p-JNK e p-STX1A. A Co-immunofluorescenza rappresentativa per p-STX1A (verde) e p-JNK (rosso). La quantificazione della fluorescenza di p-STX1A è mostrata in B, quella di p-JNK in C. **D** Calcolo del Pearson's score per p-JNK e p-STX1A all'interno dei processi neuronali. Lo score è stato calcolato sulle immagini mostrate in A. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$.

4.3 La Memantina e JGRi1 proteggono i neuroni primari di topo dall'eccitotossicità NMDA-indotta

Per bloccare l'interazione JNK2/STX1A, è stato sviluppato e validato il peptide cellulo-permeabile chiamato JGRi1. Per valutarne la permeabilità nei neuroni primari, essi sono stati incubati con JGRi1 marcato con fluoresceina (FITC-JGRi1). L'analisi mediante immunofluorescenza ha mostrato che JGRi1 è in grado di penetrare effettivamente all'interno dei neuroni primari. Come controllo, una versione di FITC-JGRi1 priva della sequenza Tat responsabile della permeabilità (ΔTat-FITC-JGRi1) non è stata in grado di penetrare nei neuroni (Fig. 11A).

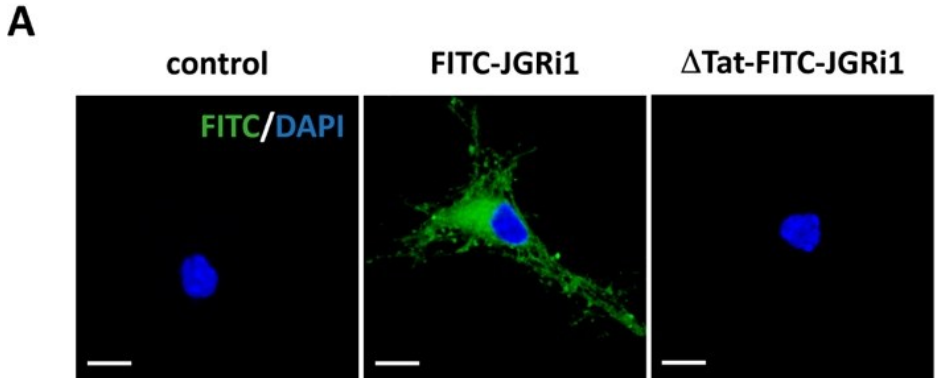


Figura 11. JGRi1 è in grado di penetrare all'interno dei neuroni primari di topo. A Saggio di permeabilità cellulare del FITC-JGRi1 (verde) su neuroni primari. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM.

Successivamente, l'effetto protettivo di JGRi1 contro la tossicità indotta da NMDA 100 μM è stato valutato e confrontato con quello dell'antagonista del recettore NMDA Memantina (Mem). I neuroni sono stati pre-trattati con Mem (20–80 μM, 24 h) o JGRi1 (5–80 μM, 1 h) prima dell'esposizione a NMDA; dopodiché, la vitalità e la morte cellulare sono state analizzate tramite i saggi MTT e LDH. Mem a 40 μM e JGRi1 a 20 μM hanno conferito una neuroprotezione significativa in entrambi i saggi (Fig. 12A-B), pertanto queste concentrazioni sono state selezionate per gli esperimenti successivi.

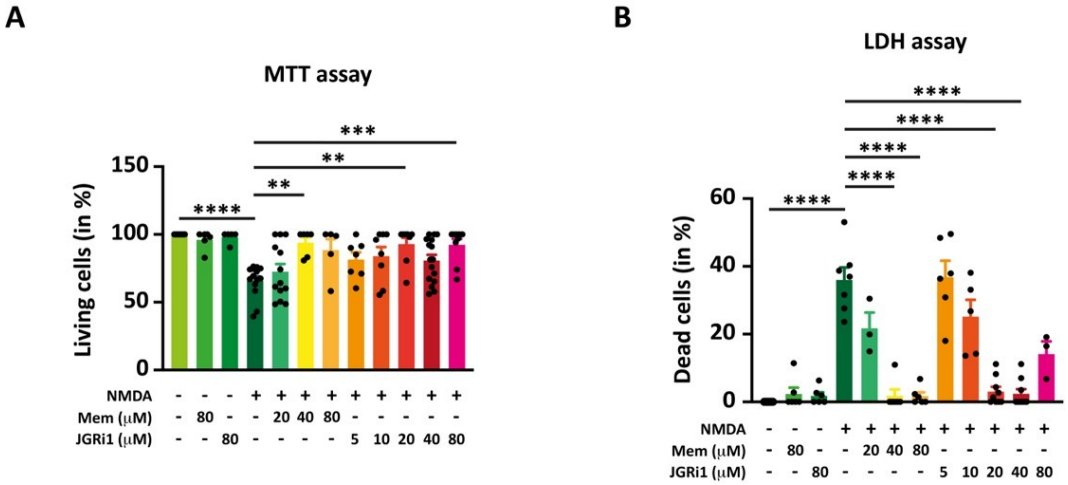


Figura 12. Effetto neuroprottettivo di Mem e JGRi1 a diverse dosi su neuroni primari di topo. A Saggio MTT su neuroni primari. **B** Saggio LDH su neuroni primari. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. ** = p<0.01; *** = p<0.001; **** = p<0.0001.

Mem e JGRi1 hanno evidenziato anche un effetto anti-apoptotico, come mostrato dal saggio TUNEL (Fig. 13A-B). Inoltre, entrambi i trattamenti hanno ridotto l'attivazione di c-CASP3 (Fig. 14C-F) e hanno prevenuto il decremento dell'espressione di BCL-XL indotto da NMDA (Fig. 15G-H).

