



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
135° (2017), Vol. XLI, Parte II, Tomo I, pp. 41-58

ANTONINO CATTANEO*

La natura delle tracce della memoria nel cervello

Riassunto – Lo studio della mente ha costituito per secoli una sfida per filosofi e scienziati e rappresenta una delle frontiere intellettuali dell'umanità. Oggi il programma scientifico delle Neuroscienze ha posto solide basi per affrontare lo studio del cervello sulla base dell'attività biochimica e biofisica delle cellule nervose, delle sinapsi e dei circuiti nervosi, gettando un ponte tra i livelli molecolari e cellulari ed il livello delle funzioni cognitive superiori. Lo studio della memoria costituisce una delle frontiere attuali delle Neuroscienze, sia perché fenomeni di memoria, in una forma od un'altra, sono alla base di tutte le funzioni cognitive, sia perché le patologie neurodegenerative legate alla perdita di memoria, in primis la malattia di Alzheimer, costituiscono un gravissimo problema, ancora non risolto. Nella relazione viene discussa la natura molecolare e cellulare delle tracce di memoria che si formano nel nostro cervello (i cosiddetti engrammi). Nonostante gli enormi successi della ricerca recente nella comprensione delle tracce di memoria e dei meccanismi della plasticità sinaptica, che sono alla base della memoria, questa conoscenza non si è ancora tradotta in una soddisfacente terapia per la malattia di Alzheimer. Si individuerà nell'unificazione tra lo studio della fisiologia e della patologia dei meccanismi e dei circuiti della memoria l'indirizzo per la ricerca futura, in questo campo di frontiera.

Introduzione

Lo studio della mente ha costituito per secoli una sfida per filosofi e scienziati e rappresenta delle grandi frontiere intellettuali dell'umanità. Le Neuroscienze del ventesimo secolo hanno insegnato che le attività della mente, i nostri pensieri, le nostre azioni e le nostre emozioni, nascono dal cervello, che determina i nostri stati

* Socio dell'Accademia dei XL. Scuola Normale Superiore (Pisa) e European Brain Research Institute (Roma). E.mail: a.cattaneo@ebri.it

** Prolusione tenutasi durante la Seconda Assemblea Annuale dei Soci, Roma 8 novembre 2017, Biblioteca dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, Scuderie Vecchie di Villa Torlonia.

mentali, assieme al corpo che «lo contiene». Il cervello umano, con le sue 10^{11} cellule nervose, almeno altrettante cellule gliali e 10^{14} connessioni sinaptiche, è probabilmente il sistema più complesso del nostro universo conosciuto.

Ogni nostro pensiero, ogni parola pronunciata, ogni azione intrapresa, ogni emozione, richiedono una comune capacità di ricordare e di immagazzinare le proprie esperienze vissute. I processi mnemonici (dalla memoria non dichiarativa, o implicita, a quella dichiarativa, dalla memoria episodica alla memoria di lavoro) costituiscono un collante comune che consolida la nostra vita mentale, un meccanismo comune e necessario che unifica la nostra storia personale, è alla base della nostra identità personale e permette di crescere e cambiare nel corso della vita.

Cosa succede nel cervello quando ricordiamo qualcosa? Di cosa è fatta «la materia dei ricordi»? Dove sono localizzati i ricordi? Dove sono «le stanze della memoria» e come sono organizzate? ma, soprattutto, come viene scritta la memoria? Quale è la «tecnologia di scrittura» con cui le memorie vengono scolpite nel cervello? Quali sono i meccanismi cellulari e molecolari su cui viene costruita la memoria? E come viene letta questa scrittura cerebrale, quando richiamiamo alla mente un ricordo? Oggi la ricerca comincia a fornire risposte a queste domande (Poo *et al* 2015).

Lo studio della memoria e dei suoi meccanismi si può concettualmente dividere in due aspetti e due livelli differenti. Il primo riguarda come viene rappresentata e codificata l'informazione che viene immagazzinata e ricordata. Si tratta quindi di un problema di rappresentazione e codificazione neurale. Il secondo livello di studio della memoria riguarda le modificazioni permanenti e durature che avvengono nel cervello quando ricordiamo, ovvero lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari che avvengono nei circuiti nervosi nel corso di processi di apprendimento e memoria.

Anche se i due livelli non possono essere del tutto separati, in questa relazione verrà trattato e discusso, in termini generali, il secondo livello, ovvero il tema della natura molecolare della traccia mnemonica.

To γραμματειον, la tavoletta di cera: scrivere nel cervello

Per secoli il cervello è stata una scatola nera, ed i processi mentali quali la conoscenza, la memoria, le emozioni, la percezione, sono stati oggetto di studio preferito dei filosofi, gli antichi neuroscienziati. Nelle riflessioni sulla memoria, famosa è la metafora della tavoletta di cera (*το γραμματειον* coniata da Platone nel Teeteto¹, poi

¹ «Supponi che vi sia nella nostra anima una cera impressionabile, in alcuni più abbondante, in altri meno, più pura negli uni, più impura negli altri... È un dono, diciamo, della madre delle Muse, Mnemosune: tutto ciò che desideriamo conservare nella memoria di ciò che abbiamo udito, visto o concepito si imprime su questa cera che noi presentiamo alle sensazioni o alle concezioni. E di ciò che si imprime noi ne conserviamo memoria e scienza finché ne dura l'immagine... Diciamo che in essa qualsiasi cosa noi vogliamo memorizzare delle cose che abbiamo visto o udito o pensato da noi stessi, ponendo questa tavoletta stessa sotto le percezioni e i pensieri, s'incida,

ripresa da Aristotele (*De anima*), che descrive molto bene l'idea che un processo di scrittura, di natura indefinita, debba avvenire quando noi percepiamo, impariamo e poi ricordiamo qualcosa. La tavoletta di cera vuole rappresentare il concetto di supporto per una «tecnologia» di scrittura, di modificazione durevole, e quindi di successiva lettura di una informazione memorizzata. La tavoletta di cera costituisce, appunto, il supporto di questo processo di scrittura sulla nostra «anima».

Non è in questa sede che si può approfondire il contributo che i filosofi, nel corso dei secoli, hanno dato al tema della memoria, da Agostino (dimensione del tempo e della durata nella memoria), a Locke (memoria e identità personale) a Cartesio² a tantissimi altri, ma giova sottolineare come questa metafora della traccia, e della sua scrittura, sia stata estremamente evocativa ed abbia influenzato le riflessioni e le ricerche su questo tema sino ai giorni nostri.

