



# **Borse di studio**

- Alterazioni morfologiche dei neuroni ippocampali e fronto-corticali durante il consolidamento delle memorie remote (*Massimiliano Aceti*)
- Studio della interazione gene-ambiente nella patogenesi dei disturbi dello spettro autistico (*Laura Altieri*)
- Analisi biologica e chimica in modelli animali di distonia (*Alessandra Bonito Olivo*)
- Regolazione dello splicing alternativo del gene *SMN2* nella atrofia muscolare spinale (SMA) (*Roberta Busà*)
- Effetti della microgravità simulata sulla funzionalità dei neuroni corticali in coltura primaria (*Silvia Caioli*)
- Studio degli effetti degli aminoacidi ramificati sulle proprietà elettrofisiologiche del sistema nervoso centrale (*Irene Carunchio*)
- Analisi della fosforilazione di caspasi-8 nella tumorigenesi e nella metastatizzazione (*Caterina Cenci*)
- Identificazione di marcatori di tipo immunologico a scopo diagnostico e prognostico nelle demenze degenerative (*Antonio Ciaramella*)
- Regolazione della neurogenesi da parte del gene *PC3/Tis21* (*Irene Cinà*)
- Risposte neuronali a concentrazioni tossiche di aminoacidi eccitatori (*Maria Letizia Cucchiaroni*)
- Studio dei meccanismi di rappresentazione mentale di moti naturali e non naturali in soggetti sani e in pazienti con deficit vestibolare centrale e periferico (*Francesca Figliozzi*)
- Riabilitazione e risonanza magnetica funzionale (f-MRI): studio longitudinale nei pazienti affetti da Sclerosi Multipla (*Licia Finamore*)
- Espressione genica dei diversi TRPC nello striato e nella corteccia del modello murino di Corea di Huntington (*Carmela Giampà*)
- Ruolo dell'immaginazione mentale del movimento nella riabilitazione dopo infortuni sul lavoro (*Silvio Gravano*)
- Valutazione strumentata e trattamento robotico dei deficit motori in riabilitazione (*Marco Iosa*)
- Danno cellulare a distanza nelle lesioni focali del SNC. Modulazione farmacologica e recupero funzionale (*Laura Latini*)
- Effetti dell'inibizione della fosfodiesterasi 10 (PDE10) nel modello murino di Corea di Huntington (*Daunia Laurenti*)
- Investigazioni di Proteomica in malattie ereditarie (*Valeria Marzano*)
- Correlati neurali dell'osservazione di errori in sistemi motori esperti (*Mariella Pazzaglia*)
- ProFunDistance: una banca dati di interazioni proteiche umane relazionate ed integrate con dati di colocalizzazione ed associate a patologie mendeliane (*Daniele Peluso*)
- Ruolo della chinasi ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) nel controllo dell'ubiquitinazione proteasoma-ubiquitina dipendente (*Simonetta Santini*)

- Meccanismi cellulari di base del danno a carico della plasticità sinaptica nel modello murino di DYT1 Dystonia (*Giuseppe Sciamanna*)
- I disturbi comportamentali nelle malattie neurodegenerative: valutazione dei Behavioural and Psychological Symptoms of Dementia e loro inserimento nelle linee guida per la diagnosi di demenza (*Ilaria Spoletini*)
- Sindrome delle apnee ostruttive del sonno: correlazioni fisiologiche e neuroradiologiche (*Federico Torelli*)
- Effetti del rumore fisiologico sul segnale BOLD in immagini di ampiezza e fase (*Elisa Tuzzi*)
- Effetti della vibrazione muscolare sulla eccitabilità corticale indagati tramite stimolazione magnetica transcranica (*Viviana Versace*)
- Guardare il mondo dagli occhi dell'altro: un confronto tra abilità visuo-spaziali di presa e cambio di prospettiva (*Vanda Viola*)
- Studio morfostrutturale cerebrale in pazienti affetti da Sindrome delle Apnee Ostruttive del Sonno mediante Risonanza Magnetica (*Silvana Zannino*)

## ALTERAZIONI MORFOLOGICHE DEI NEURONI IPOCAMPALI E FRONTO-CORTICALI DURANTE IL CONSOLIDAMENTO DELLE MEMORIE REMOTE (*Massimiliano Aceti*)

**Introduzione** – Le tracce di memoria non vengono codificate e consolidate immediatamente ma vanno incontro ad un graduale processo di stabilizzazione [Dudai et al. (2004) *Annu Rev Psychol* 55: 51-86. *Review*; Squire et al. (2004) *Neurobiol Learn Mem* 82(3): 171-177. *Review*]. Le memorie recentemente acquisite vengono immagazzinate in uno stato labile, innescando modificazioni proteiche delle connessioni sinaptiche ippocampali. A tal proposito, l'immagazzinamento delle tracce in ippocampo sembrerebbe essere limitato nel tempo; un danno cerebrale che investa il lobo temporale mediale, che include anche l'ippocampo, danneggia il recupero delle memorie recentemente acquisite senza alterare il ricordo di memorie remote [Zola-Morgan et al. (1986) *J Neurosci* 6: 2950-2967; Kim and Fanselow (1992) *Science* 256(5057): 675-677; Martin and Morris (2007) *Hippocampus* 12: 609-636; Squire and Bayley (2007) *Curr Opin Neurobiol* 17(2): 185-196]. Quindi, il consolidamento delle memorie remote sembra coinvolgere strutture diverse dall'ippocampo [Teng et al. (1999) *Nature* 400(6745): 675-677; Rosenbaum et al. (2001) *Behav Brain Res* 127: 183-197] come la corteccia prefrontale, la corteccia antero-cingolata e la corteccia retrospleniale, che attraverso un'azione coordinata con l'ippocampo, trasformerebbero le memorie inizialmente vulnerabili in tracce consolidate e stabili [Bontempi et al. (1999) *Nature* 400: 671-675; Frankland et al. (2004) *Science* 304: 881-883; Maviel et al. (2004) *Science* 305: 96-99; Texeira et al. (2006) *J Neurosci* 26(29): 7555-7564].

