

La lesione del midollo spinale acuta riduce in modo durevole l'editing R/G RNA dei recettori AMPA

Alessandro Barbon,^{*1} Fabio Fumagalli,^{†1} Luca Caracciolo,^{*} Laura Madaschi,[‡] Elena Lesma,[‡] Cristina Mora,^{*} Stephana Carelli,[‡] Theodore A. Slotkin,[§] Giorgio Racagni,^{†¶} Anna Maria di Giulio,[‡] Alfredo Gorio^{‡**} e Sergio Barlati^{*}

^{*} *Divisione di Biologia e Genetica, Dipartimento di Scienze Biomediche e di Biotecnologie, Università di Brescia, Brescia, Italia*

[†] *Centro of Neurofarmacologia, Dipartimento di Farmacologia e Centro di Eccellenza per le Malattie neurodegenerative, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

[‡] *Laboratorio di Farmacologia, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Facoltà di Medicina, Università di Milano, Milano, Italia*

[§] *Dipartimento di Farmacologia e Biologia oncologica, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA*

[¶] *IRCCS, FBF S. Giovanni di Dio, Brescia, Italia*

^{**} *IRCCS, Humanitas, Farmacologia Clinica, Milano, Italia*

Riassunto

La lesione del midollo spinale (SCI) provoca complesse reazioni ischemiche e infiammatorie che coinvolgono l'attivazione di sistemi di neurotrasmissione, in particolare glutammato, che culminano nella morte delle cellule. Abbiamo ipotizzato che la SCI potrebbe portare all'alterazione nell'editing dell'RNA dei recettori alfa-amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) che governano determinanti critici della sopravvivenza neuronale. A questo scopo abbiamo esaminato i cambiamenti molecolari messi in atto dalla SCI che interessano le proprietà di canale dei recettori AMPA. La SCI riduce notevolmente i livelli dell'editing R/G del recettore AMPA e coinvolge non solo il sito della lesione ma anche le aree circostanti del midollo non coinvolto nella lesione. Gli effetti, con cambiamenti in qualche subunità e loci sono stati osservati fino a 30 giorni

dopo la lesione e possono essere correlati a una parziale diminuzione dell'attività enzimatica della deaminasi adenosina che agisce sull'RNA 2(ADAR2), come si deduce dall'analisi dell'autoediting dell'ADAR2. La riduzione di editing sul sito R/G delle subunità del recettore glutammato (GluRs) è probabile che riduca le risposte eccitatorie post-sinaptiche al glutammato, limitando quindi il progredire della morte cellulare; tuttavia la soppressione prolungata della funzione GluR in stadi successivi può ostacolare la plasticità sinaptica. Queste osservazioni forniscono la prima prova diretta del potenziale contributo dell'editing dell'RNA al trauma neurale eccitatorio e al recupero dopo la SCI.

Parole chiave: recettore del glutammato, meccanismo post-transcrizionale, regolazione dell'RNA, lesione del midollo spinale.

J.Neurochem. (2010) **114**, 397-407.

La lesione del midollo spinale acuta (SCI) provoca complesse reazioni ischemiche e infiammatorie che coinvolgono sistemi di neurotrasmissione eccitatori e segnalazioni intracellulari (per una documentazione completa, vedi Frigon e Rossignol, 2006) che a loro volta creano un ambiente sfavorevole per la sopravvivenza e la rigenerazione sinaptica. La più importante di queste reazioni, il rilascio di glutammato, provoca l'influsso di Ca²⁺ (Choi 1994; Michaelis 1998), che provoca effetti nocivi compresa la morte cellulare (Shapiro 1997), che possono poi essere attenuati da antagonisti al recettore glutammato, (Faden and Simon 1988; Faden e al. 1988, 1990; Gomez-Pinilla e al. 1989; von Euler e al. 1994; Wrathall e al. 1994, 1996).

L'espressione del subtipo alfa-amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) dei recettori del glutammato è stata ampiamente studiata nella SCI (Grossman et al. 1999,

2001; Grossman and Wrathall 2000; Brown et al. 2004; Alilain and Goshgarian 2008; Ferguson et al. 2008); tuttavia il loro stato funzionale è controllato da un splicing alternativo dell'RNA, dall'editing dell'RNA e dal targeting e trafficking delle subunità del recettore alle spine dendritiche (Dingledine e al., 1999), e i ruoli di questi eventi regolatori non sono ancora stati chiariti. Ciascuno degli quattro recettori AMPA viene sottoposto a splicing alternativo nella regione extracellulare generando le cosiddette varianti 'Flip' e 'Flop' (Sommer e al. 1990), che presentano proprietà cinetiche totalmente diverse (Monyer e al. 1991; Hollmann e Heinemann 1994; Lambolez e al., 1996). Oltre alle varianti di splicing, vengono controllate le proprietà fisiologiche dei recettori AMPA con l'editing posttranscrizionale dell'RNA (Seeburg et al. 1998), che modifica uno o più codoni di traslazione che portano da un singolo gene a proteine distinte

dal punto di vista funzionale. Il cambiamento di editing predominante nei mammiferi è l'adenosina-a-inosina, catalizzata dalla deaminasi di adenosina che agisce sull'RNA (ADAR) enzimi 1 e 2 (Reenan 2001; Bass 2002). Rispetto alle subunità del recettore del glutammato (GluRs), le posizioni dell'editing sono state nominate sulla base della sostituzione di aminoacidi, come il sito del Q/R nel GluR2 di AMPA e il sito del R/G in GluR2, GluR3, e GluR4 (Seeburg 2002). I cambiamenti dell'aminoacido alterano le proprietà di canale (Egebjerg e Heinemann 1993; Kamboj e al. 1995; Swanson e al. 1996): per le subunità GluR2, il sito Q/R influenza la maturazione del recettore e il trafficking cellulare (Greger et al. 2002, 2003) come pure la cinetica del gating (apertura) del canale (Lomeli et al. 1994). Normalmente il GluR2 viene completamente editato sul sito del Q/R e i risultanti recettori che contengono AMPA-GluR2- sono impermeabili al Ca^{2+} , mentre i recettori AMPA privi di GluR2 sono permeabili al Ca^{2+} (Isaac e al. 2007). Il fatto che i recettori AMPA siano permeabili o impermeabili al Ca^{2+} può influenzare profondamente la plasticità neuronale e la sopravvivenza in seguito a lesione (Liu and Zukin 2007). Inoltre i recettori GluR2, 3, and 4 vengono editati sul sito R/G; questo sito è collocato proprio prima delle sequenze coinvolte negli eventi di splicing che portano alla formazione di isoforme Flip/Flop e sembra influenzare sia gli eventi di splicing sia le proprietà di desensitizzazione dei canali del recettore AMPA (Lomeli et al. 1994; Krampfl et al. 2002). Tutti questi effetti hanno un impatto sull'omeostasi delle cellule che sono di potenziale importanza nella SCI. Di conseguenza in questo studio abbiamo esaminato i cambiamenti molecolari messi in moto dalla SCI che influiscono sulle proprietà di canale dei recettori AMPA. Riferiamo che la SCI porta all'alterazione dell'editing dei recettori glutamatergici AMPA coerentemente con la risposta ridotta del glutammato dopo la SCI; a sua volta questo può portare a progettare terapie che possano minimizzare il danno eccitatorio.