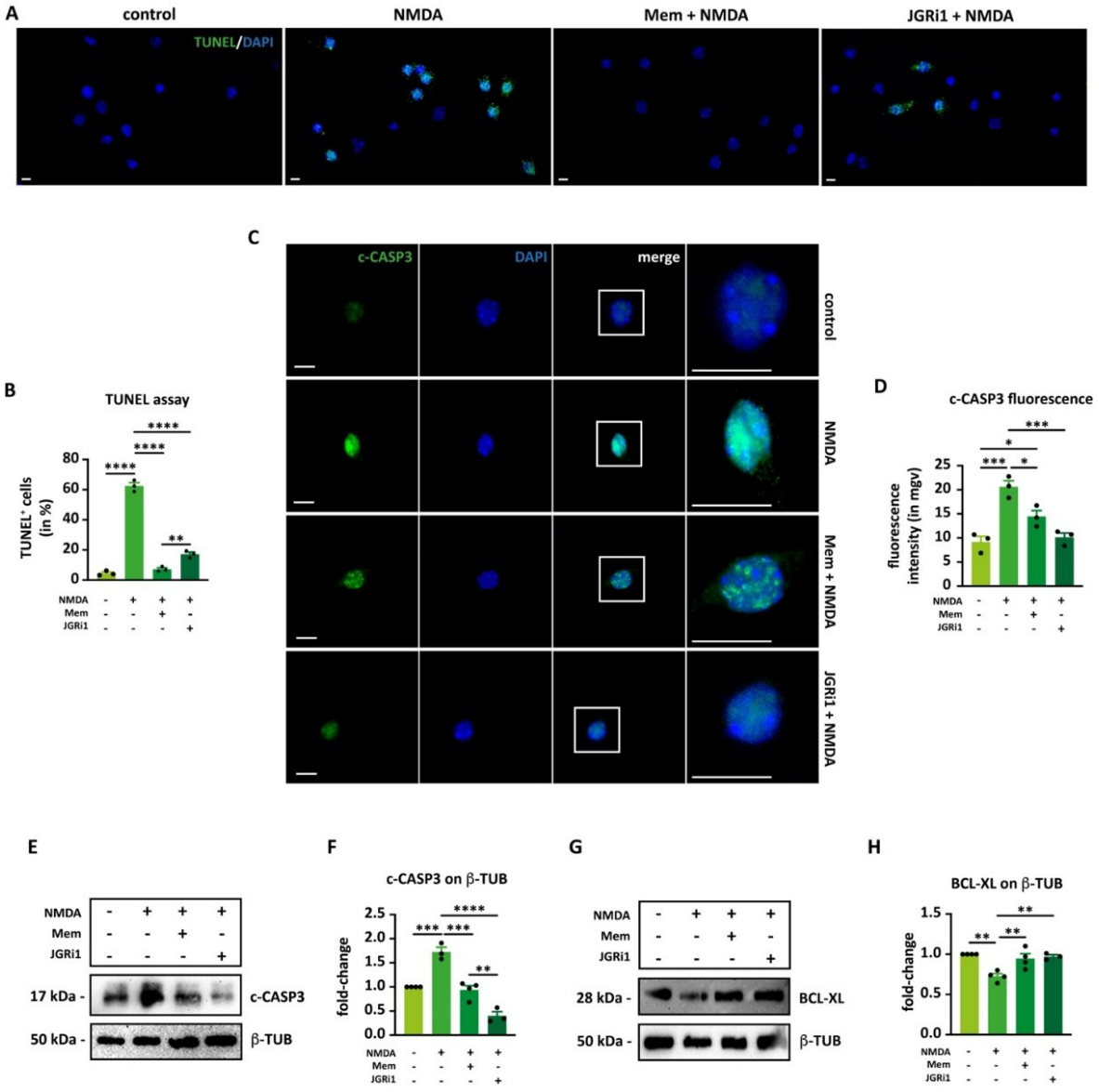


Figura 13. Mem e JGRi1 prevengono l'apoptosi in neuroni primari stimolati con NMDA eccitotossico. **A-B** Immagini rappresentative del saggio TUNEL su neuroni primari (A). La quantificazione è mostrata in B. **C-D** Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza per c-CASP3. La quantificazione è mostrata in D. **E-F** Western blot rappresentativo per c-CASP3 e β-TUB (loading control) (E). L'analisi densitometrica è mostrata in F. **G-H** Western blot rappresentativo per BCL-XL e β-TUB (loading control) (G). L'analisi densitometrica è mostrata in H. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 µM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$; **** = $p<0.0001$.

4.4 Mem e JGRi1 riducono l'interazione JNK2-STX1A indotta da NMDA nei neuroni primari di topo

L'effetto di Mem e JGRi1 su JNK2 e STX1A è stato valutato mediante co-immunofluorescenza. Entrambi i farmaci hanno prevenuto l'up-regolazione di JNK2 indotta da NMDA senza alterare i livelli di STX1A (Fig. 14A-C). È interessante notare che, a differenza della Mem, JGRi1 è stato in grado di ridurre con successo la co-localizzazione tra JNK2 e STX1A, come confermato anche dall'analisi di Pearson (Fig. 14A – ingrandimento, frecce bianche, 14D). In maniera coerente, il saggio PLA ha rivelato una riduzione dei puncta indotti da NMDA unicamente in presenza di JGRi1, e non di Memantina (Fig. 14E-F).

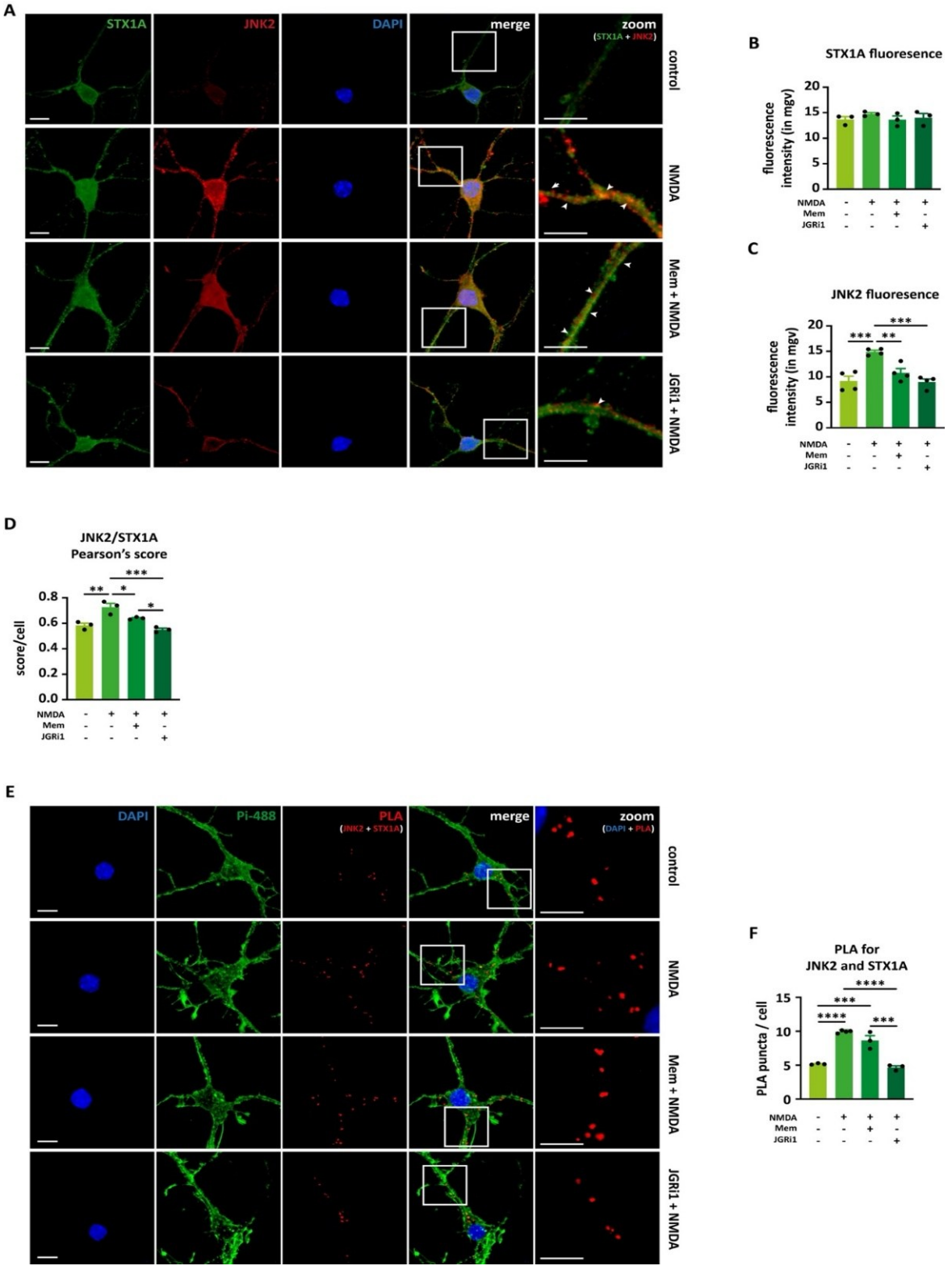


Figura 14. JGRi1, ma non Mem previene l'interazione tra JNK2 e STX1A indotta da NMDA in neuroni primari. A Co-immunofluorescenza rappresentativa per STX1A (verde) e JNK2 (rosso). La quantificazione della fluorescenza di STX1A è mostrata in **B**, quella di JNK2 in **C**. **D** Calcolo del Pearson's score per JNK2 e STX1A all'interno dei processi neuronali. Lo score è stato calcolato sulle immagini mostrate in A. **E-F** Immagini rappresentative della PLA su neuroni primari (rosso). Il citoscheletro è stato controcolorato con la Pi-488 (verde). La quantifica è mostrata in D. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$; **** = $p<0.0001$.

L'analisi di immunoblotting ha confermato questi risultati, mostrando che i livelli di STX1A rimangono invariati a seguito del trattamento (Fig. 15A-B) e che entrambi i composti hanno prevenuto l'aumento dell'espressione di JNK2, in particolare dell'isoforma α2 (Fig. 15C-D).