La teoria classica del consolidamento delle memorie identifica l'ippocampo quale struttura deputata ad organizzare l'immagazzinamento delle memorie remote modificando attivamente la connettività nelle diverse aree corticali [McClelland et al. (1995) *Psychol Rev* 102: 419-457; Squire, Alvarez (1995) *Curr Opin Neurobiol* 5(2): 169-177. *Review*]. Intuitivamente, tale meccanismo suggerisce che il cambiamento nella morfologia dei neuroni ippocampali e corticali potrebbe intervenire nella formazione di memorie recenti o remote, sebbene non vi siano ancora evidenze sperimentali definitive. Questo progetto ha inteso analizzare le alterazioni morfologiche nei neuroni piramidali dell'ippocampo e della corteccia cingolata anteriore durante il consolidamento delle memorie remote, approfondendo così lo studio dei meccanismi della plasticità neuronale dell'ippocampo e della corteccia antero-cingolata indotti dal condizionamento avverso al contesto.

**Risultati** – In accordo con i dati presenti in letteratura [Fanselow, Gale (2003) *Ann NY Acad Sci* 985: 125-134; Frankland et al. (2004) *Science* 304: 881-883], i risultati ottenuti mostrano che la procedura di addestramento usata negli esperimenti ha prodotto un condizionamento robusto nei due gruppi di animali analizzati a 24h (memoria recente) e a 36 giorni (memoria remota). Infatti, gli animali addestrati, rispetto agli animali pseudo-addestrati, mostrano livelli elevati di *freezing* ed una ridotta attività locomotoria nei due *time-points* presi in considerazione. È stato anche osservato che i livelli di *freezing* sono più elevati nel gruppo esaminato a 36 giorni rispetto al gruppo analizzato dopo 24h dall'addestramento. Una possibile spiegazione di questi

risultati potrebbero essere dovuti a fenomeni di modificazioni qualitative nei neuroni piramidali dell'ippocampo e della corteccia cingolata anteriore.

Attraverso l'analisi morfologica delle strutture, ippocampo e corteccia antero-cingolata, è stato analizzato il cambiamento morfologico (in termini di aumento/diminuzione del numero di spine dendritiche) dei neuroni piramidali. Dalla conta effettuata (attraverso la colorazione di Golgi e l'uso del software Neurolucida) è stato osservato che il gruppo sottoposto al test a 24h mostra un aumento delle spine dendritiche nei neuroni piramidali dell'ippocampo ma non in corteccia antero-cingolata. Il gruppo invece sottoposto a test a 36 giorni mostrava un aumento del numero di spine in corteccia antero-cingolata ma non in ippocampo.

Questi risultati, in conformità con quanto descritto in letteratura (Teixeira et al. (2006) *J Neurosci* 26(29): 7555-7564; Moncada et al. (2006) *Neurobiol Learn Mem* 86(1): 9-18; Moser et al. (1994) *PNAS USA* 91(26): 12673-12675], indicano che l'aumento della connettività ippocampale risulta essere associata solo al gruppo 24h e non al gruppo testato a 36 giorni. L'analisi dei neuroni piramidali della corteccia antero-cingolata mostra invece un pattern inverso indicando un significativo aumento del numero di spine nel gruppo di animali testato a 36 giorni ma non nel gruppo testato dopo 24h dal training. Nel confermare i dati sin qui discussi, sono stati addestrati altri gruppi di animali che anno ricevuto lesioni bilaterali dell'ippocampo e della corteccia cingolata anteriore. I risultati comportamentali indicano che la lesione dell'ippocampo non permette all'animale di elaborare la memoria recente, non permettendo poi l'immagazzinamento della memoria remota. In tal senso infatti, il numero di spine in corteccia rimane simile al gruppo di controllo (pseudo-addestrati).

**Conclusioni** – In conclusione, questi risultati mostrano che la traccia di memoria viene inizialmente elaborata dall'ippocampo, poi, l'informazione sembrerebbe “migrare” verso la corteccia cingolata anteriore per essere immagazzinata e conservata. Tale trasferimento sembrerebbe essere supportato da cambiamenti morfologici della connettività neuronale. Questi dati sono in linea con quanto formulato da Frankland e Buontempi, i quali hanno messo in evidenza che l'ippocampo sembra svolgere la funzione di elaborazione delle informazioni in un arco temporale limitato nel tempo e, solo successivamente, le informazioni verrebbero immagazzinate stabilmente nelle neocortecce.

## **STUDIO DELLA INTERAZIONE GENE-AMBIENTE NELLA PATOGENESI DEI DISTURBI DELLO SPETTRO AUTISTICO** (*Laura Altieri*)

**Introduzione** – L'autismo è un disturbo complesso ed eterogeneo in cui sono coinvolti fattori genetici ed ambientali, ciascuno dei quali contribuisce in maniera variabile nei diversi pazienti. Studi su famiglie e su gemelli supportano il contributo di fattori genetici a questa malattia. Tuttavia, l'eterogeneità dei sintomi clinici e la complessità dei processi patogenetici hanno finora reso difficile la definizione di correlazioni tra genotipo e fenotipo. Lavori recenti supportano un ruolo importante dell'instabilità genomica nei pazienti autistici. Le aumentate frequenze delle variazioni del numero di copie (CNVs,

copy number variations) nel genoma umano sono state associate con l'autismo da diversi gruppi.