Metodi

Il trattamento degli animali

Tutti i protocolli sperimentali sono stati approvati dal Comitato Etico per gli Animali dell'Università di Milano e ottemperavano le linee guida italiane per gli animali di laboratorio ed erano conformi ai dettami della Comunità europea (Direttiva del Consiglio d'Europa 86/609 1987) e alla Guida per la cura e l'impiego di animali da laboratorio adottata e promulgata dall'Istituto Nazionale di Sanità degli Stati Uniti. Ratti adulti Sprague-Dawley (Charles River Laboratories Inc., Calco, LC, Italia) del peso di 240–260 g sono stati tenuti in stabulazione standard (22 ± 2 C, 65% di umidità, luci accese dalle 06:00 alle 20:00), con una mangiatoia standard e acqua sempre a disposizione. La SCI traumatica è stata effettuata come descritto precedentemente (Gorio et al. 2002, 2005), usando l'impattatore UTS-Impactor, al cui centro è situata una verga di acciaio inossidabile di 2,3 mm di diametro che viene inserita con precisione nel midollo spinale con una forza e una rimozione specifica. Il movimento e l'impatto sono monitorati per mezzo di un dinamometro piezoelettrico miniaturizzato presente all'interno di una sezione della verga d'impatto e collegata a un computer che aziona il meccanismo, registra e elabora i dati. Il pistone d'impatto è stato posizionato 1 mm sopra il midollo esposto a

livello T9 e tarato per un'escursione di 3 mm. È stata applicata una forza di 1N per 1 s seguita dal ritorno automatico della verga dell'impattatore. Gli animali sono stati tenuti sotto anestesia con alotano e collocati su un tappetino tenuto alla temperatura di 38°C e, prima del risveglio, sono stati trattati con buprenorfina [0,03 mg/kg] contro il dolore e penicillina G (10.000U/kg) per prevenire l'infezione. Dopo la SCI i ratti sono stati posti due per gabbia e sono stati sottoposti allo svuotamento manuale della vescica tre volte al giorno. Sono stati confrontati animali che non avevano subito chirurgia (controlli, CTR), animali laminectomizzati che avevano subito chirurgia senza impatto del midollo spinale (LAM) e animali lesi (LES). Diversi gruppi di animali sono stati usati per l'immunocitochimica oltre alle analisi molecolari (Almeno cinque per ogni gruppo)

Valutazione funzionale

L'attività motoria basale è stata valutata il giorno prima della lesione (giorno1) per assicurarsi che gli animai coinvolti nello studio non avessero deficit motori iniziali. La funzione motoria è stata esaminata a vari intervalli che andavano da 1 a 28 giorni dopo la lesione per osservatori in cieco e si è fatta una media fra i vari osservatori dei valori per ciascun animale usando la metodologia descritta in Basso e al. (1995).

Morfologia

Tre giorni dopo la lesione gli animali sono stati anestetizzati con inalazione di alotano e sottoposti a perfusione transcardiale con paraformaldeide all'1% in 0.1 M di tampone fosfato pH 7.2, seguito da paraformaldeide al 4% per l'immunocitochimica. I midolli spinali sono stati sezionati e postfissati per 12 ore nello stesso fissativo usato per la perfusione, crioprotetti con saccarosio al 30%, congelati velocemente e tenuti a $-80^{\circ}C$. A 0.5 mm della porzione caudale rispetto all'epicentro della lesione, il midollo è stato tagliato in serie per mezzo di un criostato (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germania). Sezioni trasversali seriali di cinque animali in ciascun gruppo sperimentale sono state colorate con la tironia e sono state usate come indice di sostanza grigia di riserva e per valutare l'estensione del danno del tessuto (dati non riportati).

Per la coloratura immunocitochimica le sezioni sono state incubate prima in 0.05 M NH₄Cl in tampone fosfato per 30 minuti per smorzare gruppi aldeici liberi e poi per 30 min in 0,01 M di soluzione salina pH 7,4 di tamponato fosfato (PBS) che conteneva albumina serica bovina all'1% e Triton X-100 allo 0,2%. Le sezioni sono poi state incubate in sequenza con l'antisiero primario per tutta la notte a temperatura ambiente e poi coniugate a un fluorocromo con l'appropriato antisiero secondario per 2 ore; le sezioni sono poi state lavate a lungo in PBS, montate con FluorSave (Merck, Darmstadt, Germania), e analizzate con la microscopia confocale (Leica TSC2; Leica Microsystems, Heidelberg, Germania). Sono stati usati i seguenti anticorpi primari: proteina acidica fibrillare anti-glia (1 : 400; Covance, Harrogate, UK); anti- β -tubulina III (1 : 150; Covance); anti recettore 2 del glutammato (GluR2; 1 : 150; Chemicon, Temecula, CA, USA). L'anticorpo secondario era 488 IgG capra-anti-topo (1 : 200; Alexa, Fluor-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 546 IgG capra-anti-coniglio (1 : 200; Alexa, Fluor-Invitrogen). La sostanza di Nissl è stata visualizzata con il colore di Nills rosso fluorescente scuro NeuroTrace 640/660 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). In seguito a una permeabilizzazione di 30-min in Triton X-100 al

2% in PBS, le sezioni sono state incubate in NeuroTrace (1 : 50 in PBS, 40 min a 20–25° C) e lavate in PBS per almeno 2 ore. I nuclei sono stati contro-colorati con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, St Louis, MO, USA). Nelle determinazioni di controllo gli anticorpi primari sono stati omessi o sostituiti con concentrazioni equivalenti di IgG irrelato della stessa sottoclasse.

Estrazione dell' RNA e reazione RT-PCR

Le analisi molecolari sono state effettuate a 3, 7 e 30 giorni dopo la lesione (n=5 per ogni intervallo di tempo). Gli omogenati sono stati preparati usando un campione del midollo spinale della lunghezza di circa 1,5 mm, prelevato all'epicentro (T9) della lesione e anche a 4 mm caudali e 4 mm rostrali rispetto alla lesione; i loci corrispondenti sono stati campionati da ratti CTR e LAM. Le porzioni d'interesse del midollo spinale sono state sezionate rapidamente, congelate su ghiaccio secco e tenute a -70° C per ulteriori analisi. L'RNA totale è stato estratto usando il reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'RNA è stato recuperato con una precipitazione di alcohol isopropilico lavato con una soluzione di etanolo al 75%, e dissolto in acqua priva di RNase. La quantificazione dell'RNA e i controlli di qualità sono stati effettuati usando l'analisi spettrofotometrica e le tecnologie AGILENT Bioanalyzer 2100 lab-on-a-chip (AGILENT Technologies, Santa Clara, CA, USA). La retro trascrizione è stata effettuata usando la trascrittasi della leucemia murina inversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). In tutti i 2,5 µg di RNA totale da ciascun midollo spinale il campione è stato mescolato con 2,2 µL di 0.2 ng/µL di esamero casuale (Invitrogen), 10 µL di tampone (Invitrogen), 10 µL di 2 mM dNTP, 1 µL di 1 mM di ditrioreitolo (Invitrogen), 0.4 µL di 33 U/µL RNasin (Promega, Madison, WI, USA), e 2 µL di trascrittasi inversa della leucemia murina di Moloney (200 U/µL), per un volume finale di 50 µL. Il mix di reazione è stato incubato a 37° C per 2 ore e poi l'enzima è stato disattivato al calore a 95° per 10 min. Per effettuare le reazioni PCR, sono stati mescolati 20 ng dell'RNA retrotrascritto con 2,5 µL di tampone 10x (Polymed, Firenze, Italia), 0.7 µL di 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µL di 2 mM dNTP, 0.7 µL di ogni primer forward e reverse, e 1,25 U di polimerasi Taq per un volume finale di 25 µL. Le condizioni standard del ciclo del PCR sono state le seguenti: un passaggio di denaturazione per due min a 95° C, seguito da 25–35 cicli con 30 s di denaturazione a 95° C, 20 s di appaiamento del primer a 60° C, 30 s–1 min di allungamento a 72° C dopo un'estensione finale di 1 min.

Quantificazione del livello di editing

La quantificazione del livello di editing per i trascritti del recettore 2 C (5-HTR2C) AMPA della 5-idrossitriptamina GluR2, GluR3, e GluR4, e del pre-mRNA di ADAR2 è stato effettuato con un'analisi in sequenza di prodotti PCR purificati (Barbon et al. 2003). In breve nell'elettroferogramma ottenuto dopo l'RT-PCR e l'analisi di sequenza di un pool di trascritti, il nucleotide che subisce la reazione dell'editing si manifesta con due picchi che si sovrappongono: 'A' dai trascritti non editati e 'G' da quelli editati. Abbiamo determinato in precedenza che il livello di editing può essere calcolato in modo affidabile come funzione del rapporto fra il picco G e i picchi A e G. Le aree del nucleotide sono state quantificate con il programma Discovery Studio Gene 1,5

(Accelrys Inc., San Diego, CA, USA). I valori medi e gli errori standard per ogni gruppo di animali sono stati usati per l'analisi statistica. Per convalidare il sistema la nuova curva di calibratura ottenuta dai cinque siti di editing 5-HTR2C viene riportata nell'Appendice S1.