Gli anni d'oro della ricerca sulla psicologia della memoria

A cavallo tra la fine del XIX e l'inizio del XX secolo, è stata la ricerca di psicologi come Hermann Ebbinghaus, Theodule Ribot, William James, Ivan Pavlov ed altri a porre le basi della ricerca moderna sulla memoria su solide basi sperimentali, descrivendone una fenomenologia in condizioni controllate. Questi studi hanno prodotto idee e stabilito alcuni importanti principi sulle proprietà del sistema della memoria che restano fondamentali per le ricerche contemporanee. Per ciò che riguarda il tema di questo articolo, ovvero la natura fisica della traccia mnestica, fu in questo periodo che furono poste le basi della concezione moderna, secondo la quale la ritenzione della memoria di una esperienza non derivasse da una misteriosa proprietà mentale, bensì da una modificazione fisica di un substrato biologico preciso («it was a purely physical phenomenon, a morphological feature...» James 1890).

Ai cosiddetti anni d'oro dello studio psicologico della memoria contribuirono anche in modo significativo studi clinici di pazienti amnesici per varie cause (neurologi come Korsakoff, Alzheimer, e più tardi Brenda Milner), contribuendo così a definire amnesie retrograde (incapacità di fissare i ricordi degli avvenimenti successivi all'inizio della malattia) ed amnesie anterograde (incapacità di rievocare gli avvenimenti successivi all'inizio della malattia).

come se imprimessimo segni di anelli, e che ciò che sia impresso noi lo ricordiamo e conosciamo, finché in essa sia presente l'immagine di tale cosa, mentre ciò che sia stato cancellato o non sia stato in grado d'imprimersi, sia dimenticato e non conosciuto». Platone, *Teeteto*.

² «... quando la mente vuole ricordare qualcosa, questo atto di volontà causa la piccola ghiandola pineale... a spingere gli spiriti animali verso differenti parti del cervello, finché questi entrano in contatto con le parti dove sono state lasciate le tracce di ciò che si vuole ricordare queste tracce altro non sono che i pori del cervello attraverso cui gli spiriti hanno già intrapreso il loro percorso in risposta alla presentazione dell'oggetto (che si vuole ricordare), hanno pertanto acquisito una maggiore facilità rispetto agli altri ad essere aperti di nuovo, nello stesso modo, dagli spiriti che vengono a loro; così gli spiriti che si avvicinano a questi pori, vi entrano più prontamente che negli altri...» Cartesio *Le passioni dell'anima* 1649 art. 42.

nimenti che hanno preceduto l'esordio della malattia e che già facevano parte del patrimonio mnestico), sia pure in assenza di qualsiasi informazione che permettesse di collegare i fenomeni di memoria a specifici meccanismi.

Il concetto di traccia mnestica come una traccia «scritta» nel cervello, in conseguenza di processi di apprendimento e memoria, è stato formulato in modo chiaro e diretto da Richard Semon (Semon 1921) con la cosiddetta teoria degli «engrammi», secondo la quale quando si forma una memoria, un gruppo di neuroni viene eccitato e modificato, restando eccitato in modo latente, pronto ad essere richiamato da stimoli adeguati (che, appunto, evocano la memoria stessa). Questa rivisitazione novecentesca della metafora platonica, da parte di Semon, ha avuto il merito di attribuire basi biologiche, ancorché ignote, alla traccia mnestica ed a questo processo di scrittura della traccia, dando un vocabolo a questi concetti: l'engramma³ (ed engrafia, il corrispondente processo di scrittura). Nonostante la chiarezza ed il valore predittivo della teoria della memoria di Semon, le neuroscienze del tempo non erano pronte a metterla direttamente alla prova.

La ricerca sulla natura della traccia, dell'engramma, è entrata così a far parte del programma scientifico delle Neuroscienze sperimentali, ma è stato solo di recente, come vedremo, che i progressi delle conoscenze e delle tecniche sperimentali hanno permesso di dimostrare in modo conclusivo la natura e le proprietà molecolari e cellulari delle tracce mnestiche (Mayford 2013).

Così, la traccia mnestica è passata da una metafora filosofica ad una grandezza definita operativamente dagli psicologi, ma misurabile solo indirettamente, attraverso esperimenti comportamentali, fino a diventare, per le neuroscienze moderne, una grandezza osservabile e misurabile direttamente. Questo ha reso possibile oggi individuare le tracce mnestiche e sviluppare metodi sperimentali per collegare causalmente manipolazioni sperimentali della traccia stessa agli effetti sulla memoria (Tonegawa *et al* 2015; Josselyn *et al* 2015).

La traccia è dinamica e labile

Prima ancora che il tema della identificazione e della caratterizzazione molecolare e cellulare della traccia mnestica fosse divenuto aggredibile dal punto di vista sperimentale, le ricerche sulla neuropsicologia della memoria hanno permesso di stabilire alcuni aspetti importanti sulla natura della traccia stessa. In questi studi di psicologia sperimentale, la traccia non è una entità fisicamente definita, ma definita solo operativamente.

³ Semon definisce *engramma* «...the enduring though primarily latent modifications in the irritable substance produced by a stimulus...». Definisce poi *ecforia* quel processo che «...awakens the mnemonic trace or engram out of its latent state into one of manifested activity...». Il processo di ecforia è quindi identificabile con il processo di richiamo della memoria.

Ad esempio, l'idea stessa di una traccia fissa e cristallizzata, è stata sostituita da una concezione molto più dinamica, e per certi versi labile, della traccia di memoria.

Secondo questo punto di vista, è opinione corrente che esista una doppia traccia di memoria: una traccia a breve termine, più transitoria, che si cancella rapidamente, a meno che non si sia consolidata in una traccia a lungo termine, duratura, che non necessariamente ha la stessa localizzazione anatomica. La teoria del consolidamento descrive questa transizione e stabilisce che le tracce mnestiche siano inizialmente vulnerabili, per un breve periodo dopo la loro «scrittura», e che col tempo divengano stabili e resistenti ad interferenze. Così una traccia mnestica può essere in uno stato definito attivo, nel quale è più vulnerabile ad interferenze esterne, oppure in uno stato inattivo, dormiente (le tracce consolidate a lungo termine). Ma ora sappiamo che anche questa traccia consolidata è labile. Infatti, il semplice richiamo alla mente di una memoria apre una finestra temporale transitoria, durante la quale la memoria stessa diviene vulnerabile, rispetto ad agenti amnesici o ad altri interventi, un fenomeno detto riconsolidamento (Nader *et al* 2000). Richiamare o riattivare una memoria riapre una finestra temporale nella quale la traccia ritorna in uno stato attivo, labile, durante il quale può venire cambiata ed alterata (scrivere sulla traccia), prima che essa si riconsolidi. L'engramma è quindi un bersaglio mobile, che cambia al cambiare di cicli successivi di consolidamento e riconsolidamento.