**Obiettivi** – Si è valutata la frequenza dei CNVs in campioni di tessuto neocorticale di pazienti autistici e di controlli e si è stabilito il loro grado di correlazione con l'espressione genica.

**Materiali e metodi** – L'analisi CNV è stata condotta su DNA genomico estratto da campioni di tessuto temporocorticale postmortem (BA 41/42) appartenenti a 10 coppie di pazienti-controlli, utilizzando il sistema Gene Chip Mapping 250K arrays (Affimetrix). L'espressione genica è stata valutata mediante il sistema Human Genome 133 plus arrays (Affimetrix) [Garbett et al. (2008) *Neurobiol Dis* 30(3): 303-311]. Per lo studio CNV, i dati di intensità di segnale degli SNP (log2 ratio) sono stati analizzati mediante CNAG, SPSS e MATLAB.

**Risultati** – Dagli arrays genomici non sono risultate differenze significative nelle percentuali di SNPs deleti e duplicati tra pazienti e controlli.

Lo studio dell'espressione genica ha rivelato che, nei pazienti, 186 trascritti aumentavano la loro espressione, mentre 35 la diminuivano. In particolare, l'aumento dell'espressione coinvolge geni del sistema immunitario, mentre la diminuzione dell'espressione interessa geni che regolano lo sviluppo neuronale e la crescita.

Tuttavia, i CNVs non sono correlati con i livelli di espressione dei geni contenenti SNPs che sono duplicati o deleti.

**Conclusioni** – Lo studio effettuato non rileva un aumento dell'instabilità genomica nei cervelli post-mortem dei pazienti autistici rispetto ai controlli. Negli stessi cervelli non è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra l'instabilità genomica e i livelli di espressione genica. Ciò indirizza il prosieguo della nostra ricerca verso l'identificazione di una causa patogenetica comune all'origine sia dei CNV, sia delle alterazioni nell'espressione genica corticale.

## **ANALISI BIOLOGICA E CHIMICA IN MODELLI ANIMALI DI DISTONIA** (Alessandra Bonito Olivo)

**Introduzione** – La distonia è un disordine neurologico caratterizzato da sostenute contrazioni muscolari, frequentemente associate a disorganizzazione motoria e posture anormali. La forma più comune di distonia ad esordio precoce, nota come DYT1, è ritenuta essere causata da una mutazione dominante a carico del gene TOR1a codificante per la proteina Tor1A [Ozelius et al. (1997) *Nat Genet* 17: 40-44]. Si ritiene che tale mutazione possa in ultima analisi indurre alterazioni funzionali nella trasduzione del segnale dopaminergico striatale. A supporto di tale ipotesi, in pazienti DYT1 sono state riscontrate significative alterazioni dopaminergiche [Asanuma et al. (2005) *Neurology* 64: 347-349; Augood et al. (2004) *Adv Neurol* 94: 53-60], mentre i modelli animali caratterizzati dall'espressione della proteina umana mutata DYT1 presentano disturbi connessi al con-

trollo del movimento. Tuttavia, nonostante i chiari deficit motori presenti in questi topi, non sono state riscontrate alterazioni nella distribuzione e nella quantità relativa del trasportatore della dopamina (DAT), né nei siti di legame dei recettori dopaminergici D1 e D2 [Balcioglu et al. (2007) *J Neurochem* 102(3): 783-788].

**Obiettivi e metodi** – Alla luce di queste evidenze, per la discordanza tra fenotipo motorio e apparente normalità dei recettori dopaminergici, l'obiettivo di questo progetto è stato quello di indagare ulteriormente lo stato funzionale dei recettori D1 e D2 striatali in condizioni di stimolazione fasica. A tal scopo, sono state studiate le funzioni *in vitro* ed *in vivo* dei recettori dopaminergici D1 e D2 nei topi transgenici esprimenti la proteina umana mutata DYT1 (topi hMT), ritenuti questi un valido modello murino per studiare questa patologia genetica [Sharma et al. (2005) *J Neurosci* 25: 5351-5355; Zhao et al. (2008) *Exp Neurol* 210: 719-730].

*Inalterata funzionalità del recettore D2 presinaptico* – Nel modello animale caratterizzato dall'espressione della proteina umana mutata DYT1 è stata studiata la funzionalità del recettore dopaminergico D2 (D2R), indagando la sua abilità nel controllo della trasmissione dopaminergica, del firing e della sintesi di dopamina (DA). I test comportamentali eseguiti per studiare la risposta motoria all'agonista D2R quinpirolo hanno dimostrato nei topi mutanti una riduzione dell'attività locomotoria comparabile a quella del gruppo di controllo (hWT). Similmente, gli studi di elettrofisiologia hanno mostrato un intatto funzionamento del D2R in entrambi i genotipi. Infine, esperimenti di biochimica, tesi ad indagare la funzionalità D2R nel controllo della sintesi di DA, hanno rivelato un aumento comparabile tra topi mutanti e controlli nella fosforilazione della Tirosina Idrossilasi (TH) indotta dall'antagonista aloperidolo. Tali risultati, in accordo con i dati di elettrofisiologia e comportamento, dimostrano chiaramente le inalterate proprietà autorecettoriali nei topi hMT.