Analisi Western blot

I tessuti sono stati omogenati usando un politrone Ultra Turrax (IKALabortechnik, Staufen, Germania) in cinque volumi di un tampone di omogeneizzazione (25 mM Tris-HCl, pH 7,4, sodio azide 0.4 mM, fenil metilsulfonilmetilsulfonilfluoruro 0,4 mM, benzammina-HCl 1 mM, EDTA 0.4 mM, EGTA 0.4 mM, e saccarosio 0.25 M). L'omogenato è stato centrifugato per 10 min at 4° C, e il supernatante è stato usato per l'analisi western blot. I campioni (25 µg) sono stati bolliti, fatti correre elettroforeticamente sul un gel SDS-PAGE, e trasferiti su membrane di nitrocellulosa (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Dopo essere state bloccate a 20–25° C per 3 ore con latte in polvere al 5% (Merck, Darmstadt, Germania), le membrane sono state incubate per tutta la notte a 4° C con anticorpi contro ADAR1 (L-15, 1 : 100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), ADAR2, (1 : 300, Abcam, Cambridge, MA, USA), e b-actina (1 : 1000, Sigma). Le membrane sono state lavate e incubate per 1 ora con anticorpo anti-capra (1 : 10 000; Pierce, Rockford, IL, USA) per ADAR1, anticorpo anti-coniglio (1 : 10 000; Pierce) per ADAR2 e anticorpo anti-topo (1 : 10 000; Pierce) per la beta-actina. La reazione è stata evidenziata usando il SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) per ADAR2 e beta-actina, e usando il SuperSignal West Femto Chemiluminescent Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) per ADAR1. L'analisi densitometrica è stata effettuata con il programma Kodak MJ project. I dati sono stati espressi come densità ottica.

PCR quantitativa in tempo reale e analisi dello splicing alternativo di ADAR2

Per analizzare le modalità di espressione del RNA di GluR e degli enzimi ADAR di mRNA abbiamo usato il sistema Applied Biosystem 7500 Real-time PCR (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), con probes TaqMan Id probes: GluR1: Rn00709588_m1; GluR2: Rn00568514_m1; GluR3: Rn00583547_m1; GluR4: Rn00568544_m1; ADAR1: Rn00508006_m1 ADAR2: Rn00563671_m1; Applied Biosystems). L'espressione dei diversi geni è stata normalizzata sulla base di due geni housekeeping neurone specifici, in modo da calcolare i valori di espressione relativi ai neuroni che sopravvivevano alla lesione (Grossman et al. 1999): Neuronal Specific Enolase (Rn00595017_m1) e beta-3-tubulina neurone-specifica (Rn01431594_m1). Ogni gruppo sperimentale era composto di cinque ratti e ogni misurazione è stata ripetuta tre volte. Il rapporto d'espressione dei geni bersaglio è stata calcolata usando valori medi geometrici (Pfaffl et al. 2002).

L'analisi di prodotti di splicing alternativo dell'ADAR2 di ratto è stata effettuata dopo amplificazione RT-PCR dell'RNA totale per ciascuno dei campioni di midollo spinale; usando un paio di primer posti in esoni 3 e 4 relativi alla sequenza di ratto (NM_001111056), si potevano individuare sia i trascritti normali sia quelli di splicing alternativo [+47 nucleotides (nt)]. La quantificazione relativa è stata effettuata usando il bioanalizzatore lab-on-a-chip Agilent 2100 il cui software

calcola automaticamente la dimensione e la concentrazione di ciascuna banda separata e mostra il risultato in tempo reale. Il numero di cicli è stato scelto sperimentalmente in modo che rientrasse nelle fasi esponenziali della reazione di amplificazione.

Analisi statistica

I dati densitometrici della proteina, dell'editing e del PCR in tempo reale sono stati valutati per ogni singolo animale e gli errori medi e standard per ogni gruppo ($n = 5$) sono stati prima analizzati con ANOVA globale (i dati sono stati trasformati in logaritmi a causa della varianza eterogenea) con tutte le variabili incluse in un singolo test in modo da evitare l'aumento di probabilità di errori di tipo I che risulterebbero da tests multipli della stessa serie di dati. Come è giustificato dall'interazione del trattamento (CTR, LAM, LES) con le altre variabili, i dati sono stati poi suddivisi per un'ANOVA di ordine inferiore, seguito dove appropriato dalla Fisher's Protected Least Significant Difference, per valutare i valori individuali che differivano dal gruppo di controllo corrispondente. Tuttavia dove c'erano effetti del trattamento senza interazioni, vengono riportati solo gli effetti del trattamento principale. Si è assunto $p < 0,05$ come significatività per tutti i test.

Risultati

Recupero della funzione motoria

In accordo con i nostri risultati precedenti (Gorio e al. 2002, 2005), gli animali LAM hanno rivelato un effetto iniziale soltanto lieve sulla funzione motoria, con recupero completo entro 4 giorni, mentre nel gruppo degli animali lesi la funzione locomotoria era ancora nettamente compromessa 28 giorni dopo la lesione (Fig. 1).

Morfologia

Il nostro paradigma, come già riferito precedentemente in parecchi risultati del nostro gruppo (Gorio e al. 2002, 2005), ha provocato un danno esteso alla sostanza grigia e bianca sul sito della lesione con sostanza bianca ventrale e laterale di riserva. A 3 mm dall'epicentro della lesione si evidenzia un lieve danno alla sostanza grigia intorno al canale epidurale nella porzione caudale, mentre non c'è segno di lesione rostralmente (dati non riportati). GluR2 sono stati individuati negli strati più profondi della sostanza gelatinosa nel corno dorsale e in tutto il corno ventrale del midollo spinale (Fig. 2, D1 e V1). A un maggiore ingrandimento la co-localizzazione con sostanza di Nissl ha confermato che le cellule colorate positivamente al GluR2 erano in effetti neuroni (Fig. 2, D2 and V2), e che tale espressione si è mantenuta dopo la lesione (Fig. 2, sezioni DL e VL). Quindi le successive valutazioni sulla modalità dell'espressione del recettore, sulle varianti di splicing e sull'editing coinvolgono i recettori situati principalmente nelle cellule neuronali.

Analisi statistiche globali

Suddividere i dati in sottogruppi diversi e effettuare tests statistici ripetuti aumenta la probabilità di errori statistici di tipo I e quindi noi abbiamo dapprima effettuato l'ANOVA globale per assicurarci che le differenze di trattamento significative fossero individuabili e per identificare quali suddivisioni di dati fossero giustificate dall'interazione del

trattamento con altre variabili. Per i dati di editing dell'RNA le relative variabili erano il trattamento (CTR, LAM, LES), la subunità del recettore (GluR2, GluR3, GluR4), il tempo (3, 7, 30 giorni), la posizione (epicentro, rostrale, caudale), e la variante (Flip, Flop). Abbiamo identificato un effetto principale del trattamento ($p < 0.0001$) e le interazioni delle subunità del trattamento ($p < 0.0002$), il trattamento x variante ($p < 0.0001$), il trattamento x tempo ($p < 0.0001$), il trattamento x posizione ($p < 0.007$), come pure interazioni di ordine superiore fra tutte queste variabili (dati non riportati). Pertanto, per la presentazione abbiamo diviso i dati prima nelle tre diverse subunità e nelle due varianti e abbiamo riesaminato gli effetti del trattamento e le interazioni con il tempo e la posizione in test di ordine inferiore.

L'editing dell'RNA

La figura 3 (a) mostra che il sito Q/R del GluR2, quasi completamente espresso in condizioni normali, non è stato influenzato dalla SCI in nessuna porzione del midollo nella tre condizioni sperimentali. D'altra parte per il sito R/G, ci sono state alterazioni significative nell'editing del recettore negli animali LES che era superiore nel sito della lesione se confrontato con aree rostrali e caudali alla lesione. Per la variante Flip del GluR2 (Fig. 3b), l'editing era ridotto complessivamente nel gruppo lesi ($p < 0.0001$ per l'effetto principale del trattamento), ma l'effetto era significativamente maggiore all'epicentro (trattamento x posizione $p < 0.0001$); tuttavia c'erano significative diminuzioni sia nei segmenti rostrali sia in quelli caudali. L'effetto era estremamente persistente, non rivelando alcuna perdita di effetto anche 30 giorni dopo la lesione (nessun trattamento x interazione di tempo).