Il primo ad intraprendere uno studio sistematico alla ricerca dell'engramma, compiendo lesioni nel cervello di roditori e cercando di associare i siti delle lesioni con la capacità delle cavie ad imparare un compito di memoria spaziale, fu Karl Lashley (Lashley 1950). Tuttavia, i risultati dello studio sistematico di Lashley «in search of the engram» furono negativi, inconclusivi e scoraggiarono ulteriori ricerche in tal senso, perché le tecniche sperimentali dell'epoca non erano ancora adeguatamente sviluppate. I tempi non erano ancora maturi.

Il paradigma della plasticità sinaptica e neuronale

Per poter investigare la natura molecolare e cellulare della traccia mnestica, si è dovuto attendere che i successi della neurofisiologia, nei suoi anni d'oro '50-'80, abbiano permesso di comprendere le basi biofisiche della eccitabilità neuronale, le proprietà elettriche passive ed attive dei neuroni, ed i meccanismi biofisici e molecolari della trasmissione sinaptica.

Le neuroscienze attuali sono fondate su un paradigma esplicito, ovvero che il substrato cellulare delle funzioni cognitive superiore risieda nella integrazione delle migliaia di contatti sinaptici che ogni cellula nervosa contrae con le cellule vicine, determinando così il «cablaggio» anatomico dei circuiti cerebrali. La rete delle connessioni sinaptiche che collegano tra di loro le differenti popolazioni neuronali nelle varie aree cerebrali costituisce così il substrato fisico che implementa le funzioni cognitive del nostro cervello e che si viene a costituire nel corso dello sviluppo embrionale e nelle fasi neonatali. Nell'uomo, la sinaptogenesi dura parecchi anni, e

sulla base del numero di sinapsi presenti nel cervello adulto, si può calcolare che nel cervello di un bambino si formino qualche milione di nuove sinapsi per secondo.

Anche nel cervello adulto, tale rete di connessioni sinaptiche non è staticamente determinata, ma costituisce una struttura dinamica, che si modifica costantemente, in risposta all'attività neuronale, alle stimolazioni sensoriali, ed a molti altri fattori.

L'idea che modificazioni dinamiche della efficacia tra le connessioni sinaptiche costituiscano un possibile meccanismo per i fenomeni di apprendimento nel cervello fu avanzata, su base puramente speculativa, dal grade neuroscienziato spagnolo Ramon J Cajal, ma fu poi ripresa in modo diretto ed esplicito, anche se ancora speculativo, da Donald Hebb (Hebb 1949). Hebb propose che il meccanismo con cui le memorie vengono immagazzinate sia costituito da una modificazione della forza delle sinapsi, secondo un meccanismo, detto appunto «meccanismo hebbiano», secondo il quale una coincidenza tra l'attività di un neurone presinaptico e quella di un neurone post sinaptico determinerebbe il rafforzamento della efficacia sinaptica tra le due cellule («cells that fire together wire together»).

Le modificazioni dinamiche della comunicazione tra i neuroni e della trasmissione sinaptica, prendono il nome di «plasticità neuronale e plasticità sinaptica», un insieme di meccanismi che influenzano in senso positivo o negativo l'efficacia della trasmissione sinaptica su scale temporali molto diverse, dai millisecondi ai mesi o anni. La plasticità sinaptica costituisce così il fenomeno elementare che accomuna tra di loro processi cerebrali distinti, costituendo il substrato cellulare per i fenomeni di apprendimento e memoria: indipendentemente dal sistema cerebrale reclutato in un particolare fenomeno di apprendimento, le memorie che ne derivano vengono immagazzinate sotto forma di cambiamenti della forza di numerose sinapsi all'interno dei gruppi di neuroni reciprocamente connessi, che rappresentano e codificano quella particolare informazione.

Negli ultimi tre decenni, la congettura che la traccia mnestica sia costituita da specifici cambiamenti nella efficacia sinaptica (o, come si dice colloquialmente, nella «forza» delle sinapsi) è stata affrontata utilizzando un approccio riduzionistico, studiando sistemi sperimentali semplici: dallo studio di semplici riflessi appresi e modificati dall'esperienza, in organismi semplici (quali l'invertebrato *Aplysia californica*) (Kandel 2001) allo studio della cosiddetta Long Term Potentiation (LTP) (Bliss and Lomo 1973) e Long Term Depression (LTD) (Malenka and Bear 2004) in fettine di ippocampo di mammifero.

Kandel ha studiato un semplice riflesso difensivo nella lumaca di mare *A. californica*, il cosiddetto riflesso di ritrazione delle branchie. Tale riflesso può essere modificato dall'esperienza (e quindi dall'apprendimento) e queste modificazioni, al cessare delle stimolazioni che le hanno causate, vengono mantenute (e quindi ricordate) per un tempo molto lungo. Si tratta quindi di un semplicissimo esempio di memoria a lungo termine. Kandel e collaboratori hanno quindi localizzato il sito della traccia di memoria nelle sinapsi coinvolte in questo semplice riflesso. I meccanismi cellulari e molecolari di questo semplice fenomeno si sono rivelati estremamente fecondi per

ispirare e guidare la ricerca dei meccanismi in sistemi sperimentali più complessi, quali il potenziamento sinaptico a lungo termine nel cervello dei mammiferi, mostrando principi generali molto simili.

Lo studio di questi semplici sistemi modello ha reso possibile la comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari della plasticità sinaptica e ha fornito uno schema interpretativo e conoscitivo unificante dei fenomeni che avvengono nel cervello a livello più macroscopico, nel corso dei processi di memoria ed apprendimento. Secondo questo nuovo paradigma, che costituisce una sintesi unificante, le sinapsi ricorrono ad un limitato repertorio di meccanismi, variamente combinati tra di loro, per modulare e regolare a lungo termine la forza e l'efficacia delle loro connessioni, in funzione della attività neuronale. Un aumento della efficacia della trasmissione sinaptica significa che, a parità di stimolo presinaptico, la risposta post-sinaptica è aumentata, e questo aumento può essere transitorio o persistente nel tempo. La facilitazione sinaptica si può manifestare con modificazioni a livello presinaptico (ad esempio aumentato rilascio di neurotrasmettitore) oppure a livello post-sinaptico (ad esempio un aumentato numero di recettori sinaptici, oppure un aumento della loro conduttanza). Alcune forme di plasticità sinaptica sono tipicamente Hebbiane, nel senso che la facilitazione sinaptica a lungo termine si instaura soltanto quando il neurone presinaptico ed il neurone post-sinaptico sono simultaneamente attivi. Responsabile di questo tipo di plasticità è un recettore post-sinaptico per il glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio nel Sistema nervoso centrale, il cosiddetto recettore NMDA. Questo recettore post-sinaptico «di coincidenza» si attiva in risposta al legame del glutammato (attivazione della cellula presinaptica) solo se la membrana della cellula postsinaptica è depolarizzata. L'attivazione del recettore NMDA attiva una cascata di eventi che portano al potenziamento a lungo termine della sinapsi in oggetto. Il meccanismo della plasticità NMDA-dipendente è una tipica realizzazione biologica, ben dimostrata, della congettura hebbiana. Le modificazioni sinaptiche a lungo termine possono avere un segno positivo (Long Term Potentiation, LTP) o segno negativo (Long Term Depression, LTD) (Malenka and Bear 2004).