*Deficitarie funzioni del recettore D2 postsinaptico nei topi hMT* – Successivamente, è stata indagata la funzionalità del D2R postsinaptico striatale, riscontrando alterazioni nei topi hMT. Esperimenti di elettrofisiologia hanno rivelato in tali topi l'assenza di Depressione a Lungo Termine (LTD), anche in seguito a pretrattamento con l'agonista D2R quinpirolo. Studi di comportamento, volti ad indagare la risposta catalettica indotta dall'aloiperidolo attraverso il blocco del D2R postsinaptico, hanno mostrato una risposta ridotta nei topi hMT, rispetto ai controlli hWT.

Considerando il ruolo del D2R nel comportamento motorio, è stata inoltre analizzata la locomozione spontanea di questi topi che effettivamente si mostravano leggermente meno attivi rispetto ai controlli.

Infine è stata indagata la funzionalità del recettore D1 (D1R), senza però rilevare alcuna significativa differenza tra i genotipi né nel comportamento motorio D1R-dipendente, né nei livelli di fosforilazione di GluR1 sulla Ser845 nello striato.

*Ridotta efficacia del recettore D2 postsinaptico nel legame con le proteine Gi/Go nei topi hMT* – Per chiarire le basi molecolari della ridotta attività postsinap-

tica D2R osservata nei topi hMT, è stata studiata la capacità della DA di legarsi al recettore D2, promuovere il binding a GTP ed attivare la proteina Gi/Go. Questi studi hanno dimostrato che tale efficacia è significativamente ridotta nei topi mutanti.

Per indagare se il ridotto binding di GTP derivi da minori livelli di espressione del recettore stesso, sono stati condotti esperimenti di biologia molecolare che hanno rivelato nello striato dei topi mutanti una riduzione di circa il 30% dei livelli di D2R rispetto ai controlli. Inoltre, per verificare ulteriormente se la ridotta capacità di binding del D2R dipenda dalla minore disponibilità del recettore stesso sono stati analizzati i livelli striatali di espressione di alcune proteine coinvolte nella regolazione dell'attività D2R come GRK2, GRK3, GRK6, -Arrestin2 e RGS-9. I risultati hanno mostrato, unicamente per i livelli di RGS9, una significativa riduzione nei topi hMT rispetto ai controlli.

*Comparabili livelli striatali di mRNA D2R* – Per verificare se i ridotti livelli del D2R, nello striato dei topi overesprimenti la TorsinA mutante, dipendano da alterazioni trascrizionali, sono stati condotti studi di ibridazione in situ che non hanno mostrato alcuna alterazione né nella regione del caudato putamen né nel nucleus accumbens.

*Normale risposta dei recettori A2A* – Data la consistente co-espressione dei D2R con i recettori A2A (A2AR) sui neuroni medi spinosi (MSN) si è voluto verificare che la ridotta trasmissione striatale D2R nei topi mutanti fosse indipendente dalla funzionalità degli A2AR. Effettivamente, i topi mutanti mostravano una inalterata risposta comportamentale all'attivazione degli A2AR, prodotta tramite somministrazione di CGS21680, e al loro blocco, tramite somministrazione di KW6002.

Successivamente sono state studiate le risposte elettrofisiologiche *in vivo* dei MSN all'antagonista A2AR SCH 58621, senza riscontrare alcuna differenza genotipo-dipendente.

*L'antagonismo A2A ristabilisce la plasticità sinaptica striatale nei topi hMT* – Studi di elettrofisiologia hanno dimostrato che sebbene la somministrazione dell'antagonista A2AR SCH 58621 non alteri le proprietà sinaptiche basali nei genotipi è in grado di ripristinare completamente il deficit di LTD riscontrato negli hMT.

**Risultati** – Nell'insieme, il lavoro scientifico svolto ha portato alla individuazione di un importante legame tra la mutazione della torsinA, caratterizzante la distonia DYT1, e le disfunzioni del recettore DA D2. Inoltre, i dati ottenuti suggeriscono che l'antagonismo A2AR è capace di compensare il deficit nella neurotrasmissione D2R-mediata osservato nei mutanti.

## **REGOLAZIONE DELLO SPLICING ALTERNATIVO DEL GENE SMN2 NELLA ATROFIA MUSCOLARE SPINALE (SMA) (Roberta Busà)**

**Introduzione** – L'Atrofia Muscolare Spinale (Spinal Muscular Atrophy, SMA) è una malattia neurodegenerativa e rappresenta la più diffusa causa genetica di mortalità infantile. Due geni altamente omologhi, *SMN1* e *SMN2* (di Sopravvivenza dei Moto-Neuroni), giocano un ruolo fondamentale nella

genesi della SMA. I pazienti affetti da questa patologia sono privi del gene *SMN1* e dotati di almeno una copia di *SMN2* [Monani (2005) *Neuron* 48: 885-896]. Tuttavia, *SMN2* è in grado di supplire alla mancanza dell'omologo *SMN1* solo parzialmente. Infatti, *SMN2* presenta all'interno dell'esone 7 la sostituzione di una base (una C in posizione +6 di *SMN1* sostituita da una T in *SMN2*) che influisce profondamente sullo splicing determinandone l'esclusione dal trascritto maturo. Questa singola sostituzione è alla base della differenza di espressione dei due geni *SMN1* e *SMN2* [Monani et al. (1999) *Hum Mol Genet* 8: 1177-1183]. Il trascritto principale che si origina da *SMN1* in condizioni normali è il full length (*FL-SMN*) che comprende tutti i nove esoni, mentre il trascritto predominante di *SMN2* è quello privo dell'esone 7, che codifica per una proteina tronca instabile nelle cellule [Lefebvre et al. (1997) *Nat Genet* 16: 265-269]. I pazienti affetti da SMA, di conseguenza, esprimono bassi livelli di proteina funzionale FL-SMN.