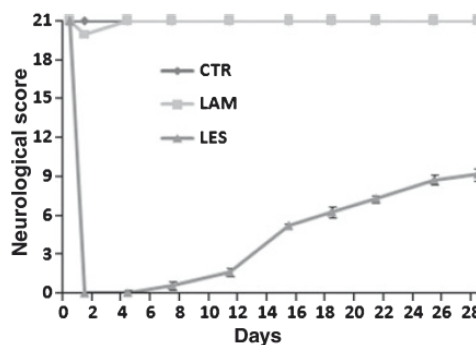


Fig. 1 Prestazione locomotoria in base alla scala di Basso et al. 1995; i punteggi possono andare da 0 (nessun movimento osservabile degli arti posteriori) to 21 (andatura normale). I valori rappresentano medie e errori standard ottenuti da cinque animali in ogni gruppo.

L'editing si è ridotto anche per la variante Flop del GluR2 con modalità fondamentalmente uguale (Fig. 3c): una riduzione generale (effetto principale del trattamento, $p < 0.0001$) che era maggiore all'epicentro rispetto ai segmenti rostrali o caudali (trattamento x interazione di posizione, $p < 0.0001$), ma con diminuzioni significative in tutte le tre aree individualmente. Gli effetti della lesione erano equivalenti per le varianti Flip e Flop, poiché non c'erano interazioni significative di trattamento x variante o di trattamento x variante x altre variabili. Gli effetti sull'editing del GluR3 sono stati più complessi. C'è stato un effetto principale significativo del trattamento ($p < 0.0001$) che di nuovo dipendeva dalla posizione (trattamento x posizione, $p < 0.0001$), ma per questa subunità gli effetti sulle due varianti differivano

(trattamento x variante, $p < 0.0001$) cambiavano nel tempo (trattamento x tempo, $p < 0.0001$), oltre a rivelare interazioni più complesse: $p < 0.002$ per il trattamento x variante x tempo, $p < 0.002$ per trattamento x variante x posizione e $p < 0.0001$ per trattamento x tempo x posizione. Di conseguenza abbiamo analizzato il corso temporale degli effetti del trattamento per ogni variante. Per la variante Flip (Fig. 4a), c'era una consistente diminuzione dell'editing all'epicentro della lesione con diminuzioni più lievi ma significative nei segmenti rostrali e caudali. Per le ultime due regioni gli effetti sull'editing hanno mostrato segni di recupero entro 30 giorni (trattamento x interazione di tempo, $p < 0.0001$), una dipendenza dal tempo che era distinta dai deficit prolungati all'epicentro (trattamento x tempo x posizione, $p < 0.0003$). Gli effetti erano molto meno evidenti per la variante Flop (Fig. 4b), e la grandezza inferiore era distinguibile statisticamente dall'effetto più ampio sulla variante Flip (trattamento x variante, $p < 0.0001$). C'è stato ancora un decremento complessivo significativo (trattamento, $p < 0.0001$) che dipendeva dalla posizione (trattamento x posizione, $p < 0.0001$), che rifletteva effetti maggiori all'epicentro. Tuttavia, in questo caso non c'era un effetto significativo nell'area caudale della lesione, e gli effetti nel sito rostrale erano limitati al tempo di 3 giorni. L'espressione del GluR4 ha rivelato una modalità diversa sia da quella del GluR2 sia da quella del GluR3. Di nuovo si è verificato un effetto da trattamento principale ($p < 0.0001$)

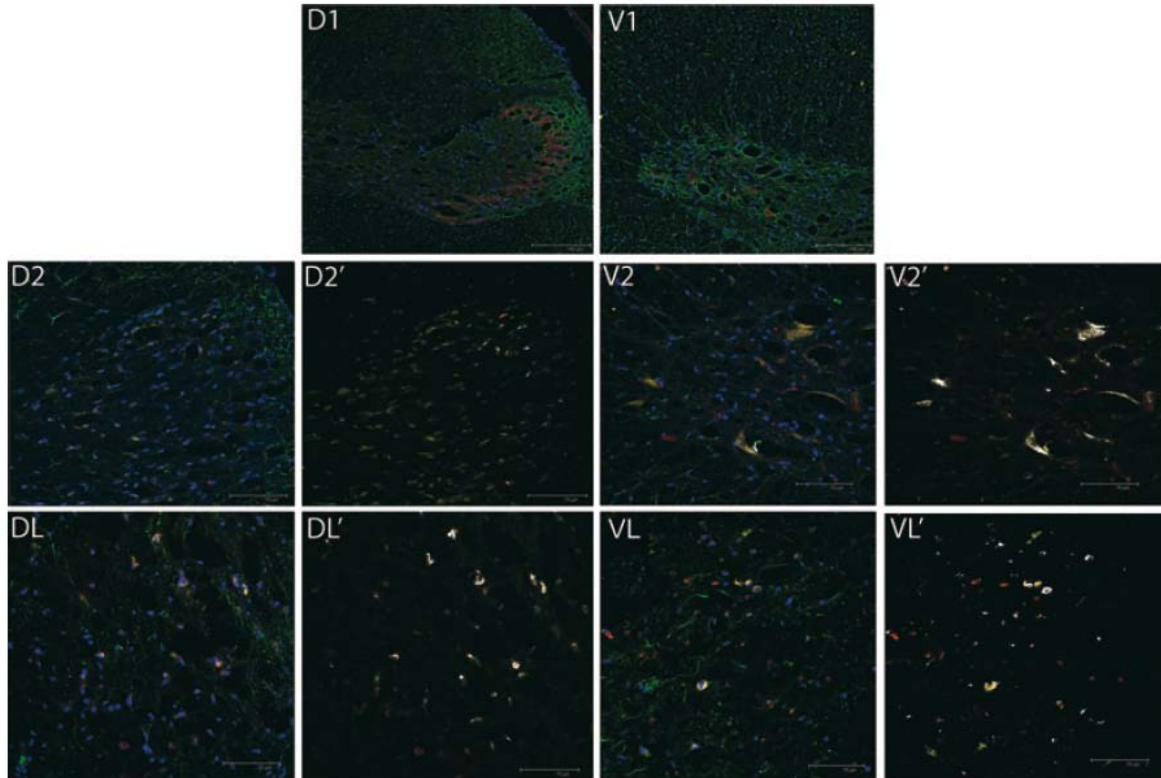


Fig. 2 Immagini confocali di sezioni coronali del midollo spinale toracico a distanza ravvicinata (3 mm) rostralmente rispetto all'epicentro della lesione. Le immagini in D1 e V1 mostrano la immunoreattività del recettore2 al glutammato (GluR2; rosso) e la b-tubulina III (verde) nella sostanza grigia del controllo (CTR) dorsale (D1) e ventrale (V1) del midollo toracico. Scala = 150 μ m. Le immagini D2, V2 e DL,VL mostrano la proteina acida fibrillare gliale (verde), GluR2 (rosso), e i neuroni con la sostanza di Nissl (gialla) dei ratti di controllo I (D2, V2) e lesi (DL, VL), rispettivamente 72 ore dopo la SCI. I nuclei sono stati contro-colorati con DAPI (blu). La co-esistenza di sostanza di Nissl e GluR2 era indicata dal colore bianco artificiale (D2', DL', V2', VL'). Scala = 75 μ m

che rifletteva una complessiva diminuzione dell'editing come risultato della lesione, con una dipendenza dalla posizione (trattamento x posizione, $p < 0,0001$), variante (trattamento x variante, $p < 0,0001$), e tempo (trattamento x tempo, $p < 0,03$). Per la variante Flip di nuovo abbiamo visto una grande riduzione dell'editing all'epicentro con effetti minori nelle sezioni rostrali e caudali rispetto alla lesione (Fig. 5a) Anche se l'effetto all'epicentro persisteva per tutto il periodo successivo alla lesione, c'è stato un recupero evidente in entrambi i siti adiacenti così che gli effetti significativi sparivano entro 30 giorni; la perdita di effetto era statisticamente distinguibile dall'effetto continuato all'epicentro (trattamento x posizione x tempo, $p < 0,04$). La variante Flop rivelava una modalità completamente diversa con un declino progressivo all'epicentro e nessun effetto sia sui siti rostrali sia su quelli caudali (Fig. 5b); queste differenze si riflettevano in un effetto principale del trattamento ($p < 0,0001$) che interagiva con il tempo e la posizione ($p < 0,0001$ per il trattamento x tempo, $p < 0,0001$ per trattamento x posizione $p < 0,02$, per trattamento o x tempo x posizione. Per distinguere se gli effetti del trattamento sull'editing fosse selettivo per il recettore del glutammato o invece fosse dovuto a una perdita generale di capacità di editing abbiamo valutato l'mRNA del recettore 5-HT_{2C} che codifica la serotonina. I cinque siti dell'editing del 5-HT_{2C} non sono stati influenzati dalla SCI (tabella SI).