Alla plasticità sinaptica funzionale, corrisponde poi anche una plasticità cosiddetta strutturale, che coinvolge la crescita di nuove spine dendritiche in corrispondenza delle sinapsi facilitate funzionalmente (Yuste 1995).

Una proprietà fondamentale della plasticità sinaptica è la cosiddetta «specificità sinaptica»: la facilitazione sinaptica a lungo termine che si instaura a seguito della stimolazione di una sinapsi è specifica per la sinapsi stimolata e non si estende alle sinapsi vicine o alle altre sinapsi appartenenti allo stesso neurone (Kandel 2001). Anche se i limiti spaziali della specificità sinaptica sono oggi oggetto di attiva ricerca e discussione (si vedano ad esempio le cosiddette *clustered plasticity*, Kastellakis *et al* 2015, e *dendritic branch plasticity*, Govindarajan *et al* 2011), un neurone ha la possibilità di regolare la efficacia delle proprie sinapsi in modo indipendente le une dalle altre. L'indipendenza delle singole sinapsi di un neurone pone un interessante

problema di biologia cellulare e costituisce una proprietà di cui occorre tenere conto per spiegare i meccanismi di regolazione della efficacia sinaptica.

Secondo questo paradigma corrente (Kandel 2001, Takeuchi *et al* 2014), la plasticità sinaptica viene quindi a configurarsi come una vera e propria traccia scritta nel cervello, una modificazione duratura e misurabile che scolpisce il cervello nelle sue interazioni con l'ambiente e nel suo funzionamento. Alcune proprietà dei fenomeni di plasticità sinaptica sono molto rilevanti per la ricerca sugli engrammi, in particolare la transizione delle modificazioni di efficacia sinaptica da breve termine a lungo termine.

Transizione da memoria a breve a memoria a lungo termine: un dialogo tra sinapsi e geni

I fenomeni di plasticità a breve termine, nei quali le modificazioni di efficacia sinaptica decadono su una scala temporale abbastanza rapida, di secondi o minuti, al cessare delle stimolazioni che le hanno generate, dipendono da *modificazioni post-traduzionali a carico di proteine già espresse dalle sinapsi coinvolte*: ad esempio, la fosforilazione di canali ionici, di recettori post-sinaptici, di proteine presinaptiche coinvolte nel rilascio di neurotrasmettitore o di proteine post-sinaptiche che regolano vie di segnalazione intracellulare. La scala di tempo della durata dei cambiamenti sinaptici è pertanto determinata e limitata dalla scala dei tempi del turnover delle proteine sinaptiche e delle loro modificazioni post-traduzionali dipendenti dall'attività elettrica e sinaptica.

Come è possibile che questo cambiamento intrinsecamente transitorio diventi permanente e duraturo nel tempo? Come avviene la transizione delle modificazioni di efficacia sinaptica da modificazioni a breve termine a lungo termine? Quale è il meccanismo che trasforma un segnale sinaptico transitorio in un cambiamento permanente della efficacia sinaptica? Dal punto di vista concettuale, la risposta a questa domanda richiede che la composizione proteica della sinapsi sia modificata in modo duraturo, e che tale modifica del proteoma sinaptico persista nel tempo, in modo indipendente dalla stimolazione che l'ha generata, in modo tale che le modificazioni post-traduzionali responsabili per la *short term plasticity* siano rese immune dal loro naturale turnover. In tutti gli esempi di plasticità che si conoscono, si è visto sperimentalmente che questa transizione da breve a lungo termine viene bloccata da inibitori della trascrizione di RNA e da inibitori della sintesi proteica. In altri termini, la transizione della memoria da breve a lungo termine richiede l'instaurarsi, in quel neurone, di *un nuovo programma di espressione genica* (innescato dalla rapida neo-trascrizione degli «immediate early genes» (IEG), tra cui *zif/268*, *c-fos*, *Arc/arg3.1*), che porta alla trascrizione di una serie di «Plasticity Related mRNA», che supportano i cambiamenti del proteoma sinaptico necessari per mantenere la facilitazione sinaptica a lungo termine. Così, l'attivazione sinaptica innesca l'attivazione di un nuovo programma trascrizionale, e questa attivazione è necessaria per l'instaurarsi dei cambiamenti a lungo termine. Questo implica che ci sia una fitta comunicazione e scambio

di segnali chimici anterogradi e retrogradi tra le sinapsi ed il nucleo, che comunicano al nucleo le «necessità» delle sinapsi, in relazione al loro stato di attivazione: quello che Kandel chiama un intenso «*dialogo tra sinapsi e geni*» (Kandel 2001).

Questo importante risultato implica un collegamento diretto tra l'attività elettrica e sinaptica dei neuroni e la modulazione della sua espressione genica, chiamando in gioco quei complessi meccanismi molecolari coinvolti nel controllo dell'espressione genica. Così, un neurone «che ha imparato», ed è coinvolto quindi in un processo di memoria, si trova in uno stato trascrizionale differente dal suo stato vergine (che possiamo considerare il suo «stato fondamentale»), uno stato trascrizionale che realizza lo stato sinaptico facilitato (o inibito). La plasticità sinaptica a lungo termine, ed i suoi aspetti duraturi, sono pertanto implementati da meccanismi di plasticità trascrizionale e dall'innescò di una memoria trascrizionale, che coinvolgono *meccanismi epigenetici di controllo trascrizionale*.

Vi è, in questo meccanismo, una analogia concettuale, ma quindi anche sostanziale, con i cambiamenti di espressione genica responsabili per il differenziamento cellulare nel corso dello sviluppo di un organismo e per il controllo della staminalità e della pluripotenza cellulare. Da una visione del cervello come organo prettamente elettrico e sede di rapidi segnali elettrici, questo dialogo tra sinapsi e geni prospetta, invece, un organo in cui esistono molteplici scale temporali gerarchicamente interconnesse, che implicano, e collegano tra di loro, meccanismi elettrici, biochimici ed epigenetici.

La formazione delle tracce mnestiche è al centro di questo dialogo tra sinapsi e geni.

Memorie molecolari, tagging sinaptico e controllo locale della sintesi proteica

Si è visto come la transizione di un fenomeno di plasticità sinaptica (e quindi di un apprendimento motorio, comportamentale, o di una memoria) da *breve termine* al suo consolidamento a *lungo termine*, coinvolge in modo essenziale cambiamenti di espressione genica, che rendono duraturi e persistenti i cambiamenti molecolari innescati dall'attività sinaptica. Il dialogo molecolare tra le sinapsi ed il nucleo, dove risiede il DNA della cellula, è così il processo chiave sul quale oggi ci si interroga, per affrontare lo studio della plasticità sinaptica.