Poiché l'esclusione dell'esone 7 di *SMN2* è alla base della instabilità della proteina prodotta e quindi la causa principale della patologia, numerosi studi hanno focalizzato l'attenzione sulla regolazione di questo evento di splicing. Un possibile candidato è la proteina Sam68, una RNA-binding protein (RBP) coinvolta in diversi aspetti del metabolismo degli mRNA quali lo splicing, l'esporto e la traduzione di mRNA [Lukong, Richard (2003) *Biochim Biophys Acta* 1653: 73-86]. Nella sequenza dell'esone 7 di *SMN2* è presente un perfetto sito di legame per Sam68, suggerendo che questa proteina possa svolgere un ruolo in questo evento di splicing. Il progetto di ricerca si propone di studiare il possibile ruolo di Sam68 nello splicing alternativo di *SMN2*.

**Risultati** – *Sam68 influenza lo splicing alternativo dell'esone 7 di SMN2* – Per studiare l'effetto di Sam68 sullo splicing alternativo dell'esone 7 di *SMN2*, cellule Hek293 sono state trasfettate con un costrutto codificante per Sam68 e con un minigene specifico per *SMN2*, consentendo di distinguere *SMN2* ricombinante dalle forme *SMN1* e *SMN2* endogene. L'RNA totale è stato estratto e mediante RT-PCR è stato valutato il rapporto di espressione del trascritto *FL-SMN2* e del trascritto privo dell'esone 7. Questi esperimenti hanno dimostrato che Sam68 aumenta l'esclusione dell'esone 7 di *SMN2*. Abbassando i livelli intracellulari di Sam68 attraverso esperimenti di RNA interference, trasfettando cellule Hek293 con oligo double strand specifici per Sam68, è stato invece osservato un aumento dell'inclusione dell'esone 7, confermando il coinvolgimento di questa RBP nella regolazione dello splicing alternativo di *SMN2*.

*L'attività di legame all'RNA di Sam68 è necessaria per l'esclusione dell'esone 7 di SMN2* – Per studiare la funzione di Sam68 nel regolare lo splicing alternativo di *SMN2* sono stati utilizzati dei mutanti di Sam68 in cui viene compromesso il legame all'RNA [Paronetto et al. (2007) *J Cell Biol* 176: 929-939]. Questi costrutti sono stati trasfettati in cellule Hek293 insieme al minigene di *SMN2* e mediante RT-PCR è stato valutato l'effetto dell'over-espressione delle forme mutanti di Sam68 sull'inclusione dell'esone 7. È stato osservato che nessuno dei mutanti è in grado di indurre l'esclusione dell'esone 7 di *SMN2*, indicando che l'attività di legame all'RNA di Sam68 è necessaria per questo evento di

splicing. In seguito, per caratterizzare la regione di legame di Sam68 nel trascritto di *SMN2* sono stati utilizzati oligonucleotidi specifici per l'esone 7 di *SMN2* marcati con biotina, recanti o meno mutazioni nel sito di legame di Sam68. I probe marcati sono stati legati ad una resina streptoavidin-sepharose ed utilizzati per un saggio di pull-down da estratti nucleari di cellule Hek293. Le proteine legate sono state eluite ed analizzate tramite Western Blot per verificare la presenza di Sam68. È stato osservato che le mutazioni nella sequenza "consensus" per Sam68 compromettono il legame della RBP al trascritto di *SMN2*.

Un altro approccio utilizzato per studiare la funzione di Sam68 nel regolare lo splicing di *SMN2* è stato l'utilizzo di minigeni di *SMN2* recanti mutazioni del sito di legame di Sam68 all'esone 7. Questi costrutti sono stati trasfettati in cellule Hek293 insieme a Sam68 e, mediante RT-PCR, è stato analizzato l'effetto sull'inclusione dell'esone 7 di *SMN2*. Questi esperimenti hanno mostrato che la mutazione del sito di legame di Sam68 su *SMN2* compromette profondamente l'esclusione dell'esone 7, abolendo completamente l'effetto di Sam68 sullo splicing alternativo di *SMN2*.

*Mutazioni che interferiscono con l'attività di Sam68 ricostituiscono l'inclusione dell'esone 7 del pre-mRNA di SMN2* – La proteina Sam68 agisce come dimero *in vivo* [Lukong, Richard (2003) *Biochim Biophys Acta* 1653: 73-86] ed interagisce con hnRNPA1, un altro fattore di splicing che induce l'esclusione dell'esone 7 di *SMN2* [Kashima, Manley (2003) *Nat Genet* 34: 460-463], attraverso il suo dominio carbossi-terminale di 93 aa [Paronetto et al. (2007) *J Cell Biol* 176: 929-939]. Per interferire con la funzione di Sam68, sono stati utilizzati dei dominanti negativi di questa RBP, uno in grado di dimerizzare con Sam68 wild type ma non di legare l'RNA (Sam68 V229F) e un altro in grado di interagire con hnRNP A1 ma privo del dominio di omodimerizzazione e di legame all'RNA (Sam68 351-443). Cellule Hek293 sono state trasfettate con i mutanti di Sam68 insieme a Sam68 wild type o hnRNP A1. Attraverso RT-PCR è stato osservato che l'over-espressione delle forme mutanti impedisce l'esclusione dell'esone 7 indotta dall'over-espressione di Sam68 o di hnRNP A1. I due dominanti negativi di Sam68 agiscono, quindi, da competitori dell'esclusione dell'esone 7 di *SMN2 in vivo*.