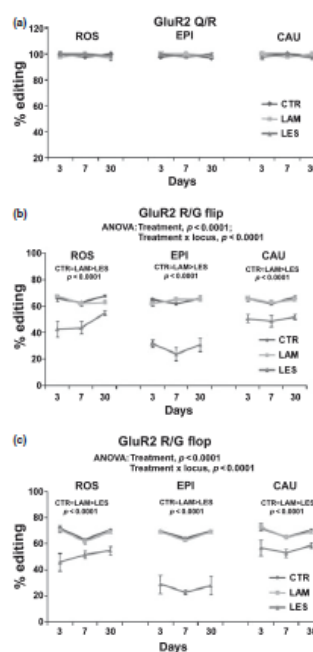


Fig.3 Valutazione dei livelli di editing dell'rRNA del recettore 3R/G (a) di glutammato AMPA e sito dell'editing R/G nelle varianti Flip(b) e Flop (c) per i ratti di controllo (CTR), laminectomizzati (LAM) e lesi (LES). Sono state esaminate porzioni diverse del midollo spinale: rostrali rispetto alla lesione (ROS), all'epicentro (EPA), e caudali rispetto alla lesione (CAU): i dati rappresentano i valori medi e gli errori standard ottenuti da almeno cinque animali in ogni gruppo in ciascun momento. L'ANOVA multivariata compare in cima a ogni riquadro e i test di ordine inferiore sono riportati all'interno del riquadro. Non abbiamo valutato le differenze significative per i tempi individuali a causa dell'assenza del trattamento x interazione nel tempo.

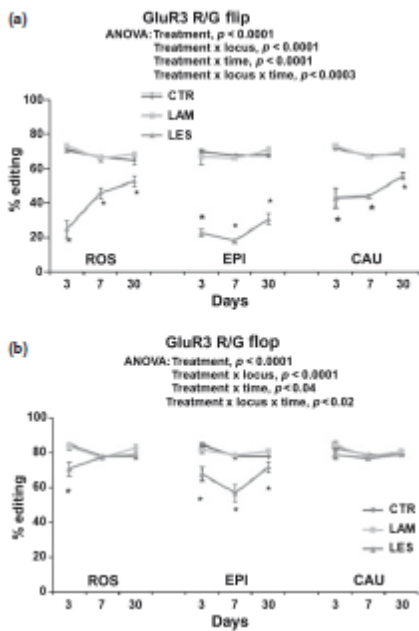


Fig.4 Valutazione dei livelli di editing dell'RNA del sito di editing del recettore 3R/G di glutammato AMPA nelle varianti Flip(a) e Flop (b) per i ratti di controllo (CTR), laminectomizzati (LAM) e lesi (LES). Sono state esaminate porzioni diverse del midollo spinale: rostrali rispetto alla lesione (ROS), all'epicentro (EPA), e caudali rispetto alla lesione (CAU). I dati rappresentano i valori medi e gli errori standard ottenuti da almeno cinque animali in ogni gruppo in ciascun momento. L'ANOVA multivariata è riportata in cima a ogni riquadro e gli asterischi indicano i tempi individuali in cui il gruppo lesio differisce da quello di controllo e da quello laminectomizzato.

Infine abbiamo valutato i livelli di espressione della codificazione dell'mRNA nelle subunità del recettore AMPA, GluR1, GluR2, GluR3, e GluR4 (Tabella S2). In generale, gli effetti, anche se statisticamente significativi non corrispondono a quelli trovati per l'editing dell'RNA.

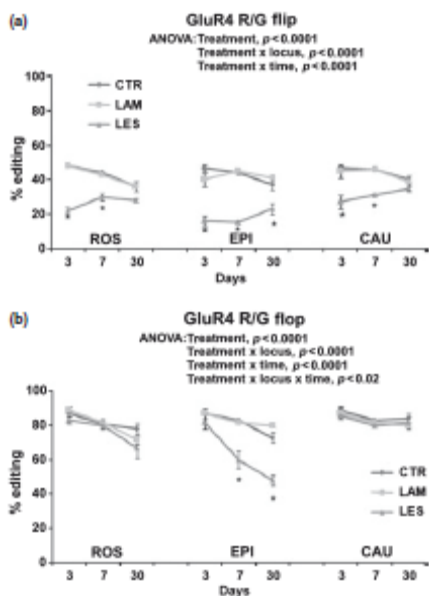


Fig.5 Valutazione dei livelli di editing dell' RNA del sito di editing del recettore 4R/G del glutammato della alfa-amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolone propionato nelle varianti Flip(a) e Flop (b) per i ratti di

controllo (CTR), laminectomizzati (LAM) e lesi (LES). Sono state esaminate porzioni diverse del midollo spinale: rostrali rispetto alla lesione (ROS), all'epicentro (EPI), e caudali rispetto alla lesione (CAU). I dati rappresentano i valori medi e gli errori standard ottenuti da almeno cinque animali in ogni gruppo in ciascun momento. L'ANOVA multivariata è riportata in cima a ogni riquadro e gli asterischi indicano i tempi individuali in cui il gruppo lesio differisce da quello di controllo e dal quello laminectomizzato.

ADAR1 e mRNA di ADAR2 e espressione della proteina.

Abbiamo già riferito che il sito R/G è espresso con efficacia sia da ADAR1 sia da ADAR2, mentre il sito GluR-B Q/R è espresso solo da ADAR2 (Maas e al. 1996; Melcher e al.

1996; Aruscavage e Bass 2000; Wong e al., 2001). Per determinare se le riduzioni dell'editing del recettore AMPA riflette alterazioni nell'espressione degli enzimi responsabili per l'editing dell' RNA in generale, si è valutata l'espressione di ADAR1 e ADAR2, sia ai livelli dell'mRNA sia ai livelli della proteina.

A livello dell' mRNA, ADAR1 veniva up-regulated principalmente all'epicentro della lesione, mentre gli effetti su ADAR2 erano molto meno importanti (Figura S1). D'altra parte le espressioni della proteina ADAR1 (p110 e p150) e ADAR2 non venivano alterate nel gruppo LES e LAM confrontate al gruppo di controllo nei giorni 3, 7, e 30 dopo la lesione (Fig. 6a) come evidenziato dall'analisi densitometrica (Figura S2).

Editing dell'RNA dell' ADAR2 e splicing alternativo

Per testare la possibilità di una modificazione dell'attività catalitica di ADAR2 è stato analizzato il livello di auto-editing di ADAR2 nella posizione 1 della sua modalità di splicing. Un evento di splicing ADAR2 porta all'inclusione di un ulteriore cassette 47nt all'estremità 5' della regione del codificante, cambiando lo schema di lettura del trascritto dell' ADAR2 maturo. L'inclusione di questa cassette dipende dalla capacità di ADAR2 di editare il suo pre-nRNA per generare un nuovo sito accettore intronico 3'.

L'auto-editing di ADAR2 (Fig. 6b) era ridotto all'epicentro nel gruppo lesio (effetto del trattamento, $p < 0.0001$); questo effetto persisteva sino a 30 giorni dopo la lesione (nessuna interazione trattamento x tempo). Tuttavia si è osservata una tendenza al decremento sia nei segmenti rostrali sia in quelli caudali che diventava significativa nel sito caudale della lesione dopo 30 giorni ($p < 0.01$).

In conformità con i dati dell'editing, cambiava la modalità di splicing delle forme canoniche e alternative. Sul sito dell'epicentro la forma con inclusione 47nt rivelava una diminuzione relativa che andava da più del 60% del totale della trascrizione a meno del 40% (effetto principale del trattamento $p < 0.001$); questo effetto persisteva durante il trattamento (nessuna interazione trattamento x tempo). Si è trovata una modalità simile, con diminuzioni inferiori ma significative, nei segmenti rostrali del midollo all'intervallo temporale di 3 giorni ($p < 0.01$); nel segmento caudale si è osservato un effetto principale del trattamento ($p < 0.001$).