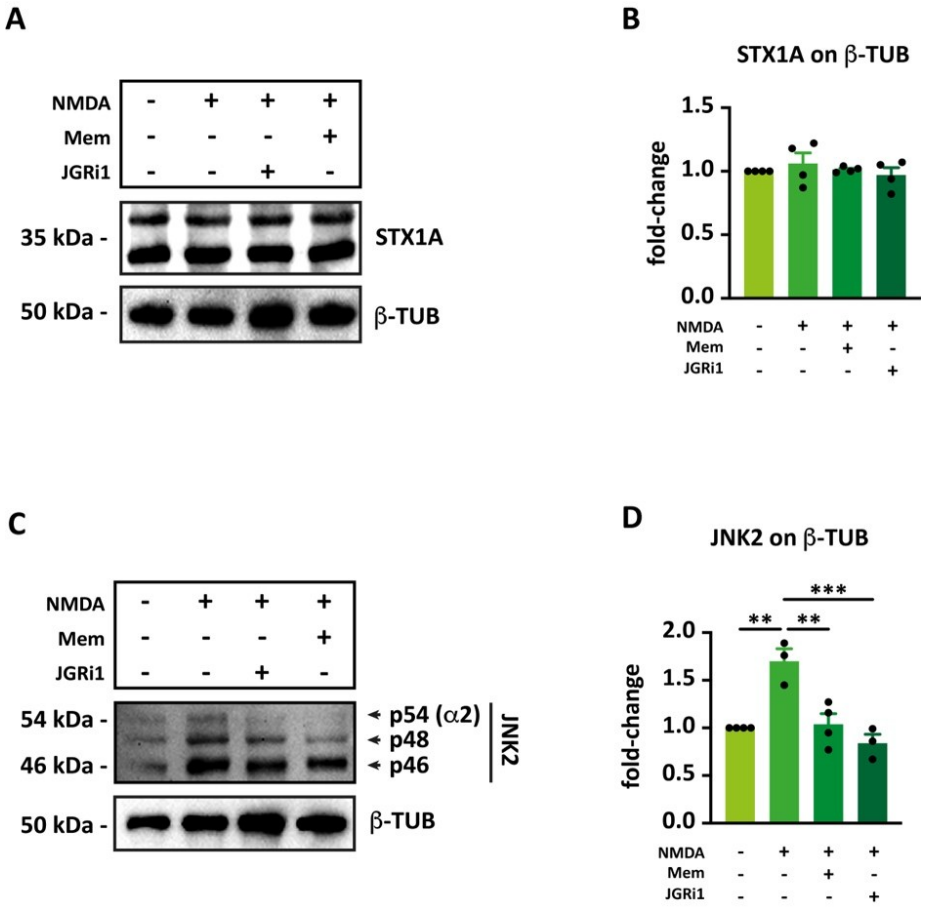


Figura 15. JGRi1 e Mem modificano l'espressione di JNK2, ma non di STX1A, dopo stimolazione con NDMA in neuroni primari di topo. A-B Western blot rappresentativo per STX1A e β-TUB (loading control) (E). L'analisi densitometrica è mostrata in B. **C-D** Western blot rappresentativo per JNK2 e β-TUB (loading control) (G). L'analisi densitometrica è mostrata in D. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$.

Successivamente, è stata valutata l'attivazione di JNK e STX1A. Mem e JGRi1 hanno ridotto la fosforilazione di STX1A promossa da NMDA (Fig. 18A-B), così come quella di JNK (Fig. 18C-E).

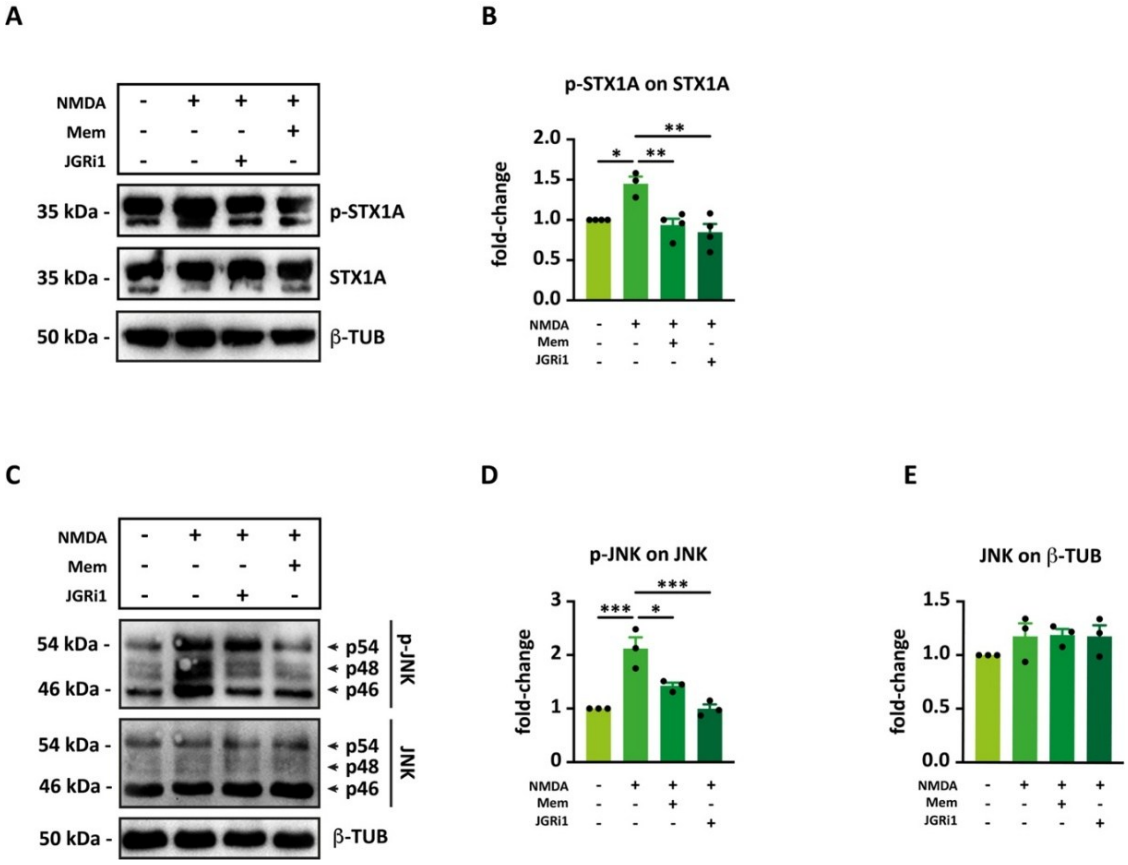


Figura 16. Mem e JGRi1 riducono l'attivazione di JNK e STX1A indotta da NMDA in neuroni primari di topo. A-B Western blot rappresentativo per p-STX1A, STX1A e β-TUB (loading control) (A). L'analisi densitometrica di p-STX1A rispetto a STX1A è mostrata in D. **C-E** Western blot rappresentativo per p-JNK, JNK e β-TUB (loading control) (C). L'analisi densitometrica di p-JNK su JNK è mostrata in D, mentre JNK su β-TUB è mostrata in E. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$.

Analogamente, la co-immunofluorescenza ha mostrato livelli ridotti di p-JNK e p-STX1A in risposta al trattamento (Fig. 19A-C); inoltre, JGRi1 ha ridotto la co-localizzazione tra p-JNK e p-STX1A all'interno dei prolungamenti neuronali, mentre Mem non vi è riuscita (Fig. 17A - ingrandimento, frecce bianche, 17D).