Questo fatto sperimentale, ormai ben consolidato, pone però un problema, ed una importante domanda biologica, che nasce dal fatto che i fenomeni di plasticità sinaptica sono *sinapsi-specifici*. Dato che la modulazione dell'espressione genica, necessaria per la scrittura della traccia sinaptica a lungo termine, avviene a livello del DNA, nel nucleo della cellula nervosa, e riguarda quindi l'intera cellula (e quindi tutte le migliaia delle sue sinapsi), *come è possibile che singole sinapsi o sottogruppi di sinapsi di una stessa cellula nervosa possano essere modificate indipendentemente le une dalle altre?*

Infatti, il nucleo, ed il genoma che esso contiene, è una risorsa che riguarda la

cellula nella sua interezza, mentre gli mRNA neo-trascritti in risposta alla attivazione sinaptica devono agire selettivamente sulle sinapsi attivate e non sulle altre sinapsi della stessa cellula nervosa.

La risposta a questo problema di biologia cellulare risiede nella scoperta che i neuroni sono in grado di *de-localizzare la sintesi proteica alle terminazioni sinaptiche* (sia pre- che post-sinaptiche). Infatti mentre, in generale, la sintesi proteica ha luogo sui ribosomi presenti nel corpo cellulare, nei neuroni invece la sintesi proteica può avvenire in corrispondenza delle terminazioni sinaptiche, che contengono tutto l'apparato biochimico per la sintesi proteica (ribosomi, reticolo endoplasmico, Golgi - Sutton and Schuman 2006). Nei neuroni, gli mRNA che codificano per proteine destinate a modulare l'efficacia sinaptica sono trasportati nei dendriti (Tongiorgi *et al* 1997) ed anche negli assoni (Giuditta *et al* 2002), in modo traduzionalmente represso: pertanto le corrispondenti proteine non sono sintetizzate in assenza di uno stimolo sinaptico. La cellula nervosa ha quindi modo di regolare selettivamente la composizione proteica di singole sinapsi, in funzione della loro attività elettrica, mediante il *controllo locale della sintesi proteica* (Sutton and Schuman 2006), unito ad un sistema molecolare di *tagging sinaptico*, di etichettatura sinaptica (Redondo and Morris 2011). Secondo questo meccanismo, una stimolazione sinaptica destinata a generare una risposta duratura a lungo termine genera, un tag, un'etichetta sinaptica ed un segnale biochimico dalla sinapsi al nucleo, ed inoltre attiva la sintesi proteica locale degli mRNA localizzati alla sinapsi. Il segnale al nucleo serve ad attivare la neo trascrizione dei Plasticity Related mRNAs, che vengono poi trasportati alle sinapsi. Il tag sinaptico, invece, è costituito da una sorta di memoria molecolare innescata dalla attività sinaptica, che si auto alimenta (ad esempio con la fosforilazione autocatalitica di una chinasi sinaptica Calcio-dipendente come la Calcio-Calmodulina chinasi, CaMKII), e serve a marcare quella sinapsi, affinché catturi e traduca i nuovi «Plasticity related mRNA» che arrivano dal nucleo.

Con questo meccanismo, che comprende sia elementi di controllo globale (trascrizione nucleare e regolazione epigenetica della cromatina) che locale (tag sinaptico e controllo locale della sintesi proteica), gli mRNA trascritti nel nucleo in modo dipendente dalla attività sinaptica, potranno esercitare i loro effetti selettivamente sulle sinapsi stimulate.

Il quadro presentato, che rappresenta il paradigma corrente per ciò che riguarda la plasticità sinaptica, dice che la formazione di una traccia duratura coinvolge il rafforzamento di connessioni sinaptiche tra neuroni coinvolti nella rappresentazione e codificazione di una informazione. Ci si può quindi ragionevolmente attendere che lo stesso schema spazio-temporale di attivazioni neuronali e sinaptiche avvenuto durante la codificazione si ricostituirà durante il richiamo di una memoria corrispondente a quella codificazione. Ci si può quindi attendere che vi sia una corrispondenza tra l'attività neurale in una certa area cerebrale rilevante durante la codificazione di una memoria e durante il richiamo della memoria stessa. Ci si può anche attendere che l'attività di differenti di gruppi di neuroni corrisponda a

engrammi differenti, secondo uno schema di codificazione combinatoria (si dice «sparse coding» se il numero di neuroni che partecipano ad una certa codificazione non è troppo elevato, rispetto al numero totale dei neuroni in quell'area). Queste ipotesi sono alla base delle recenti strategie sperimentali adottate con successo, per la identificazione e manipolazione delle cellule engramma, che vanno sotto il nome di «engram technologies».

Alla ricerca degli engrammi: identificazione, necessità e sufficienza

Alla luce di quanto detto, quali strategie possiamo adottare, per identificare e manipolare le cellule che costituiscono l'engramma di una memoria? Come identificare combinazioni di cellule la cui attivazione codifichi una data memoria, per porre poi, successivamente domande di necessità e sufficienza, attraverso opportune manipolazioni sperimentali?

Una soluzione per rispondere a queste importanti domande è costituita dalla identificazione dei neuroni che sono stati attivi durante la codificazione delle informazioni da memorizzare (fase di training), attraverso la loro marcatura genetica permanente. Questo permetterebbe di visualizzare questi neuroni successivamente alla fase di consolidamento, quando l'engramma è verosimilmente in uno stato dormiente inattivo. Questa identificazione è stata ottenuta recentemente attraverso strategie genetiche di cattura neuronale, che si basano sul fatto che, quando un neurone viene stimolato sinapticamente, viene indotta una forte attivazione trascrizionale degli *immediate early genes* (IEG) (c-fos, zif-269 ed Arc/arg3.1). Infatti, l'analisi della espressione di questi IEG può essere utilizzata per identificare le popolazioni neuronali attive durante la codificazione di una memoria («activity mapping»). Tuttavia, l'espressione del mRNA e delle proteine degli IEG endogeni è transitoria, e ritorna ai bassi livelli di base pochi minuti dopo la loro attivazione. Per marcare geneticamente in modo permanente le cellule attivate durante la codificazione, si può utilizzare il promotore di un IEG, per guidare la trascrizione di un gene reporter, la cui attività resta elevata più a lungo, marcando quindi in modo permanente quei gruppi di neuroni che sono stati attivati durante la codificazione (Reijmers *et al* 2007). Ovviamente, la marcatura permanente (genetic activity tagging) deve essere ristretta ad una particolare finestra temporale, per evitare che il sistema si saturi rapidamente, per il sovrapporsi di attività in risposta a stimoli differenti. Ciò è stato ottenuto con alcuni ingegnosi artifici sperimentali (TetTag method, Reijmers *et al* 2007) o TRAP (targeted recombination in active populations, Denny *et al* 2014; Guenther *et al* 2013), nei quali la finestra di opportunità per attivare la marcatura genetica di presunte cellule engramma (la cui attività è accesa dalla codificazione di un certo stimolo) è aperta dalla sottrazione o somministrazione di doxiciclina o tamoxifen, rispettivamente.