*Dominanti negativi di Sam68 inducono l'inclusione dell'esone 7 e determinano un incremento dei livelli della proteina SMN2 in cellule SMA* – Per valutare l'effetto dei dominanti negativi di Sam68 sullo splicing alternativo di *SMN2* in un contesto fisiologico, sono state utilizzate cellule derivanti da pazienti affetti da SMA. Le cellule sono state infettate con i mutanti di Sam68 (V229F e 351-443). Tramite RT-PCR, è stato osservato che l'espressione dei dominanti negativi di Sam68 favorisce la formazione del trascritto full length di *SMN2* endogeno nelle cellule dei pazienti. Mediante Western Blot, è stato osservato un incremento di SMN anche a livello proteico. Esperimenti di immunofluorescenza hanno confermato l'aumento della proteina SMN e la sua localizzazione nel nucleo nelle tipiche "gemme", generalmente assenti nei pazienti affetti da SMA. Questi esperimenti dimostrano che interferendo con l'attività di splicing di Sam68 *in vivo*, attraverso l'uso di dominanti negativi, si è in

grado di ricostituire l'attività della proteina SMN in cellule SMA.

**Conclusioni** – Gli esperimenti condotti in questo anno dimostrano che Sam68 influenza in modo determinante lo splicing alternativo di *SMN2* e che interferendo con la sua attività è possibile recuperare la formazione del trascritto full-length di *SMN2* e della proteina SMN. Una comprensione maggiore del meccanismo con cui Sam68 promuove l'esclusione dell'esone 7 potrà quindi permettere di sviluppare reagenti per nuovi approcci terapeutici per la malattia neurodegenerativa SMA.

### **EFFETTI DELLA MICROGRAVITÀ SIMULATA SULLA FUNZIONALITÀ DEI NEURONI CORTICALI IN COLTURA PRIMARIA (Silvia Caioli)**

**Introduzione** – Con l'avvento dell'“Era Spaziale” l'esplorazione dello spazio è diventato uno dei principali obiettivi dell'uomo. L'esposizione all'ambiente spaziale però produce nell'uomo una serie di effetti fisiologici e neurologici, la maggior parte dei quali dovuta al campo gravitazionale ridotto. Sono molti gli studi incentrati sulla comprensione di come la riduzione della forza gravitazionale possa generare le alterazioni delle funzioni fisiologiche riscontrate negli astronauti, e molti di essi sono stati condotti su modelli animali inviati nello spazio [Yates et al. (2003) *J Vestib Res* 13: 395-404; Sajdel-Sulkowska (2008) *Cerebellum* 7: 223-239]. Tuttavia, nel 1992, l'“American Aeronautic's and Space Agency” (NASA) ha progettato un sistema che permette di simulare la microgravità sulla Terra, il *Rotating Wall Vessel* (RWV), e questo ha aperto nuovi campi di studio che coinvolgono la biologia cellulare, l'ingegneria tissutale e la biologia spaziale.

**Obiettivi e metodi** – Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di valutare quali fossero gli effetti della gravità ridotta, ottenuta per mezzo del RWV, sulla funzionalità di neuroni corticali in coltura primaria. Tali neuroni sono stati prelevati da embrioni murini al quindicesimo giorno di gestazione e le colture sono state preparate seguendo le procedure standardizzate [Dugan et al. (1995) *J Neurosci* 15: 4545-4555; Carunchio et al. (2007) *Epilepsia* 48: 654-662].

I risultati ottenuti da Crestini e collaboratori, nel 2004, mostravano che l'esposizione per 24 ore alla microgravità simulata non generava alcun cambiamento sulle proprietà elettrofisiologiche di tali neuroni [Crestini et al. (2004) *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40: 159-165]. Di conseguenza, in questo studio, abbiamo valutato la presenza di eventuali effetti indotti dall'esposizione per 48 ore al campo gravitazionale ridotto sulla funzionalità di neuroni corticali, utilizzando come controlli sperimentali cellule poste dal primo momento nelle normali condizioni di 1g. A tal fine sono state eseguite registrazioni elettrofisiologiche su neuroni a diversi giorni in coltura (da 5 a 12 DIV, *Days in Vitro*) mediante la tecnica del patch-clamp, nella configurazione whole-cell, in modalità *voltage-clamp* e *current-clamp*.

Sono state utilizzate opportune soluzioni intracellulari ed extracellulari per lo studio delle proprietà neuronali (proprietà passive, proprietà di scarica e correnti ioniche voltaggio-dipendenti), delle correnti GABAergiche

inibitorie e glutammatergiche eccitatorie. Inoltre, al fine di valutare se i neuroni corticali esposti per 48 ore alla microgravità simulata fossero più sensibili o maggiormente protetti dal fenomeno dell'eccitotossicità da glutammato rispetto ai controlli, sono stati effettuati degli esperimenti di tossicità seguendo il protocollo sperimentale messo a punto da Volontè e collaboratori [Volontè et al. (1994) *Cytometry* 17: 274-276].