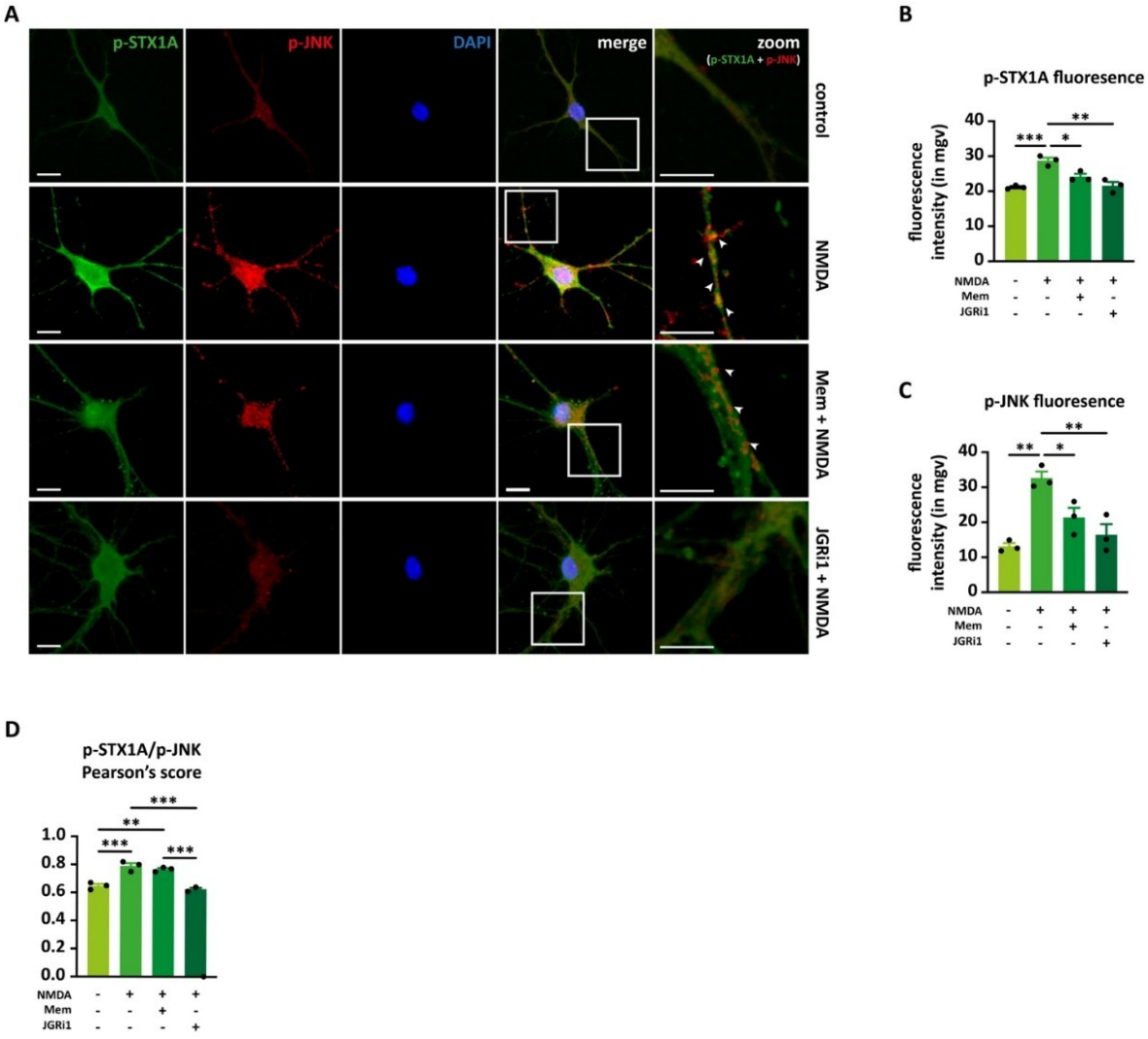


Figura 17. Mem e JGRi1 riducono entrambi l'espressione di p-JNK e p-STX1A, ma agiscono diversamente sulla loro co-localizzazione in neuroni primari. A Co-immunofluorescenza rappresentativa per p-STX1A (verde) e p-JNK (rosso). La quantificazione della fluorescenza di p-STX1A è mostrata in B, quella di p-JNK in C. **D** Calcolo del Pearson's score per p-JNK e p-STX1A all'interno dei processi neuronali. Lo score è stato calcolato sulle immagini mostrate in A. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 µM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$.

4.5 Mem e JGRi1 riducono il tasso di formazione del complesso SNARE e il rilascio di glutammato innescati dalla stimolazione con NMDA nei neuroni primari di topo

Il rilascio dei neurotrasmettitori dipende dall'assemblaggio del complesso SNARE, un processo facilitato dalla fosforilazione di STX1A, che ne aumenta l'interazione con SNAP25 (Risinger and Bennett, 1999).

Poiché sia Mem che JGRi1 hanno ridotto la fosforilazione di STX1A, è stato indagato anche il loro effetto sulla formazione del complesso SNARE. Lisati neuronali non denaturati al calore sono stati analizzati tramite immunoblotting per STX1A, rivelando i complessi SNARE, i quali si sono presentati come degli smear ad alto peso molecolare, nonchè la STX1A libera a ~35 kDa. La quantificazione del rapporto tra STX1A integrata nel complesso SNARE e STX1A libera ha mostrato che l'NMDA ha aumentato la formazione del complesso SNARE, mentre JGRi1 e Mem l'hanno ridotta (Fig. 18A-B).

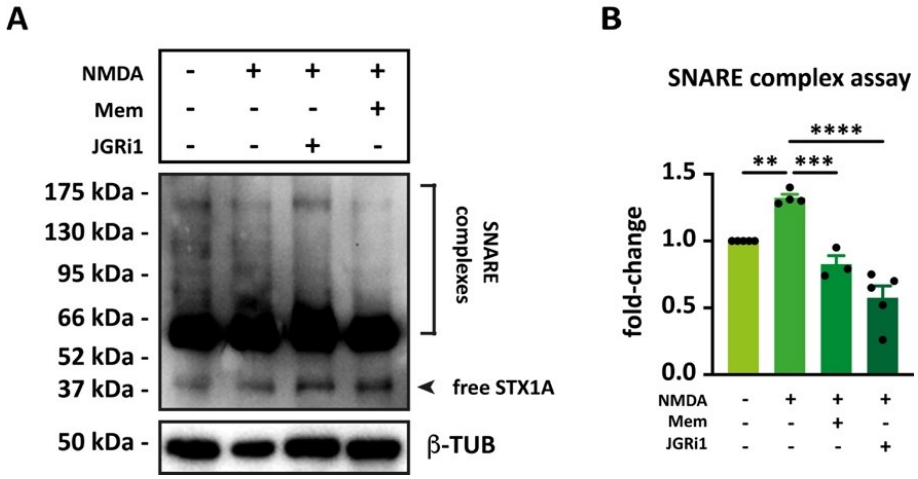


Figura 18. Mem e JGRi1 riducono l'assemblaggio di complessi SNARE indotto da NMDA in neuroni primari di topo. Saggio di formazione del complesso SNARE su neuroni primari. I campioni sono stati blottati per STX1A (SNARE) β-TUB (loading control) (A). L'analisi densitometrica è mostrata in B. ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$; **** = $p<0.0001$.

Per dimostrare che JGRi1, diversamente da Mem, è in grado di inibire il recettore NMDA solo in caso di una sua attivazione aberrante, è stato valutato l'effetto dei due composti su neuroni trattati sia con NMDA 100 μM che con NMDA 10 μM, il quale, come dimostrato in precedenza, non induce eccitotossicità, quindi non attiva nPING. I saggi di rilascio del glutammato hanno mostrato che entrambi i composti sono stati in grado di ridurre secrezione di glutammato nel terreno di coltura quando i neuroni sono stati trattati con NMDA 100 μM. Tuttavia, quando i neuroni sono stati trattati l'NMDA 10 μM, solo Mem è risultata in grado di impedire il rilascio di glutammato, compatibilmente con una incapacità di JGRi1 di funzionare per via di una più debole attivazione del pathway nPING (Fig. 19A-B). Allo stesso modo, entrambi i composti hanno prevenuto la diminuzione dell'immunoreattività intracellulare per l'L-glut indotta dal trattamento dei neuroni con 100 μM NMDA; al

contrario, solo Mem, ma non JGRi1, è stata in grado di preservare l'immunoreattività per L-glut nei neuroni trattati con 10 μM NMDA (Fig. 19C-E).