Se con questi metodi si confrontano le popolazioni neuronali attivate durante la codificazione di un compito di memoria, con quelle attivate qualche tempo dopo, durante il richiamo alla memoria, si vede che le due popolazioni hanno una sovrapp-

posizione significativa. Possiamo quindi manipolare questi neuroni, per domandarci se essi facciano effettivamente parte dell'engramma.

a) Condizione di necessità (*loss-of-function*): cancellazione selettiva di una specifica memoria

L'esperimento risponde alla domanda se la eliminazione o l'inibizione dell'attività di una presunta popolazione neuronale di cellule engramma impedisca la espressione della memoria corrispondente. Il reclutamento di un neurone in un engramma è soggetto a meccanismi di competizione tra i neuroni vicini, e si è visto che neuroni con livelli più alti del fattore di trascrizione CREB hanno una probabilità maggiore di essere reclutati nel corrispondente engramma (Han *et al* 2007). Questo fenomeno è alla base della strategia detta «*allocate-and-erase*», che permette di interrogarsi sulla necessità di una presunta popolazione di cellule engramma per sostenere una corrispondente memoria. L'espressione di un gene tossico (Han *et al* 2009), oppure di un gene inibitore dell'attività elettrica (Zhou *et al* 2009) in questi neuroni, dopo la fase di apprendimento in un compito di condizionamento alla paura, risulta nella abolizione della memoria di paura associata a questo apprendimento. Simili esperimenti sono stati effettuati mediante il tagging genetico permanente di presunte cellule engramma (Strategia *Tag-and-erase*), come visto sopra, esprimendo inibitori dell'attività nervosa (DREADDs chemogenetic receptors) in cellule attive al momento della codificazione di un compito di apprendimento di *contextual fear conditioning*, condizionamento contestuale della paura. Il successivo silenziamento elettrico di questi neuroni engramma, marcati geneticamente, risulta nella inibizione della risposta comportamentale di paura al contesto condizionante (Denny *et al* 2014). Questi deficit di memoria si osservano fino a settimane dopo l'apprendimento, mostrando la persistente necessità di queste cellule engramma, per quello specifico compito di memoria (ma non per altri compiti di memoria né per paure associate ad altri contesti). Nel loro insieme, questi esperimenti mostrano che la distruzione o inibizione delle popolazioni neuronali, identificate e catturate geneticamente come descritto, distrugge una specifica memoria in modo selettivo, dimostrando così che esse fanno obbligatoriamente parte di un engramma e che l'engramma è *necessario* per quella specifica memoria.

b) Condizione di sufficienza (*gain-of-function*): riattivazione artificiale di una memoria

Tipicamente, una memoria emerge quando una traccia latente viene risvegliata da un indizio, un richiamo esterno. Recentemente Tonegawa ha fornito una dimostrazione molto convincente di riattivazione artificiale di una memoria, attraverso la stimolazione artificiale di un engramma, precedentemente marcato dai metodi di «cattura genetica» descritti sopra, in assenza di indizi di richiamo esterni (Liu *et al* 2012). Questi studi sono diventati tecnicamente possibili con l'avvento dei metodi

optogenetici (Deisseroth 2011), ovvero con l'espressione di canali ionici sensibili alla luce (Channel Rhodopsin ChR2) nelle presunte cellule engramma.

Combinando la marcatura genetica dipendente dall'attività, mediante il sistema c-fos tTA regolato dalla doxiciclina (Reijmers *et al* 2007), con la stimolazione optogenetica dipendente dalla luce, mediata dall'espressione della sonda ChR2 nelle cellule marcate, Liu *et al* (2012) sono riusciti a marcare una popolazione sparsa di neuroni nel giro dentato dell'ippocampo di topi che sono stati sottoposti ad un compito di memoria di «*contextual fear conditioning*» (CFC), ovvero di un condizionamento alla paura in cui uno shock è associato ad un determinato contesto spaziale. Successivamente, quando queste cellule marcate geneticamente sono state riattivate con luce blu (per attivare la sonda optogenetica), in un contesto differente da quello originale utilizzato per il condizionamento, e che non era stato mai associato ad uno shock, gli animali hanno mostrato una piena risposta di paura, dimostrando un vero e proprio richiamo artificiale della memoria di paura, in assenza di qualsiasi indizio esterno. Questo esperimento, ed altri successivi (Kim *et al* 2014; Yiu *et al* 2014), dimostrano in modo molto convincente che la stimolazione dei neuroni engramma è *sufficiente* per riattivare una memoria precedentemente formata, in modo involontario ed indipendente da indizi di richiamo esterni. La condizione di sufficienza, e quindi l'esistenza stessa delle cellule engramma, e la natura della traccia mnestica, è stata così dimostrata formalmente.

Manipolare l'engramma

La disponibilità dei nuovi metodi sperimentali (le cosiddette «*engram technologies*») per la marcatura genetica e la successiva modulazione dell'attività delle cellule engramma, con metodi optogenetici o chemogenetici, permette oggi di studiare le proprietà delle cellule engramma (Ryan *et al* 2015), ovvero dei cambiamenti funzionali, morfologici, sinaptici, molecolari, che avvengono in queste cellule, rispetto a cellule vicine che non sono state reclutate in un engramma specifico per una memoria. Ma soprattutto, questi metodi permettono di manipolare tali cellule, allo scopo di porre domande sulla natura dei processi e dei circuiti di memoria e sulle interazioni del sistema della memoria con altre funzioni cognitive quali immaginazione ed emozione. Recentemente sono stati riportati studi in tal senso, mostrando come, manipolando opportunamente le cellule engramma, si possa artificialmente *creare una falsa memoria* (Ramirez *et al* 2013; Ohkawa *et al* 2015) o *cambiare il segno della valenza emotiva di una memoria* (Redondo *et al* 2014; Gore *et al* 2015).