**Risultati** – Mediante lo studio delle proprietà neuronali abbiamo osservato che le cellule esposte alla microgravità simulata non mostravano alcuna differenza nelle proprietà passive di membrana (resistenza, capacità, costante di tempo “t” e potenziale di riposo della membrana) in nessun giorno analizzato. Al contrario, invece, abbiamo osservato che l'esposizione al campo gravitazionale ridotto provocava nei neuroni corticali una riduzione delle correnti del sodio e del potassio voltaggio-dipendenti nei primi giorni di registrazione e, di conseguenza, delle variazioni nelle proprietà di scarica. Da 5 a 8 DIV infatti la densità di tali correnti risultava significativamente inferiore nei neuroni esposti al campo gravitazionale ridotto rispetto ai controlli, ma nelle registrazioni effettuate da 9 a 12 DIV tali differenze non erano più riscontrabili. Inoltre, i neuroni di controllo raggiungevano la loro massima frequenza di scarica a 7-8 DIV ( $3.75 \pm 3.1$ ; n=35), valore che, in tali giorni, risultava essere significativamente inferiore nelle cellule esposte alla microgravità ( $1.96 \pm 2.7$ ; n=29;  $p < 0.05$ ). Tali neuroni raggiungevano la loro massima frequenza di scarica solo a 9-10 DIV ( $3.52 \pm 2.7$ ; n=23), e da 9 a 12 DIV la frequenza di scarica delle due popolazioni cellulari era confrontabile. Dall'analisi di parametri relativi al primo potenziale d'azione abbiamo riscontrato che le cellule esposte per 48 ore alla microgravità simulata generavano potenziali d'azione con un valore di soglia (delta di soglia, Controlli  $26.07 \pm 7.15$  mV; Microgravità  $31.09 \pm 5.63$  mV) ed un tempo di raggiungimento del picco (tempo di depolarizzazione, Controlli  $1.64 \pm 0.50$  ms; Microgravità  $2.07 \pm 0.88$  ms) significativamente maggiori rispetto ai neuroni di controllo (Controlli n=35; Microgravità n=18;  $p < 0.05$ ). Tali risultati hanno confermato che le riduzioni delle correnti di sodio e di potassio voltaggio-dipendenti erano alla base delle variazioni nelle proprietà di scarica riscontrate tra 5 e 8 DIV nelle cellule esposte alla microgravità.

Al fine di comprendere se l'esposizione al campo gravitazionale ridotto avesse provocato alterazioni a livello dei recettori responsabili della risposta inibitoria ed eccitatoria nel SNC, abbiamo successivamente studiato l'effetto dell'esposizione alla microgravità simulata sui recettori ionotropici del GABA e non-NMDA del glutammato. Come per le correnti ioniche voltaggio-dipendenti e per le proprietà di scarica neuronali, anche le correnti GABAergiche e glutammatergiche sono risultate alterate. La densità delle correnti ioniche indotte dalla somministrazione di GABA 50  $\mu$ M era significativamente ridotta nelle cellule esposte alla microgravità a 5-6 DIV (Controlli  $140.04 \pm 60.7$  pA/pF; Microgravità  $69.2 \pm 39.12$  pA/pF;  $p < 0,001$ ), ma diveniva comparabile con quella delle cellule di controllo da 7 a 12 DIV. Per ciò che riguarda le correnti glutammatergiche evocate dalla perfusione di kainato 200  $\mu$ M, lo studio della densità di corrente AMPA/kainato ci ha mostrato un graduale incre-

mento di questo parametro nei neuroni di controllo, che andava da valori più bassi a 5-6 DIV ( $20.08 \pm 11.3$  pA/pF), a valori intermedi a 7-8 ( $28.23 \pm 12.4$  pA/pF) e 9-10 DIV ( $31.73 \pm 16.4$  pA/pF), fino a raggiungere valori massimi a 11-12 DIV ( $34.96 \pm 15.7$  pA/pF). Tale incremento è stato osservato anche nelle cellule esposte per 48 ore alla microgravità simulata, ma la densità di corrente stimata non era mai paragonabile a quella delle cellule di controllo (Microgravità 5-6 DIV:  $6.53 \pm 4.26$  pA/pF, 7-8 DIV:  $13.67 \pm 9.3$  pA/pF, 9-10 DIV:  $14.79 \pm 10.5$  pA/pF, 11-12 DIV:  $18.28 \pm 11.5$  pA/pF). In questo studio infatti abbiamo riscontrato differenze significative tra le due popolazioni neuronali, ad ogni giorno di registrazione ( $p < 0.01$  ad ogni DIV). Questo dato è strettamente correlato alla maggior protezione dal fenomeno di eccitotossicità da glutammato delle cellule esposte alla microgravità rispetto ai controlli, e quindi ad una maggior vitalità neuronale in seguito alla somministrazione dell'insulto tossico, risultato che abbiamo ottenuto mediante gli esperimenti di tossicità.

Infine abbiamo effettuato esperimenti preliminari in cui i neuroni corticali venivano mantenuti all'interno dell'RWV per un periodo di tempo maggiore di 48 ore, allo scopo di valutare se l'esposizione prolungata alla microgravità simulata influisse sulla funzionalità neuronale. Abbiamo così osservato che, a parità di giorni di piastratura e quindi di esposizione ad 1g, i neuroni corticali mantenuti per 3, 6 e 9 giorni all'interno dell'RWV erano comunque in grado di generare potenziali d'azione.

**Conclusioni** – Questi risultati ci suggeriscono che l'ambiente in cui il campo gravitazionale è ridotto può provocare alterazioni cellulari, la maggior parte delle quali possono però venire normalizzate con l'esposizione alla condizione di 1g, indipendentemente dalla durata dell'esposizione alla microgravità simulata. Tutto ciò apre nuove prospettive nell'utilizzo del Rotating Wall Vessel per colture neuronali in sospensione, per possibili applicazioni in ingegneria tissutale e per la comprensione degli effetti della microgravità sui modelli animali, nonché sull'uomo.