Discussione

I risultati che abbiamo ricavato indicano che la SCI produce una diminuzione dell'editing del recettore AMPA R/G. Inoltre questi cambiamenti sembrano essere un adattamento

regolatorio specifico piuttosto che riflettere gli effetti immediati della lesione stessa, dal momento che : (i) gli effetti si estendono fuori della zona infartuata fino a comprendere aree del midollo spinale sia caudali sia rostrali rispetto alla lesione; (ii) gli effetti sono stati selettivi per i GluR specifici con una modalità distinta dagli effetti sull'espressione dei GluR stessi; (iii) molti degli effetti persistevano a lungo dopo la lesione iniziale; e (iv) la diminuzione dell'editing non era accompagnata da una perdita parallela di espressione di ADAR, nè da effetti sull'editing di recettori non correlati come il 5-HT_{2C}, rivelando quindi una selettività per i recettori AMPA.

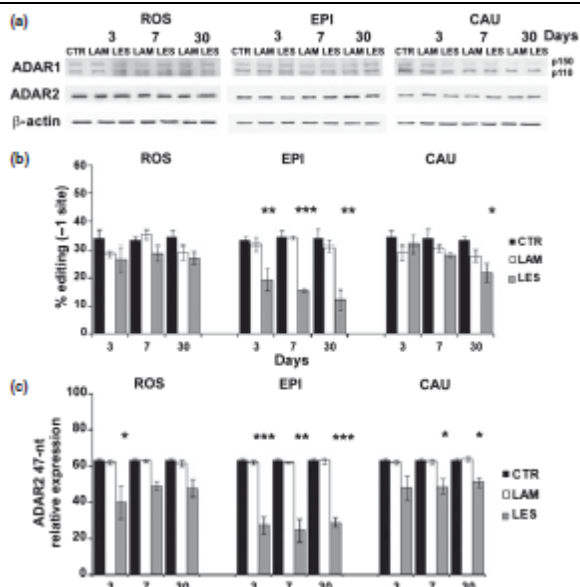


Fig. 6 Azione della deaminasi adenosina sull'analisi degli enzimi dell'RNA (ADAR) nei ratti di controllo (CTR), laminectomizzati (LAM) e lesi (LES). Sono state esaminate porzioni diverse del midollo spinale: rostrali rispetto alla lesione (ROS), all'epicentro (EPI), e caudali rispetto alla lesione (CAU). (a) Western blot rappresentativo che rivela ADAR1 (110 e 150 kDa) e ADAR2 (81 kDa); è stato usato un anticorpo beta-actina come controllo di loading. (b) auto-editing di ADAR2 nella posizione intronica -1. (c) Analisi dello splicing alternativo con l'impiego di una strategia RT-PCR di base. Le colonne rappresentano i trascritti alternativi di splicing con inclusa la cassette 47nt. Gli asterischi denotano i punti temporali individuali in cui i gruppi lesi differiscono dai gruppi di controllo e laminectomizzati.

Queste osservazioni forniscono la prima prova del contributo dell'editing dell'RNA dei recettori AMPA ai meccanismi dinamici messi in moto dalla SCI. In particolare il sito dell'editing del GluR2 R/G delle isoforme Flip e Flop è stato drasticamente ridotto dalla SCI in sostanza durante tutto il periodo di 30 giorni dopo la lesione, mentre il livello di editing R/G del GluR3 e GluR4 nelle loro forme Flip ha rivelato un recupero parziale; questa modalità temporale specifica per l'editing dell' RNA dei recettori AMPA indica quindi un adattamento di regolazione piuttosto che rappresentare semplicemente una reazione ad una lesione acuta. La selettività viene ulteriormente rinforzata dalla relativa mancanza di effetto sull'editing del sito Q/R dei GluR2, il che suggerisce che un aumento dell'influsso di Ca²⁺ attraverso i canali AMPA non editati contenenti GluR2 non è coinvolto nella reazione alla SCI a breve e lungo termine. Una delle caratteristiche del GluR2 R/G è quella di modulare le proprietà cinetiche dei canali del recettore AMPA insieme

allo splicing alternativo nella cassette Flip/Flop (Lomeli et al. 1994), determinando così il corso temporale per la desensitizzazione e la risensitizzazione (Lomeli e al.1994; Krampfl e al. 2002). I recettori AMPA con la versione Flip impiegano un tempo più lungo per desensitizzarsi di quelli con la forma Flop; il recettore AMPA che contiene una subunità editata (G) rivela un indice di recupero più veloce dalla desensitizzazione rispetto ad una forma non editata (R). La riduzione di editing nel sito R/G delle subunità del GluR2 qui indicate rivelerebbe la cinetica della risensitizzazione dei recettori AMPA, attenuando quindi la reazione al rilascio di glutammato come reazione alla SCI. A sua volta l'attivazione ridotta dei recettori post-sinaptici limiterebbe l'attivazione indotta dal calcio dei neuroni post-sinaptici, la tappa pertinente che media la morte della cellula eccitatoria (Choi 1994; Michaelis 1998). Inoltre l'osservazione che il sito GluR2 Q/R è ancora completamente editato dopo la SCI indica la formazione di recettori AMPA contenenti GluR2 (R) che, essendo impermeabili al Ca²⁺, possono notevolmente ridurre gli effetti eccitotossici del rilascio del glutammato. I cambiamenti della regolazione qui esaminati potrebbero rappresentare la risposta messa in moto dalle cellule neuronali per attenuare, almeno in parte, l'eccitotossicità del glutammato. Queste modificazioni quindi sarebbero l'equivalente funzionale della somministrazione di antagonisti del recettore del glutammato che sappiamo riducono le conseguenze istopatologiche e i deficit funzionali osservati dopo la SCI (Gomez-Pinilla e al. 1989; Faden e al. 1990; von Euler e al. 1994; Wrathall e al. 1994); anzi la somministrazione di antagonisti del recettore AMPA, come il didrossi-6-nitro-7-sulfamil-benzo[f]quinosalino-2,3-dione (NBQX), attenua il comportamento meccanico allodynia-like (dolore neuropatico centrale) e l'ipereccitabilità neuronale in seguito a SCI (Gwak e al. 2007). In accordo con i nostri risultati, il livello superiore di editing dell'RNA nel sito del GluR2 R/G nell'ippocampo di pazienti epilettici è in relazione a una frequenza più alta dell'attivazione del recettore postsinaptico, tramite una cinetica più veloce della risensitizzazione (Vollmar et al. 2004). Anche se è probabile che la riduzione dell'editing nel sito R/G delle subunità del GluR2 attenui la perdita neuronale evocata dall'iniziale risposta eccitatoria alla SCI, abbiamo osservato un effetto prolungato che chiaramente si estendeva ben oltre la fase di lesione acuta. Anzi, in molti casi abbiamo trovato riduzioni persistenti virtualmente della stessa magnitudo anche 30 giorni dopo la SCI. Questo effetto implica che la diminuzione della risposta del recettore AMPA rimane presente al punto in cui il glutammato può effettivamente essere necessario per iniziare e sostenere la riorganizzazione sinaptica, limitando presumibilmente il grado di recupero. Oltre ai cambiamenti nell'editing del recettore, abbiamo trovato alterazioni specifiche nella modalità di splicing della cassette dell'esone del Flip/Flop per il mRNA del recettore AMPA (vedi figura S3). Dopo la SCI abbiamo trovato una complessiva prevalenza di forma Flip in tutto il midollo. Dal momento che l'editing dell' RNA è un evento co-trascrizionale che avviene prima dello splicing e lo influenza (Lomeli e al. 1994; Ryman et al. 2007), i nostri dati che mostrano una riduzione nell'editing R/G, unito a un aumento di splicing dell'esone Flip, rinforzano l'ipotesi che la SCI abbia un effetto molto mirato sui meccanismi glutamatergici post-trascrizionali che a loro volta potrebbero influenzare l'eccitabilità. Tuttavia i meccanismi attraverso i quali avviene

la riduzione dell'editing (e a sua volta la modificazione nella modalità di splicing Flip/Flop) devono ancora essere determinati.