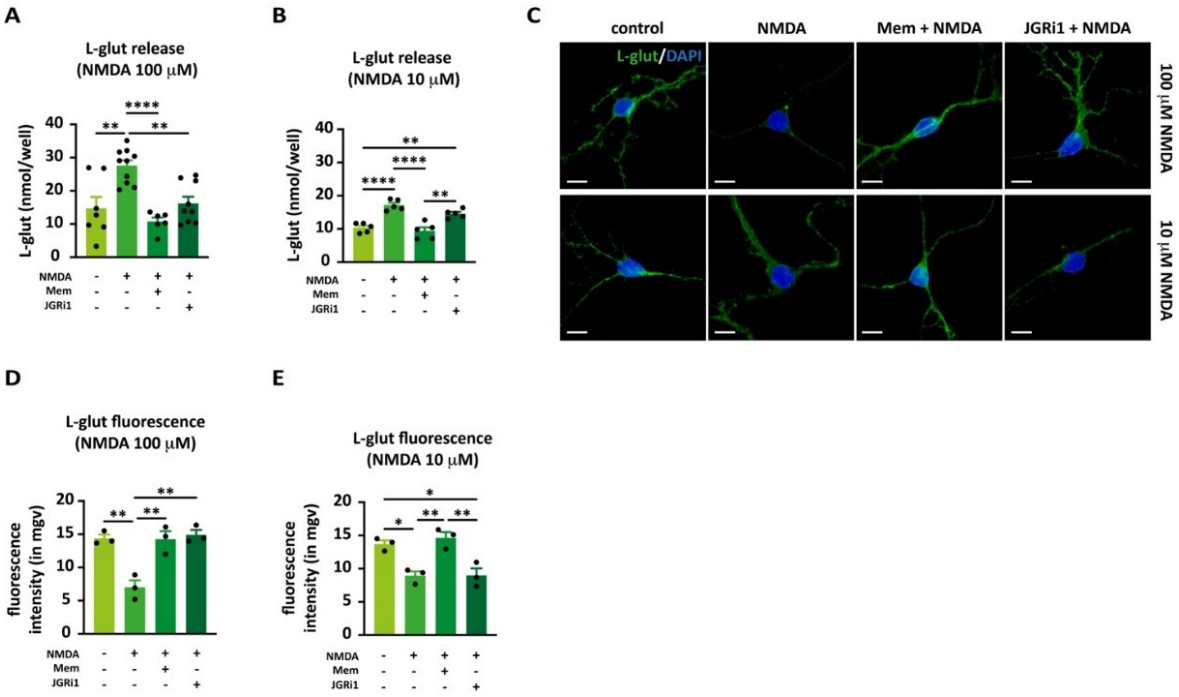


Figura 19. JGRi1, a differenza di Mem, inibisce il rilascio di glutammato indotto solo da NMDA eccitotossico nei neuroni primari di topo. A-B Saggio di rilascio di glutammato su neuroni primari trattati con NMDA 10 μM (A) e NMDA 100 μM (B). **C-E** Immunofluorescenza rappresentativa per L-glut (C). La quantificazione della fluorescenza in neuroni trattati NMDA 10 μM è mostrata in D, mentre quella su neuroni trattati con NMDA 100 μM con è mostrata in D. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001; **** = p<0.0001.

Successivamente, è stato valutato l'effetto dei farmaci sul traffico vescicolare. Il pre-trattamento con Mem o JGRi1 ha ridotto l'internalizzazione di FM1-43 nei neuroni quando questi sono trattati con NMDA 100 μM. Come previsto, quando i neuroni sono stati trattati con NMDA 10 μM, solo Mem, ma non JGRi1, è stata in grado prevenire l'internalizzazione di FM1-43, compatibilmente con una scarsa attivazione di nPING indotta da NMDA 10 μM (Fig. 20A-C).

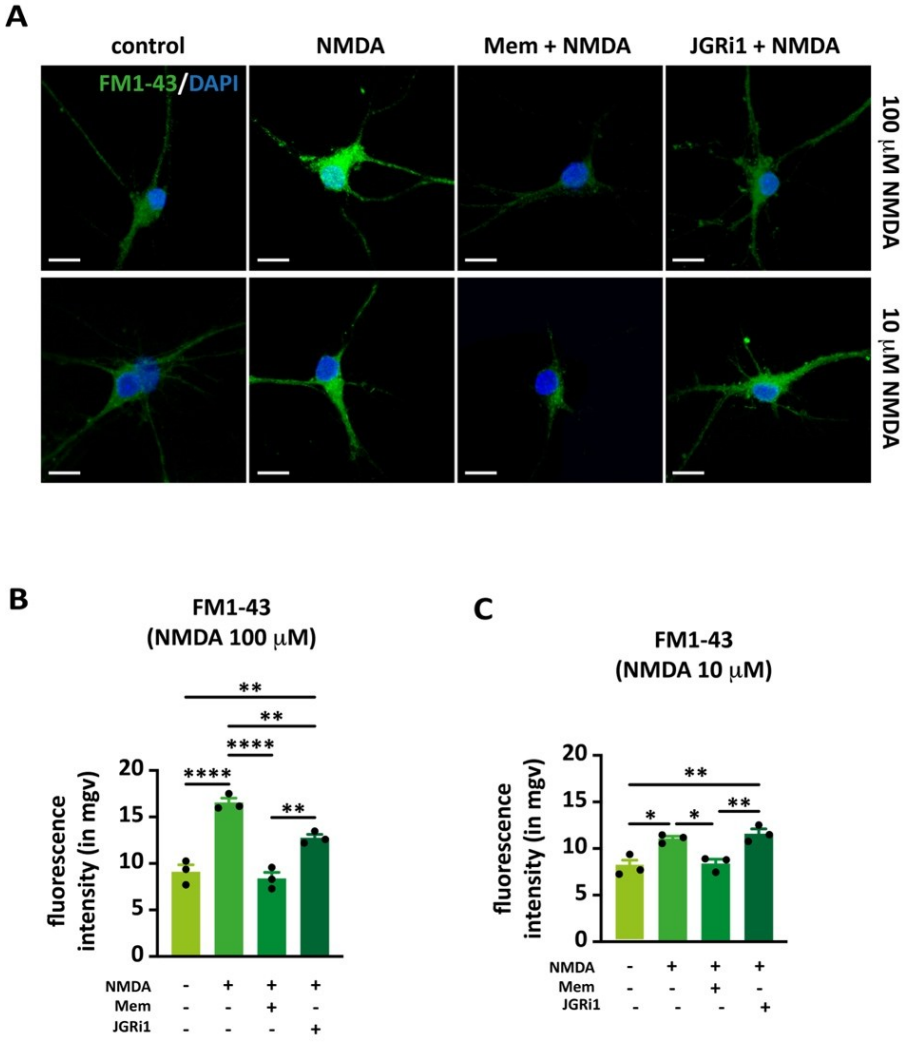


Figura 20. JGRi1, ma non Mem, inibisce il trafficking vescicolare indotto da NMDA 100 μM ma non NMDA 10 μM nei neuroni primari di topo. A-B Immagini rappresentative del saggio con FM1-43. La quantificazione della fluorescenza in neuroni trattati NMDA 10 μM è mostrata in B, mentre quella su neuroni trattati con NMDA 100 μM con è mostrata in C. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 μM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; **** = $p<0.0001$.

4.6 JGRi1, a differenza di Mem, preserva l'afflusso di calcio NMDA-dipendente nei neuroni primari

Poiché i recettori NMDA sono canali ionici, il loro ruolo principale è permettere il flusso di cationi tra l'ambiente extracellulare e il neurone, mediando in particolare l'ingresso di ioni Na^+ e Ca^{2+} e l'uscita di K^+ (Hansen et al., 2018). Pertanto, data l'elevata permeabilità dei NMDAR agli ioni Ca^{2+}, è stata valutata la funzionalità di tali recettori in risposta ai trattamenti con Mem e JGRi1 usando il tracciante Fluo-3/AM. La fluorescenza del Fluo-

3/AM è risultata inferiore nei neuroni pre-trattati con Mem, ma non con JGRi1, in accordo con l'ipotesi che JGRi1 non interferisca con l'ingresso di Ca^{2+} attraverso i recettori NMDA.

Per accertare la sorgente degli ioni Ca^{2+}, sono stati eseguiti trattamenti chelanti con EDTA 1 mM o dantrolene 10 µM per sequestrare gli ioni Ca^{2+} rispettivamente dal compartimento extracellulare e da quello intracellulare. L'EDTA ha ridotto la fluorescenza del Fluo-3/AM in tutte le condizioni (Fig. 4P-Q), mentre il dantrolene ha causato un calo generale del segnale di Ca^{2+} senza però impedire l'aumento del Ca^{2+} indotto da NMDA, il quale è stato abolito solo da Mem. Ciò dimostra che l'ingresso di Ca^{2+} avviene dall'ambiente extracellulare attraverso i recettori NMDA (Fig. 6K-L).