Si è visto sopra come la memoria abbia una natura costruttiva e come l'atto di richiamare una memoria la renda labile e suscettibile a modificazione (Nader *et al* 2000). Nell'uomo, che possiede un ricco repertorio di rappresentazioni mentali generate internamente da processi quali il richiamo conscio od inconscio, il sogno e l'immaginazione, una possibile causa di falsa memoria episodica potrebbe derivare dalla associazione della memoria di una esperienza passata con un evento esterno di

valenza significativa. Utilizzando le strategie sperimentali di marcatura genetica e riattivazione optogenetica di cellule engramma di memoria (Liu *et al* 2012), studi recenti hanno creato false memorie e false associazioni tra stimoli che non sono stati associati tra loro (Ramirez *et al* 2013; Ohkawa *et al* 2015). Cellule engramma contestuali nel giro dentato dell'ippocampo sono state marcate con la sonda optogenetica ChR2, esponendo i topi al contesto spaziale A (memoria neutrale). Il giorno successivo, quando la finestra temporale per la marcatura genetica era chiusa, i topi hanno ricevuto uno shock, mentre esposti al contesto B, e le loro cellule engramma corrispondenti al contesto A sono state attivate con la luce blu. In tal modo, lo shock è stato associato con il contesto B (vero) e con il contesto A (falso). Il terzo giorno, esposti al contesto A, i topi hanno mostrato una significativa risposta di paura, nonostante non avessero mai ricevuto alcuno shock in quel contesto. I topi non mostravano invece alcuna paura, se esposti ad un differente contesto C, mentre mostravano paura anche quando esposti al contesto B. Questi studi mostrano che si possono generare false memorie di paura, associando uno stimolo doloroso ad una attivazione artificiale di neuroni engramma che codificano per un contesto neutrale, dove quello stimolo doloroso non è mai stato ricevuto.

Gli studi sulla natura della traccia mnestica hanno fatto enormi progressi, a partire dalla iniziale metafora Platonica della scrittura sulla tavoletta di cera, fino ai più recenti studi sulle cellule engramma e sulla loro identificazione e manipolazione sperimentale. Le proprietà elettrofisiologiche, morfologiche e molecolari delle cellule engramma possono oggi essere studiate in dettaglio (Ryan *et al* 2015), anche dal punto di vista del loro coinvolgimento in fenomeni di plasticità sinaptica (Nonaka *et al* 2014; Nabavi *et al* 2014).

Giova osservare che il potere risolutivo delle attuali strategie sperimentali per lo studio delle cellule engramma è al livello dell'intera cellula nervosa, mentre il paradigma della plasticità sinaptica presuppone che l'unità funzionale per l'immagazzinamento della memoria e del suo richiamo sia a livello della singola sinapsi. La domanda oggi sul tavolo è quindi se si debba parlare di *cellule engramma* (che i metodi sperimentali attualmente disponibili permettono di studiare e misurare), oppure sia più giusto parlare di «*engrammi sinaptici*» (Gobbo *et al* 2016). Secondo questo punto di vista, l'engramma sarebbe costituito da combinazioni di sinapsi stabilmente modificate (engramma sinaptico), anziché da combinazioni di cellule engramma. Tuttavia, i metodi sperimentali non sono ancora sufficientemente sviluppati per affrontare questa importante domanda. Recenti sviluppi metodologici mostrano la strada che permette di affrontare, anche per gli engrammi sinaptici, la cruciale questione delle condizioni della loro necessità (Hayashi-Takagi *et al* 2015) e sufficienza (Gobbo *et al* 2017) per sostenere una memoria.

La frontiera: unificare gli studi sulle cellule engramma e sulla malattia di Alzheimer

L'altra faccia della medaglia degli aspetti fisiologici dei processi di memoria è costituita da quelle patologie che determinano gravi e progressive perdite di memo-

ria. La malattia di Alzheimer (MA) è il caso emblematico, proprio perché si caratterizza, dal punto di vista clinico, in una progressiva perdita di memoria, che porta a gravi deficit cognitivi. La rilevanza sociale della MA, per il numero di pazienti coinvolti, per il progressivo invecchiamento della nostra società, ma soprattutto per la perdurante mancanza di terapie e farmaci efficaci, fanno di questa patologia una vera e propria emergenza sanitaria e socio-economica per la nostra società. La MA si caratterizza per la progressiva perdita di una popolazione di neuroni colinergici, che innervano la corteccia dai nuclei del prosencefalo basale e sono responsabili per proprietà cognitive associative, e, dal punto di vista neuropatologico, per la presenza nel cervello di tipici depositi costituiti da aggregati fibrillari extra- ed intra-cellulari, costituiti da normali proteine neuronali, le cosiddette placche di amiloide (costituiti dalla proteina APP [Amyloid Precursor Protein]) ed i grovigli neurofibrillari (costituiti dalla proteina associate ai microtubuli Tau), che determinano una progressiva neurodegenerazione. Per la presenza di questi aggregati tossici, di cui le cellule non sanno liberarsi, la MA viene definita, come altre patologie neurodegenerative, una patologia da «*protein misfolding*» (proteine dalla struttura scorretta). Mentre la grande maggioranza dei casi di MA è su base sporadica, lo studio di una piccola percentuale di pazienti che presentano una forma della MA ad insorgenza molto più precoce, su base familiare, ha dimostrato che mutazioni nel gene che codifica per la proteina APP, oppure nei geni PS1 che codificano per un complesso enzimatico che taglia dalla proteina APP il peptide neurotossico A β , determinano le forme familiari della MA. Mutazioni nel gene che codifica per la proteina Tau sono state individuate in pazienti affetti da altre forme di neurodegenerazione, dette tauopatie (ad esempio Fronto Temporal Dementia). Sulla base di queste forti evidenze genetiche, la gran parte della ricerca sulla MA si è concentrata in questi anni sullo studio delle proteine che costituiscono la «firma» neuropatologica della MA, ovvero il peptide A β e la proteina Tau, ma questi studi non si sono ancora tradotti in nuovi farmaci o terapie che abbiano dimostrato una efficacia nel corso di sperimentazioni cliniche.

In questa dicotomia tra memoria e oblio si nasconde un paradosso, che ho cercato di esplicitare: abbiamo fatto, negli ultimi anni, enormi progressi nella conoscenza e comprensione dei meccanismi della memoria e nei metodi con cui studiarla, eppure siamo ancora molto lontani dall'aver una cura efficace per la malattia di Alzheimer. È chiaro che la scoperta di una cura efficace per questa devastante malattia costituisce una frontiera, un elemento costitutivo della frontiera della memoria.