Nel tentativo di trovare una spiegazione molecolare per l'alterazione dell'editing R/G qui evidenziato, abbiamo esplorato la possibilità di alterazioni nella funzione e/o espressione degli enzimi dell'editing, ADAR1 e ADAR2, dato che entrambi gli enzimi possono modificare i livelli di editing R/G (Maas e al. 1996; Melcher e al. 1996; Aruscavage e Bass 2000; Wong e al. 2001). Si è scoperto che ADAR1 aumentava i livelli dell'mRNA, presumibilmente come conseguenza dell'infiammazione indotta dalla lesione (Yang e al. 2003; Rosenberg e al. 2005), ma queste modificazioni non erano confermate a livello di proteina né per le forme p110 né per quelle p150. Per quel che riguarda ADAR2, non si sono individuate variazioni statisticamente significative, sia a livello di proteina sia a livello dell'mRNA. Il fatto che il livello di espressione degli enzimi ADAR non sia sempre coerente con i livelli di editing dei bersagli del loro RNA (Maas e al. 2001; Jacobs e al. 2009; Tan e al. 2009; Wahlstedt e al. 2009) può dipendere da parecchi fattori: (i) gli enzimi ADAR potrebbero essere regolati a livelli post-traslazionali come la modificazione o la compartimentalizzazione della proteina (Desterro et al. 2003); (ii) il meccanismo dell'editing potrebbe necessitare di un cofattore come il IP6 (esachisfosfato di inositolo) o di SUMO (piccoli modificatori correlati all'ubiquitina) (Desterro e al. 2005; Macbeth e al. 2005); (iii) l'accesso degli enzimi ADAR ai siti dell'editing può essere controllato negativamente da un inibitore competitivo, come per il piccolo RNA MBII-52 nucleolare e i livelli di editing 5-HT2C (Vitali e al. 2005; Doe e al. 2009). Questo può suggerire che la regolazione dell'espressione ADAR potrebbe non essere determinante per i cambiamenti nell'editing R/G indotto dalla SCI. A questo scopo, abbiamo spostato l'attenzione dell'espressione dell'ADAR all'attività dell'ADAR e abbiamo esaminato i livelli di auto-editing dell'ADAR2. ADAR2 ha la speciale caratteristica di editare un suo proprio pre-mRNA per generare un nuovo sito accettore 3', con l'inclusione di un'aggiunta di una cassette 47nt all'estremità 5' della regione codificante. Questa cassette c 47nt cambia lo schema di lettura del trascritto maturo dell'ADAR2 (Rueter e al. 1999) che codifica una proteina troncata ADAR2 senza attività di deaminasi (Rueter e al. 1999; Feng e al. 2006). Quindi l'inserimento della cassette 47nt può essere un meccanismo regolatorio per mezzo del quale ADAR2 potrebbe impedire la sua sovra-espressione per evitare l'editing in un sito aberrante. Abbiamo osservato l'espressione predominante delle forme +47nt (Rueter e al. 1999; Slavov e Gardiner 2002; Feng e al. 2006) nel midollo spinale di campioni di controllo e abbiamo trovato che la SCI induceva una diminuzione della regolazione persistente della forma di splicing. Queste modificazioni nella modalità di splicing dell'ADAR2 seguono una diminuzione della regolazione dell'auto-editing di ADAR2 in posizione - 1. Questa diminuzione dell'auto-editing in ADAR2, tuttavia non è seguita dal previsto aumento nella proteina a lunghezza piena, come riferito dalle analisi con western blot. Questi risultati suggeriscono possibili meccanismi di regolazione ai livelli post-transcrizionali e/o translazionali. Dato che questa posizione di editing è chiaramente un bersaglio di ADAR2, questi risultati suggeriscono una disattivazione potenziale dell'attività enzimatica di ADAR2. Se questo è vero la selettività dell'azione di ADAR2 potrebbe essere dovuta a una

risposta cellulare specifica del sito alla lesione che, attraverso cambiamenti nell'editing in R/G e non in altri siti dell'editing come Q/R, porta a una modulazione specifica delle funzione del recettore AMPA.

In conclusione, i nostri risultati ci offrono delle straordinarie intuizioni sui meccanismi post-transcrizionali che modificano la funzione del recettore AMPA dopo la lesione del midollo spinale. A sua volta gli effetti sull'editing e lo splicing del recettore può modulare le conseguenze della lesione eccitatoria e la conseguente riorganizzazione sinaptica, processi che sono d'importanza critica per determinare il risultato netto dopo il danno del midollo spinale. In particolare, i cambiamenti dell'editing dell'RNA qui analizzati sono molto più grandi di quelli riferiti precedentemente nell'epilessia (Vollmar et al. 2004), nei gliomi maligni (Maas et al. 2003), e in forme sporadiche non familiari di sclerosi amiotrofica laterale (Kawahara e al. 2004; Kwak and Kawahara 2005). La nostra scoperta di una riduzione a lungo termine dell'editing dell'RNA del recettore può dimostrarsi utile per i composti di selezione che potrebbero ridurre la perdita e/o migliorare la plasticità sinaptica durante i processi di guarigione che sono di importanza primaria nel miglioramento delle conseguenze della lesione spinale.

Ringraziamenti

SB è stato finanziato dal MIUR (PRIN 2007YYL5J9) e da Ricerca Finalizzata 2007 Min Sal. Conv. No 42. AG è stato finanziato dal ministero della pubblica istruzione negli anni 2003 e 2010.

References

- Alilain W. J. and Goshgarian H. G. (2008) Glutamate receptor plasticity and activity-regulated cytoskeletal associated protein regulation in the phrenic motor nucleus may mediate spontaneous recovery of the hemidiaphragm following chronic cervical spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 212, 348–357.
- Aruscavage P. J. and Bass B. L. (2000) A phylogenetic analysis reveals an unusual sequence conservation within introns involved in RNA editing. *RNA (New York, NY)* 6, 257–269.
- Barbon A., Vallini I., La Via L., Marchina E. and Barlati S. (2003) Glutamate receptor RNA editing: a molecular analysis of GluR2, GluR5 and GluR6 in human brain tissues and in NT2 cells following in vitro neural differentiation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 117, 168–178.
- Bass B. L. (2002) RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 817–846.
- Basso D. M., Beattie M. S. and Bresnahan J. C. (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* 12, 1–21.
- Brown K. M., Wrathall J. R., Yasuda R. P. and Wolfe B. B. (2004) Glutamate receptor subunit expression after spinal cord injury in young rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 152, 61–68.
- Choi D. W. (1994) Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog. Brain Res.* 100, 47–51.
- Desterro J. M., Keegan L. P., Lafarga M., Berciano M. T., O'Connell M. and Carmo-Fonseca M. (2003) Dynamic association of RNA editing enzymes with the nucleolus. *J. Cell Sci.* 116, 1805–1818.
- Desterro J. M., Keegan L. P., Jaffray E., Hay R. T., O'Connell M. A. and Carmo-Fonseca M. (2005) SUMO-1 modification alters ADAR1 editing activity. *Mol. Biol. Cell* 16, 5115–5126.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D. and Traynelis S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–61.
- Doe C. M., Relkovic D., Garfield A. S., Dalley J. W., Theobald D. E., Humby T., Wilkinson L. S. and Isles A. R. (2009) Loss of the imprinted snoRNA mbii-52 leads to increased 5htr2c pre-RNA