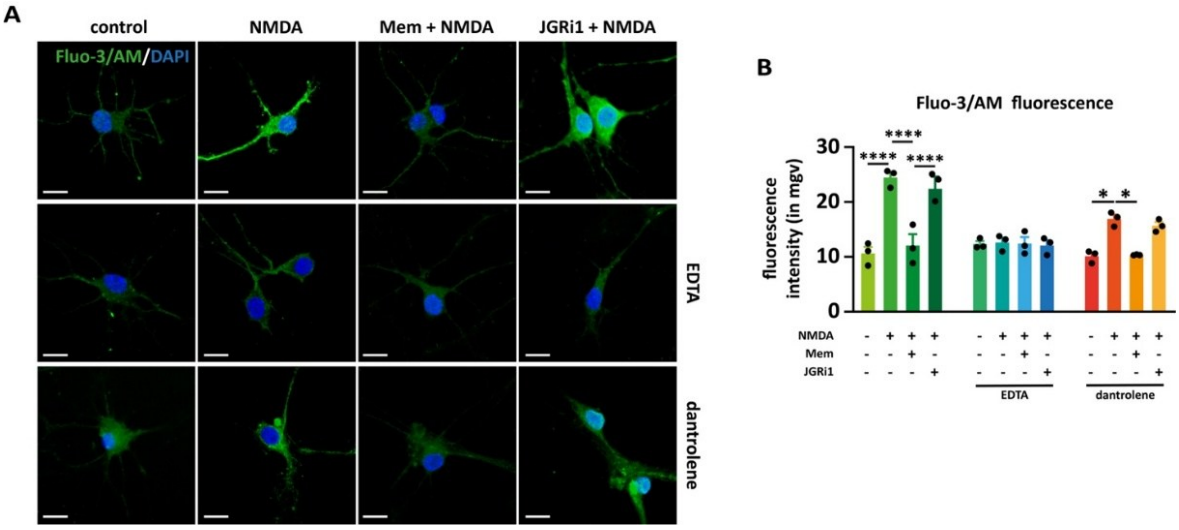


Figura 21. JGRi1, ma non Mem, non impedisce l'afflusso di Ca2+ attraverso il recettore NMDA nei neuroni primari di topo. A-B Immagini rappresentative del saggio con Fluo-3/AM. La quantificazione della fluorescenza è mostrata in B. **Immunofluorescenza:** Ingrandimento 63X, scale bar 10 µM. **Grafici:** media ± s.e.m. I singoli n per ogni condizione sperimentale sono mostrati nello scatter plot. * = $p<0.05$; **** = $p<0.0001$.

CAPITOLO 5

5. Conclusioni

L'eccitotossicità è stata a lungo concettualizzata come un fenomeno ampiamente postsinaptico guidato da una sostenuta attivazione dei post-NMDAR e da un sovraccarico di Ca^{2+}, con un successivo coinvolgimento delle vie apoptotiche e ossidative (Choi, 1988). In parallelo, crescenti evidenze supportano un contributo presinaptico in cui l'aumento della probabilità di rilascio e lo *spillover* di glutammato esacerbano ulteriormente l'attivazione recettoriale. In effetti, i nostri lavori precedenti suggerivano l'esistenza di un'interazione tra la cascata degli NMDAR e la via delle MAPK tramite l'attivazione selettiva di JNK2. JNK2 attivata fosforila STX1A, aumentando così il rilascio di vescicole contenenti glutammato e stabilendo un circuito a feedback positivo in cui il glutammato esacerba il proprio rilascio. Tale meccanismo è stato denominato nPING.

Questo lavoro di tesi fornisce evidenze su neuroni murini primari evidenziando come la stimolazione eccitotossica con NMDA attivi un meccanismo presinaptico autoamplificante che determina un rilascio eccessivo di glutammato. Nei neuroni corticali maturi, l'NMDA eccitotossico (100 μM) induce un considerevole afflusso di Ca^{2+} all'interno del neurone, promuove l'apoptosi, aumenta il traffico vescicolare e promuove il rilascio del glutammato nell'ambiente extracellulare. Questi effetti sono stati accompagnati da un'aumentata espressione di JNK2, da una maggiore interazione tra JNK2 e STX1A, da un'elevata fosforilazione di entrambe le proteine e da un maggiore assemblaggio del complesso SNARE. Tutti questi eventi insieme sono delle valide firme molecolari coerenti con l'attivazione di nPING. È importante inoltre sottolineare che i nostri dati mostrano che una certa interazione JNK2-STX1A è rilevabile sia in assenza sia con una stimolazione con NMDA a dosi non eccitotossiche (10 μM). Sebbene, sulla base di queste evidenze, possa sembrare plausibile pensare che nPING possa essere attivato anche in queste condizioni, l'assenza di una fosforilazione significativa di entrambe le proteine esclude chiaramente questa opzione. Ad ogni modo, non si può escludere che l'interazione tra le due proteine non fosforilate possa in qualche modo contribuire al rilascio fisiologico di glutammato.

JGRi1 rappresenta un inibitore molecolare di nPING. Sia Mem che JGRi1 attenuano le firme eccitotossiche presinaptiche, riducono lo *spillover* di glutammato e proteggono i neuroni dalla tossicità indotta da NMDA. Tuttavia, essi hanno mostrato un effetto diverso sulla

funzionalità degli NMDAR: Mem blocca l'afflusso di Ca^{2+} evocato da NMDA nei neuroni, coerentemente con un'inibizione recettoriale diretta, mentre JGRi1 preserva l'ingresso di Ca^{2+} NMDAR-dipendente, pur modulando il traffico vescicolare, l'assemblaggio dei complessi SNARE e il rilascio di glutammato.

Questa separazione degli effetti supporta un modello in cui JGRi1 agisce a valle dell'apertura del recettore per smorzare selettivamente il circuito di amplificazione presinaptico patologico, piuttosto che spegnere indistintamente la via di segnalazione degli NMDAR. Tale evidenza è particolarmente convincente soprattutto per le sue implicazioni terapeutiche: essendo Mem un antagonista non selettivo degli NMDAR, essa spegne completamente il tono glutammatergico del SNC; JGRi1, d'altra parte, non intacca i recettori NMDA postsinaptici, preservando così la neurotrasmissione glutammatergica fisiologica.

In sintesi, i nostri risultati supportano una strategia terapeutica in cui l'amplificazione patologica del glutammato viene separata dalla via di segnalazione fisiologica degli NMDAR mediante il bersagliamento di un modulo effettore presinaptico JNK2–STX1A, offrendo un mezzo potenziale per mitigare il danno eccitotossico evitando al contempo i limiti dell'antagonismo globale degli NMDAR.

BIBLIOGRAFIA

Andersen, J.V., 2025. The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle: Insights, Updates, and Advances. J. Neurochem. 169, e70029. https://doi.org/10.1111/jnc.70029

Andersen, J.V., Markussen, K.H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., Rosenberg, P.A., Aldana, B.I., 2021. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. Neuropharmacology 196, 108719. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719

Barker-Haliski, M., White, H.S., 2015. Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 5, a022863. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022863

Barr, R.K., Bogoyevitch, M.A., 2001. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). Int. J. Biochem. Cell Biol. 33, 1047–1063. https://doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00093-0

Beaudoin, G.M.J., Lee, S.-H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y.-G., Reichardt, L.F., Arikkath, J., 2012. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. Nat. Protoc. 7, 1741–1754. https://doi.org/10.1038/nprot.2012.099

Bhai, S., Levine, T., Moore, D., Bowser, R., Heim, A.J., Walsh, M., Shibani, A., Simmons, Z., Grogan, J., Goyal, N.A., Govindarajan, R., Hussain, Y., Papsdorf, T., Schwasinger-Schmidt, T., Olney, N., Goslin, K., Pulley, M., Kasarskis, E., Weiss, M., Katz, S.W., Moser, S., Jabari, D., Jawdat, O., Statland, J., Dimachkie, M.M., Barohn, R., Neuromuscular Study Group and Western ALS Consortium Memantine ALS Study Group, 2025. A 40-week phase 2B randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study evaluating the safety and efficacy of memantine in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 71, 63–72. https://doi.org/10.1002/mus.28287

Björkblom, B., Vainio, J.C., Hongisto, V., Herdegen, T., Courtney, M.J., Coffey, E.T., 2008. All JNKs can kill, but nuclear localization is critical for neuronal death. J. Biol. Chem. 283, 19704–19713. https://doi.org/10.1074/jbc.M707744200

Braun, I., Genius, J., Grunze, H., Bender, A., Möller, H.-J., Rujescu, D., 2007. Alterations of hippocampal and prefrontal GABAergic interneurons in an animal model of psychosis induced by NMDA receptor antagonism. Schizophr. Res. 97, 254–263. https://doi.org/10.1016/j.schres.2007.05.005

Capirossi, C., Laiso, A., Renieri, L., Capasso, F., Limbucci, N., 2023. Epidemiology, organization, diagnosis and treatment of acute ischemic stroke. Eur. J. Radiol. Open 11, 100527. https://doi.org/10.1016/j.ejro.2023.100527