I progressi fatti nel campo della identificazione e caratterizzazione delle cellule engramma offrono, a mio avviso, una interessantissima opportunità per la ricerca dei prossimi anni, ovvero l'opportunità di unificare gli studi sulla neurodegenerazione e sulle proteine coinvolte nella MA con gli studi sulle cellule engramma e le tracce mnestiche. Studi iniziali cominciano ad essere fatti in questa direzione (Roy *et al* 2016). È un approccio che permetterà di applicare allo studio della MA tutte le conoscenze e le strategie sperimentali che si sono accumulate negli ultimi anni sulle basi cellulari e molecolari della scrittura, lettura e richiamo delle tracce mne-

stiche. Ad esempio, sarà del massimo interesse studiare la stabilità, fragilità e vulnerabilità delle cellule engramma in condizioni di neurodegenerazione precoce, oppure domandarci se la perdita di memoria che si osserva nella MA sia dovuta ad un deficit dei processi di immagazzinamento, oppure a deficit dei processi di richiamo della memoria stessa. Le memorie sono perse, cancellate, oppure continuano ad essere presenti, ma non possono essere richiamate esplicitamente? La MA è una patologia degli engrammi, della loro scrittura, della loro durata nel tempo, del loro richiamo?

La possibilità di marcare geneticamente e di identificare, all'interno di circuiti cerebrali intatti, le cellule che costituiscono le tracce mnestiche permetterà di studiarne le proprietà nel contesto della neurodegenerazione. Questo permetterà di studiare la MA nel contesto delle strategie sperimentali per investigare il sistema della memoria nel cervello, studiando specifiche memorie mentre si formano, quando si richiamano ed anche quando si degradano e vengono cancellate. Finora la neurodegenerazione è stata studiata in generale nei neuroni, senza una particolare distinzione tra neuroni che siano coinvolti in processi di memoria e neuroni che invece non lo siano. Oggi diventa possibile studiare la neurodegenerazione nei neuroni che fanno parte di un engramma e seguire nel tempo proprio questi neuroni. Sarà fondamentale studiare la MA nel contesto degli studi sulla memoria, e riportare gli studi sulle proteine dell'Alzheimer allo studio dei circuiti della memoria.

È prevedibile che unificare gli studi sugli engrammi e sulle tracce mnestiche con gli studi sulla malattia di Alzheimer, una malattia che colpisce i sistemi della memoria, possa contribuire a gettare nuove basi di conoscenza verso lo sviluppo di nuovi farmaci e di nuove cure che oggi purtroppo mancano.

BIBLIOGRAFIA

- Bliss T.V. and Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331-356.
- Deisseroth K., (2011). Optogenetics. *Nat Methods* 8, 26-29.
- Denny C.A. *et al* (2014). Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time and adult neurogenesis. *Neuron* 83, 189-201.
- Giuditta A. *et al* (2002). Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *Trends in Neurosciences* 25, 400-404.
- Gobbo F, Marchetti L., Alia C., Luin S. and Cattaneo A. (2016). Activity-dependent expression of reporter proteins at dendritic spines for synaptic activity mapping and optogenetic stimulation. *BioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/095984>.
- Gobbo F, Marchetti L., Jacob A., Pinto B., Binini N., Pecoraro Bisogni F., Alia C., Luin S., Caleo M., Fellin T., Cancedda L. and Cattaneo A. (2017). Activity-dependent expression of Channelrhodopsin at neuronal synapses. *Nature Commun.* 8(1):1629. doi: 10.1038/s41467-017-01699-7.
- Gore F. *et al* (2015). Neural representations of unconditioned stimuli in basolateral amygdala mediate innate and learned responses. *Cell* 162, 134-145.

- Govindarajan, A., Israely, I., Huang, S.-Y. & Tonegawa, S. The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP. *Neuron* 69, 132-146 (2011).
- Guenther C.J., Miyamichi K., Yang H.H., Heller H. and Luo L. (2013). Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations. *Neuron* 78, 773-784.
- Han J.H. *et al* (2007). Neuronal competition and selection during memory formation. *Science* 316, 457-460.
- Han J.H. *et al* (2009). Selective erasure of a fear memory. *Science* 323, 1492-1496.
- Hayashi-Takagi, A. *et al*. Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature* 525, 333-8 (2015).
- Hebb D. (1949). *The organization of behaviour*.
- James W., (1890). Principles of Psychology p. 655.
- Josselyn S.A., Koehler S. and Frankland P.W. (2015). Finding the engram. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 521-534.
- Kandel E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. (Nobel Lecture) *Bioscience Reports* 21, 565-611.
- Kastellakis, G., Cai, D.J., Mednick, S.C., Silva, A.J. & Poirazi, P. Synaptic clustering within dendrites: An emerging theory of memory formation. *Progress in Neurobiology* 126, 19-35 (2015).
- Kim J., Kwon J.T., Kim H.S., Josselyn S.A. and Han J.H. (2014). Memory recall and modification by activating neurons with elevated CREB. *Nat. Neurosci.* 17, 65-72.
- Lashley K. (1950). «In search of the engram» *Symp. Soc. Exp. Biol.* 4, 454-482.
- Liu, X. *et al*. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 484, 381-5 (2012).
- Malenka R.C. and Bear M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21.
- Mayford, M. The search for a hippocampal engram. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 369, 20130161 (2014).
- Nabavi, S. *et al*. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511, 348-352 (2014).
- Nader K., Schafe G.E. and Le Doux J.E. (2000). The labile nature of consolidation theory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 216-219.
- Nonaka A. *et al* (2014). Synaptic plasticity associated with a memory engram in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 34, 9305-9309.
- Ohkawa N. *et al* (2015). Artificial association of pre-stored information to generate a qualitatively new memory. *Cell Reports* 11, 261-269.
- Poo, M. *et al*. What is memory? The present state of the engram. *BMC biology* 14, 1 (2016).
- Ramirez, S. *et al*. Creating a false memory in the hippocampus. *Science* 341, 387-391 (2013).
- Redondo R.L., Kim J., Arons A.L., Ramirez S., Liu X. and Tonegawa S. (2014) Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature* 522, 335-339.
- Redondo, R.L. & Morris, R.G.M. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 17-30 (2011).
- Reijmers L.G., Perkins B.L., Matsuo N. and Mayford M. (2007). Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science* 317, 1230-1233.
- Roy D.S. *et al*. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease *Nature* 531, 508-512.
- Ryan T.J., Roy D.S., Pignatelli M., Arons A. and Tonegawa S. (2015). Memory engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science* 348, 1007-1013.
- Semon R. (1921). «*The Mneme*» (G. Allen & Unwin).
- Sutton M.A. and Schuman E.R. (2006). Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity and memory. *Cell* 127, 49-58.

- Takeuchi, T., Duzskiewicz, A.J. & Morris, R.G. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130288 (2014).
- Tonegawa S, Liu X., Ramirez S. and Redondo R. (2015). Memory engram cells have come of age. *Neuron* 87, 918-931.
- Tongiorgi, E., Righi, M. & Cattaneo, A. Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience* 17, 9492-9505 (1997).
- Yiu A.P. *et al* (2014). Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training. *Neuron* 83, 722-735.
- Yuste, R. & Denk, W. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375, 682-684 (1995).
- Zhou Y. *et al* (2009). CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nat. Neurosci.* 12, 1438-1443.