- editing and altered 5HT2CR-mediated behaviour. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2140–2148.
- Egebjerg J. and Heinemann S. F. (1993) Ca²⁺ permeability of dinedite and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 755–759. von Euler M., Seiger A., Holmberg L. and Sundstrom E. (1994) NBQX, a competitive non-NMDA receptor antagonist, reduces degeneration due to focal spinal cord ischemia. *Exp. Neurol.* 129, 163–168.
- Faden A. I. and Simon R. P. (1988) A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann. Neurol.* 23, 623–626.
- Faden A. I., Lemke M., Simon R. P. and Noble L. J. (1988) N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic, and neurochemical studies. *J. Neurotrauma* 5, 33–45.
- Faden A. I., Ellison J. A. and Noble L. J. (1990) Effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in spinal cord injury. *Eur. J. Pharmacol.* 175, 165–174.
- Feng Y., Sansam C. L., Singh M. and Emeson R. B. (2006) Altered RNA editing in mice lacking ADAR2 autoregulation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 480–488.
- Ferguson A. R., Christensen R. N., Gensel J. C., Miller B. A., Sun F., Beattie E. C., Bresnahan J. C. and Beattie M. S. (2008) Cell death after spinal cord injury is exacerbated by rapid TNF alpha-induced trafficking of GluR2-lacking AMPARs to the plasma membrane. *J. Neurosci.* 28, 11391–11400.
- Frigon A. and Rossignol S. (2006) Functional plasticity following spinal cord lesions. *Prog. Brain Res.* 157, 231–260.
- Gomez-Pinilla F., Tram H., Cotman C. W. and Nieto-Sampedro M. (1989) Neuroprotective effect of MK-801 and U-50488H after contusive spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 104, 118–124.
- Gorio A., Gokmen N., Erbayraktar S., Yilmaz O., Madaschi L., Cichetti C., Di Giulio A. M., Vardar E., Cerami A. and Brines M. (2002) Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 9450–9455.
- Gorio A., Madaschi L., Di Stefano B., Carelli S., Di Giulio A. M., De Biasi S., Coleman T., Cerami A. and Brines M. (2005) Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 16379–16384.
- Greger I. H., Khatri L. and Ziff E. B. (2002) RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 34, 759–772.
- Greger I. H., Khatri L., Kong X. and Ziff E. B. (2003) AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* 40, 763–774.
- Grossman S. D. and Wrathall J. R. (2000) The role of activity blockade on glutamate receptor subunit expression in the spinal cord. *Brain Res.* 880, 183–186.
- Grossman S. D., Wolfe B. B., Yasuda R. P. and Wrathall J. R. (1999) Alterations in AMPA receptor subunit expression after experimental spinal cord contusion injury. *J. Neurosci.* 19, 5711–5720.
- Grossman S. D., Rosenberg L. J. and Wrathall J. R. (2001) Relationship of altered glutamate receptor subunit mRNA expression to acute cell loss after spinal cord contusion. *Exp. Neurol.* 168, 283–289.
- Gwak Y. S., Kang J., Leem J. W. and Hulsebosch C. E. (2007) Spinal AMPA receptor inhibition attenuates mechanical allodynia and neuronal hyperexcitability following spinal cord injury in rats. *J. Neurosci. Res.* 85, 2352–2359.
- Hollmann M. and Heinemann S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31–108. Isaac J. T., Ashby M. and McBain C. J. (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54, 859–871.
- Jacobs M. M., Fogg R. L., Emeson R. B. and Stanwood G. D. (2009) ADAR1 and ADAR2 expression and editing activity during forebrain development. *Dev. Neurosci.* 31, 223–237.
- Kamboj S. K., Swanson G. T. and Cull-Candy S. G. (1995) Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J. Physiol.* 486 (Pt 2), 297–303.
- Kawahara Y., Ito K., Sun H., Aizawa H., Kanazawa I. and Kwak S. (2004) Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427, 801.
- Krampfl K., Schlesinger F., Zorner A., Kappler M., Dengler R. and Bufler J. (2002) Control of kinetic properties of GluR2 flopAMPA-type channels: impact of R/G nuclear editing. *Eur. J. Neurosci.* 15, 51–62.
- Kwak S. and Kawahara Y. (2005) Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Med. (Berlin, Germany)* 83, 110–120.
- Lambolez B., Ropert N., Perrais D., Rossier J. and Hestrin S. (1996) Correlation between kinetics and RNA splicing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in neocortical neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 1797–1802.
- Liu S. J. and Zukin R. S. (2007) Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* 30, 126–134.
- Lomeli H., Mosbacher J., Melcher T., Hoyer T., Geiger J. R., Kuner T., Monyer H., Higuchi M., Bach A. and Seeburg P. H. (1994) Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science (New York, NY)* 266, 1709–1713.
- Maas S., Melcher T., Herb A., Seeburg P. H., Keller W., Krause S., Higuchi M. and O'Connell M. A. (1996) Structural requirements for RNA editing in glutamate receptor pre-mRNAs by recombinant double-stranded RNA adenosine deaminase. *J. Biol. Chem.* 271, 12221–12226.
- Maas S., Patt S., Schrey M. and Rich A. (2001) Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 14687–14692.
- Maas S., Rich A. and Nishikura K. (2003) A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. *J. Biol. Chem.* 278, 1391–1394.
- Macbeth M. R., Schubert H. L., Vandemark A. P., Lingam A. T., Hill C. P. and Bass B. L. (2005) Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science (New York, NY)* 309, 1534–1539.
- Melcher T., Maas S., Herb A., Sprengel R., Higuchi M. and Seeburg P. H. (1996) RED2, a brain-specific member of the RNA-specific adenosine deaminase family. *J. Biol. Chem.* 271, 31795–31798.
- Michaelis E. K. (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54, 369–415.
- Monyer H., Seeburg P. H. and Wisden W. (1991) Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* 6, 799–810.
- Pfaffl M. W., Horgan G. W. and Dempfle L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
- Reenan R. A. (2001) The RNA world meets behavior: a→I pre-mRNA editing in animals. *Trends Genet.* 17, 53–56.
- Rosenberg L. J., Zai L. J. and Wrathall J. R. (2005) Chronic alterations in the cellular composition of spinal cord white matter following contusion injury. *Glia* 49, 107–120.
- Rueter S. M., Dawson T. R. and Emeson R. B. (1999) Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature* 399, 75–80.
- Ryman K., Fong N., Bratt E., Bentley D. L. and Ohman M. (2007) The C-terminal domain of RNA Pol II helps ensure that editing precedes splicing of the GluR-B transcript. *RNA (New York, NY)* 13, 1071–1078.
- Seeburg P. H. (2002) A-to-I editing: new and old sites, functions and speculations. *Neuron* 35, 17–20.
- Seeburg P. H., Higuchi M. and Sprengel R. (1998) RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26, 217–229.

- Shapiro S. (1997) Neurotransmission by neurons that use serotonin, noradrenaline, glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in the normal and injured spinal cord. *Neurosurgery* 40, 168–176; discussion 177.
- Slavov D. and Gardiner K. (2002) Phylogenetic comparison of the premRNA adenosine deaminase ADAR2 genes and transcripts: conservation and diversity in editing site sequence and alternative splicing patterns. *Gene* 299, 83–94.
- Sommer B., Keinänen K., Verdoorn T. A., Wisden W., Burnashev N., Herb A., Kohler M., Takagi T., Sakmann B. and Seeburg P. H. (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamateoperated channels of the CNS. *Science (New York, NY)* 249, 1580–1585.
- Swanson G. T., Feldmeyer D., Kaneda M. and Cull-Candy S. G. (1996) Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J. Physiol.* 492 (Pt 1), 129–142.
- Tan B. Z., Huang H., Lam R. and Soong T. W. (2009) Dynamic regulation of RNA editing of ion channels and receptors in the mammalian nervous system. *Mol. Brain* 2, 13.
- Vitali P., Basyuk E., Le Meur E., Bertrand E., Muscatelli F., Cavaille J. and Huttenhofer A. (2005) ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs. *J. Cell Biol.* 169, 745–753.
- Vollmar W., Gloger J., Berger E., Kortenbruck G., Kohling R., Speckmann E. J. and Musshoff U. (2004) RNA editing (R/G site) and flip-flop splicing of the AMPA receptor subunit GluR2 in nervous tissue of epilepsy patients. *Neurobiol. Dis.* 15, 371–379.
- Wahlstedt H., Daniel C., Enstero M. and Ohman M. (2009) Large-scale mRNA sequencing determines global regulation of RNA editing during brain development. *Genome Res.* 19, 978–986.
- Wong S. K., Sato S. and Lazinski D. W. (2001) Substrate recognition by ADAR1 and ADAR2. *RNA (New York, NY)* 7, 846–858.
- Wrathall J. R., Choiniere D. and Teng Y. D. (1994) Dose-dependent reduction of tissue loss and functional impairment after spinal cord trauma with the AMPA/kainate antagonist NBQX. *J. Neurosci.* 14, 6598–6607.
- Wrathall J. R., Teng Y. D. and Choiniere D. (1996) Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors. *Exp. Neurol.* 137, 119–126.
- Yang J. H., Nie Y., Zhao Q., Su Y., Pypaert M., Su H. and Rabinovici R. (2003) Intracellular localization of differentially regulated RNAspecific adenosine deaminase isoforms in inflammation. *J. Biol. Chem.* 278, 45833–45842.