Capó, T., Rebassa, J.B., Raïch, I., Lillo, J., Badia, P., Navarro, G., Reyes-Resina, I., 2025. Future Perspectives of NMDAR in CNS Disorders. Molecules 30, 877. https://doi.org/10.3390/molecules30040877

Centeno, C., Repici, M., Chatton, J.-Y., Riederer, B.M., Bonny, C., Nicod, P., Price, M., Clarke, P.G.H., Papa, S., Franzoso, G., Borsello, T., 2007. Role of the JNK pathway in NMDA-mediated excitotoxicity of cortical neurons. Cell Death Differ. 14, 240–253. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401988

Chapman, E.R., 2002. Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 498–508. https://doi.org/10.1038/nrm855

Chen, X.-Q., Mobley, W.C., 2019. Alzheimer Disease Pathogenesis: Insights From Molecular and Cellular Biology Studies of Oligomeric Aβ and Tau Species. Front. Neurosci. 13, 659. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00659

Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron 1, 623–634. https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90162-6

Cimino, M., Feligioni, M., 2024. The selective disruption of the JNK2/Syntaxin-1A interaction by JGRi1 protects against NMDA-evoked toxicity in SH-SY5Y cells. Neurochem. Int. 179, 105824. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105824

Cimino, M., Serkiz, J., Konstantopoulos, J.K., Tisi, A., Cappelletti, P., Maccarrone, R., Sappington, R.M., Feligioni, M., 2026. Topical eye treatment with JGRi1, a protein/protein interaction inhibitor, mitigates retinal degeneration. Cell Death Dis. 17, 504. https://doi.org/10.1038/s41419-026-08717-x

Crupi, R., Impellizzeri, D., Cuzzocrea, S., 2019. Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. Front. Mol. Neurosci. 12, 20. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00020

Das, S., Mccloskey, K., Nepal, B., Kortagere, S., 2025. EAAT2 Activation Regulates Glutamate Excitotoxicity and Reduces Impulsivity in a Rodent Model of Parkinson's Disease. Mol. Neurobiol. 62, 5787–5803. https://doi.org/10.1007/s12035-024-04644-0

Davis, S., Butcher, S.P., Morris, R.G., 1992. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 12, 21–34. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-01-00021.1992

Di Maio, V., 2021. The glutamatergic synapse: a complex machinery for information processing. Cogn. Neurodyn. 15, 757–781. https://doi.org/10.1007/s11571-021-09679-w

Doble, A., 1996. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. Neurology, 47(6 Suppl 4), S233–S241. https://doi.org/10.1212/wnl.47.6_suppl_4.233s

Dong, X., Wang, Y., Qin, Z., 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacol. Sin. 30, 379–387. https://doi.org/10.1038/aps.2009.24

Eriksen, J., Li, F., Edwards, R.H., 2020. The Mechanism and Regulation of Vesicular Glutamate Transport: Coordination with the Synaptic Vesicle Cycle. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1862, 183259. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183259

Francis, F., Chettri, D., Nair, D., 2025. AMPA receptors in the evolving synapse: structure, function, and disease implications. Front. Synaptic Neurosci. 17, 1661342. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2025.1661342

Gangwar, S.P., Yelshanskaya, M.V., Yen, L.Y., Newton, T.P., Sobolevsky, A.I., 2025. Structure and gating of kainate receptors. Front. Pharmacol. 16, 1662316. https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1662316

Generali, J.A., Cada, D.J., 2014. Amantadine: multiple sclerosis-related fatigue. Hosp. Pharm. 49, 710–712. https://doi.org/10.1310/hpj4908-710

Ghasemi, N., Razavi, S., Nikzad, E., 2017. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. Cell J. 19, 1–10. https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4867

Green, J.L., Dos Santos, W.F., Fontana, A.C.K., 2021. Role of glutamate excitotoxicity and glutamate transporter EAAT2 in epilepsy: Opportunities for novel therapeutics development. Biochem. Pharmacol. 193, 114786. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114786

Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Furukawa, H., Wollmuth, L.P., Gibb, A.J., Traynelis, S.F., 2018. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. J. Gen. Physiol. 150, 1081–1105. https://doi.org/10.1085/jgp.201812032

Heinonen, O., Soininen, H., Sorvari, H., Kosunen, O., Paljärvi, L., Koivisto, E., Riekkinen, P.J., 1995. Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. Neuroscience 64, 375–384. https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00422-2

Huang, Y., Xi, J., Su, B., Wang, P., Xie, C., Yuan, Y., Yin, X., Bao, B., 2026. Syntaxin1A in synaptopathies: From molecular mechanisms to therapeutic implications in neurological disorders (Review). Biomed. Rep. 24, 65. https://doi.org/10.3892/br.2026.2138

Hung, C.-Y., Covasa, M., Ritter, R.C., Burns, G.A., 2006. Hindbrain administration of NMDA receptor antagonist AP-5 increases food intake in the rat. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 290, R642-651. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00641.2005

Johnson, J.W., Kotermanski, S.E., 2006. Mechanism of action of memantine. Curr. Opin. Pharmacol. 6, 61–67. https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.09.007

Julio-Pieper, M., Flor, P.J., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2011. Exciting times beyond the brain: metabotropic glutamate receptors in peripheral and non-neural tissues. Pharmacol. Rev. 63, 35–58. https://doi.org/10.1124/pr.110.004036

Jv, A., Kh, M., E, J., A, S., Hs, W., Pa, R., Bi, A., 2021. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. Neuropharmacology 196. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719

Kamalova, A., Nakagawa, T., 2021. AMPA receptor structure and auxiliary subunits. J. Physiol. 599, 453–469. https://doi.org/10.1113/JP278701

Kennedy, N.J., Martin, G., Ehrhardt, A.G., Cavanagh-Kyros, J., Kuan, C.-Y., Rakic, P., Flavell, R.A., Treistman, S.N., Davis, R.J., 2007. Requirement of JIP scaffold proteins for NMDA-mediated signal transduction. Genes Dev. 21, 2336–2346. https://doi.org/10.1101/gad.1563107

Khvotchev, M., Dulubova, I., Sun, J., Dai, H., Rizo, J., Südhof, T.C., 2007. Dual modes of Munc18-1/SNARE interactions are coupled by functionally critical binding to syntaxin-1 N terminus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 27, 12147–12155. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3655-07.2007

Kocaeli, H., Korfali, E., Oztürk, H., Kahveci, N., Yilmazlar, S., 2005. MK-801 improves neurological and histological outcomes after spinal cord ischemia induced by transient aortic cross-clipping in rats. Surg. Neurol. 64 Suppl 2, S22-26; discussion S27. https://doi.org/10.1016/j.surneu.2005.07.034

Kostic, M., Zivkovic, N., Stojanovic, I., 2013. Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity. Rev. Neurosci. 24, 71–88. https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0062

Krieger, J., Bahar, I., Greger, I.H., 2015. Structure, Dynamics, and Allosteric Potential of Ionotropic Glutamate Receptor N-Terminal Domains. Biophys. J. 109, 1136–1148. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.061

Lebrun, F., Levard, D., Lemarchand, E., Yetim, M., Furon, J., Potzeha, F., Marie, P., Lesept, F., Blanc, M., Haelewyn, B., Rubio, M., Letourneur, A., Violle, N., Orset, C., Vivien, D., 2024. Improving stroke outcomes in hyperglycemic mice by modulating tPA/NMDAR signaling to reduce inflammation and hemorrhages. Blood Adv. 8, 1330–1344. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023011744

Lerma, J., 2003. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. Nat. Rev. Neurosci. 4, 481–495. https://doi.org/10.1038/nrn1118

Lisman, J., Yasuda, R., Raghavachari, S., 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. Nat. Rev. Neurosci. 13, 169–182. https://doi.org/10.1038/nrn3192

Madara, J.C., Levine, E.S., 2008. Presynaptic and postsynaptic NMDA receptors mediate distinct effects of brain-derived neurotrophic factor on synaptic transmission. J. Neurophysiol. 100, 3175–3184. https://doi.org/10.1152/jn.90880.2008

Maiti, P., Manna, J., Dunbar, G.L., 2017. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. Transl. Neurodegener. 6, 28. https://doi.org/10.1186/s40035-017-0099-z

Malarkey, E.B., Parpura, V., 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. Neurochem. Int. 52, 142–154. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.005

Marcelli, S., Iannuzzi, F., Ficulle, E., Mango, D., Pieraccini, S., Pellegrino, S., Corbo, M., Sironi, M., Pittaluga, A., Nisticò, R., Feligioni, M., 2019. The selective disruption of presynaptic JNK2/STX1a interaction reduces NMDA receptor-dependent glutamate release. Sci. Rep. 9, 7146. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43709-2

Marmol, S., Feldman, M., Singer, C., Margolesky, J., 2021. Amantadine Revisited: A Contender for Initial Treatment in Parkinson's Disease? CNS Drugs 35, 1141–1152. https://doi.org/10.1007/s40263-021-00862-5

Mathis, S., Couratier, P., Julian, A., Corcia, P., Le Masson, G., 2017. Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. Neural Regen. Res. 12, 181–184. https://doi.org/10.4103/1673-5374.200794

Mehra, A., Guérit, S., Macrez, R., Gosselet, F., Sevin, E., Lebas, H., Maubert, E., De Vries, H.E., Bardou, I., Vivien, D., Docagne, F., 2020. Nonionotropic Action of Endothelial NMDA Receptors on Blood-Brain Barrier Permeability via Rho/ROCK-Mediated Phosphorylation of Myosin. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 40, 1778–1787. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019

Mukhin, A.G., Ivanova, S.A., Knoblach, S.M., Faden, A.I., 1997. New in vitro model of traumatic neuronal injury: evaluation of secondary injury and glutamate receptor-mediated neurotoxicity. J. Neurotrauma 14, 651–663. https://doi.org/10.1089/neu.1997.14.651

Nisticò, R., Florenzano, F., Mango, D., Ferraina, C., Grilli, M., Di Prisco, S., Nobili, A., Saccucci, S., D'Amelio, M., Morbin, M., Marchi, M., Mercuri, N.B., Davis, R.J., Pittaluga, A., Feligioni, M., 2015. Presynaptic c-Jun N-terminal Kinase 2 regulates NMDA receptor-dependent glutamate release. Sci. Rep. 5, 9035. https://doi.org/10.1038/srep09035

Niswender, C.M., Conn, P.J., 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 50, 295–322. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533

Palazzo, E., Boccella, S., Marabese, I., Pierretti, G., Guida, F., Maione, S., 2020. The Cold Case of Metabotropic Glutamate Receptor 6: Unjust Detention in the Retina? Curr. Neuropharmacol. 18, 120–125. https://doi.org/10.2174/1570159X17666191001141849

Perego, C., Vanoni, C., Bossi, M., Massari, S., Basudev, H., Longhi, R., Pietrini, G., 2000. The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. J. Neurochem. 75, 1076–1084. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751076.x

Pitt, D., Nagelmeier, I.E., Wilson, H.C., Raine, C.S., 2003. Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. Neurology 61, 1113–1120. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000090564.88719.37

Pribish, A., Wood, N., Kalava, A., 2020. A Review of Nonanesthetic Uses of Ketamine. Anesthesiol. Res. Pract. 2020, 5798285. https://doi.org/10.1155/2020/5798285

Ramakrishnan, N.A., Drescher, M.J., Drescher, D.G., 2012. The SNARE complex in neuronal and sensory cells. Mol. Cell. Neurosci. 50, 58–69. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.03.009

Risinger, C., Bennett, M.K., 1999. Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms. J. Neurochem. 72, 614–624. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720614.x

Rosenblum, L.T., Trotti, D., 2017. EAAT2 and the Molecular Signature of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Adv. Neurobiol. 16, 117–136. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55769-4_6

Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., Coyle, J.T., 1990. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. 28, 18–25. https://doi.org/10.1002/ana.410280106

Roy, J., Minotti, S., Dong, L., Figlewicz, D.A., Durham, H.D., 1998. Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in motor neurons by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 18, 9673–9684. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09673.1998

Shariff, S., Nouh, H.A., Inshutiyimana, S., Kachouh, C., Abdelwahab, M.M., Nazir, A., Wojtara, M., Uwishema, O., 2024. Advances in understanding the pathogenesis of epilepsy: Unraveling the molecular mechanisms: A cross-sectional study. Health Sci. Rep. 7, e1896. https://doi.org/10.1002/hsr2.1896

Shi, L., Kümmel, D., Coleman, J., Melia, T.J., Giraudo, C.G., 2011. Dual roles of Munc18-1 rely on distinct binding modes of the central cavity with Stx1A and SNARE complex. Mol. Biol. Cell 22, 4150–4160. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0150

Suryavanshi, P.S., Ugale, R.R., Yilmazer-Hanke, D., Stairs, D.J., Dravid, S.M., 2014. GluN2C/GluN2D subunit-selective NMDA receptor potentiator CIQ reverses MK-801-induced impairment in prepulse inhibition and working memory in Y-maze test in mice. Br. J. Pharmacol. 171, 799–809. https://doi.org/10.1111/bph.12518

Sutton, R.B., Davletov, B.A., Berghuis, A.M., Südhof, T.C., Sprang, S.R., 1995. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca^{2+}/phospholipid-binding fold. Cell 80, 929–938. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90290-2

Szydlowska, K., Tymianski, M., 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. Cell Calcium 47, 122–129. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.01.003

Takano, T., Kang, J., Jaiswal, J.K., Simon, S.M., Lin, J.H.-C., Yu, Y., Li, Y., Yang, J., Dienel, G., Zielke, H.R., Nedergaard, M., 2005. Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 16466–16471. https://doi.org/10.1073/pnas.0506382102

Tang, B.-C., Wang, Y.-T., Ren, J., 2023. Basic information about memantine and its treatment of Alzheimer's disease and other clinical applications. Ibrain 9, 340–348. https://doi.org/10.1002/ibra.12098

Taylor, C.P., Traynelis, S.F., Siffert, J., Pope, L.E., Matsumoto, R.R., 2016. Pharmacology of dextromethorphan: Relevance to dextromethorphan/quinidine (Nuedexta®) clinical use. Pharmacol. Ther. 164, 170–182. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.010

Tonkiss, J., Rawlins, J.N., 1991. The competitive NMDA antagonist AP5, but not the non-competitive antagonist MK801, induces a delay-related impairment in spatial working memory in rats. Exp. Brain Res. 85, 349–358. https://doi.org/10.1007/BF00229412

Torrente, D., Su, E.J., Citalán-Madrid, A.F., Schielke, G.P., Magaoay, D., Warnock, M., Stevenson, T., Mann, K., Lesept, F., Delétage, N., Blanc, M., Norris, E.H., Vivien, D., Lawrence, D.A., 2025. The interaction of tPA with NMDAR1 drives neuroinflammation and neurodegeneration in α-synuclein-mediated neurotoxicity. J. Neuroinflammation 22, 8. https://doi.org/10.1186/s12974-025-03336-3

Turalde, C.W.R., Espiritu, A.I., Anlacan, V.M.M., 2020. Memantine for Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. Front. Neurol. 11, 574748. https://doi.org/10.3389/fneur.2020.574748

Ungar, D., Hughson, F.M., 2003. SNARE protein structure and function. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19, 493–517. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.155609

Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., Robberecht, W., 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Biochim. Biophys. Acta 1762, 1068–1082. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.002

Wood, O.W.G., Yeung, J.H.Y., Faull, R.L.M., Kwakowsky, A., 2022. EAAT2 as a therapeutic research target in Alzheimer's disease: A systematic review. Front. Neurosci. 16, 952096. https://doi.org/10.3389/fnins.2022.952096

Wu, S.-Z., Bodles, A.M., Porter, M.M., Griffin, W.S.T., Basile, A.S., Barger, S.W., 2004. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. J. Neuroinflammation 1, 2. https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-2

Yatomi, Y., Tanaka, R., Shimura, H., Miyamoto, N., Yamashiro, K., Takanashi, M., Urabe, T., Hattori, N., 2013. Chronic brain ischemia induces the expression of glial glutamate transporter EAAT2 in subcortical white matter. Neuroscience 244, 113–121. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.018

Yelshanskaya, M.V., Sobolevsky, A.I., 2022. Structural insights into function of ionotropic glutamate receptors. Biochem. Mosc. Suppl. Ser. Membr. Cell Biol. 16, 190–206. https://doi.org/10.1134/s1990747822040043

Zhou, C., Tajima, N., 2023. Structural insights into NMDA receptor pharmacology. Biochem. Soc. Trans. 51, 1713–1731. https://doi.org/10.1042/BST20230122