## **STUDIO DEGLI EFFETTI DEGLI AMINOACIDI RAMIFICATI SULLE PROPRIETÀ ELETTROFISIOLOGICHE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE (Irene Carunchio)**

**Introduzione** – Valina, Leucina e Isoleucina, sono tre amminoacidi essenziali, detti a catena ramificata in quanto caratterizzati da una catena di atomi di carbonio che devia dalla catena principale. Vengono utilizzati come fonte di energia in modo preferenziale dal muscolo durante l'esercizio fisico e rappresentano il 30% della massa muscolare. Una corretta assunzione dei BCAA è necessaria per una normale crescita e sviluppo e quindi sono indispensabili nell'alimentazione. Gli aminoacidi ramificati sono abbondantemente presenti nelle proteine dei comuni alimenti che, pertanto, se consumati nelle giuste quantità, sono in grado di coprire completamente il fabbisogno nutrizionale giornaliero sia in condizioni di riposo che durante esercizio fisico. Nonostante questo, nella pratica sportiva, si fa spesso ricorso ad integratori alimentari che contengono elevate concentrazioni di BCAA e che dovrebbero potenziare i

processi metabolici e in particolare anabolici, quali aumento delle masse muscolari e della forza.

L'eccesso di aminoacidi ramificati, però, può essere dannoso. Il 60% di BCAA viene metabolizzato a livello extraepatico e in particolare nel tessuto muscolare, a differenza degli altri aminoacidi che sono totalmente metabolizzati a livello epatico. Alcuni degli intermedi che si formano durante il loro catabolismo (ad esempio l'acido chetonico a catena ramificata, BKCA) ad alte concentrazioni possono affaticare il sistema renale e diventare dannosi. È stato infatti dimostrato che nei ratti la somministrazione in cronico di BCAA attraverso la dieta (con un rapporto leucina: isoleucina: valina di 2.1:1:1.2) diventa tossica se la concentrazione supera i 10g per Kg di peso corporeo [Okazaki et al. (1989) *Clin Rep* 23: 1863-1903]. I BCAA che non vengono utilizzati a livello muscolare vengono immessi nuovamente nel circolo ematico, grazie al quale possono raggiungere e superare la barriera ematoencefalica. È stato dimostrato che i livelli di BCAA e degli intermedi del loro catabolismo sono altamente regolati in diverse aree del cervello e un loro accumulo può portare a disfunzioni cerebrali e indurre la morte neuronale [Navarro et al. (2008) *Metab Brain Dis* 23: 445-455].

L'obiettivo dello studio è stato quello di verificare se il trattamento prolungato di neuroni corticali con aminoacidi ramificati fosse in grado di modificarne le proprietà elettrofisiologiche.

**Materiali e metodi** – I dati riportati sono stati ottenuti con esperimenti eseguiti su neuroni corticali di topo C57BL/6J in coltura primaria [Carunchio et al. (2007) *Epilepsia* 48: 654-662]. I neuroni corticali sono stati prelevati da embrioni di topo al 15° giorno di gestazione. La corteccia è stata rimossa da ciascun embrione e incubata con tripsina (0.025%) in PBS per 10 minuti a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%. Dopo la dissociazione meccanica i neuroni sono stati piastrati su vetrini precedentemente trattati con Poly-L-Lisina (10 microg/ml), e conservati in incubatore alla temperatura costante di 36°C e con una percentuale di CO<sub>2</sub> del 5%.

Per studiare le proprietà elettriche dei neuroni corticali sono state effettuate registrazioni elettrofisiologiche a temperatura ambiente a partire dall'8° giorno in coltura, utilizzando la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell e in modalità current clamp. Sono state confrontate le proprietà elettrofisiologiche di neuroni in condizioni di controllo o esposti in cronico ad elevate concentrazioni di aminoacidi ramificati. Nel terreno di coltura cellulare sono stati aggiunti 200 mM di Leucina (Leu), 200 mM Isoleucina (Ile) e 200 mM Valina (Val) (in rapporto 1:1:1) [Hutson et al. (1998) *J Neurochem* 71: 863-874], a partire dal primo giorno in coltura (1 DIV) fino al settimo (7 DIV). I dati sono stati analizzati utilizzando il software pClamp 9 (Axon Instruments) e Origin 6.1 (OriginLab Corporation) mentre l'analisi statistica è stata effettuata con il software SPSS 11.0 (LEAD Technologies, USA).

**Risultati** – Dall'analisi dei dati sperimentali si è potuto constatare che il potenziale di riposo non risulta modificato nei neuroni trattati per 6 giorni con i BCAA, così come non vengono alterate le proprietà passive di membrana (Resistenza, Capacità, Tau). Per valutare le proprietà attive di mem-

brana, le cellule corticali sono state stimulate con una corrente di +60 pA ed è stato analizzato il primo potenziale d'azione e la frequenza di insorgenza dei potenziali d'azione. Nei neuroni trattati con i BCAA per 6 giorni, il tempo di soglia ( $26.31 \pm 17.91$  ms) e il potenziale di soglia ( $-26.31 \pm 4.15$  mV,  $n=14$ ) del primo potenziale d'azione differivano significativamente rispetto ai Controlli ( $43.67 \pm 22.43$  ms,  $-29.24 \pm 4.38$  mV,  $n=39$ ; Student *t*-test,  $P<0.05$ ).

L'analisi della frequenza di insorgenza dei potenziali d'azione, stimata come l'inverso dell'intervallo di tempo tra i primi due potenziali, ha mostrato che nelle cellule trattate per 4, 5, 6, e 7 giorni con i BCAA, tale parametro aumentava significativamente (ANOVA test;  $p<0.05$ ). Le cellule corticali trattate con i BCAA presentavano un numero maggiore di potenziali d'azione nell'unità di tempo e quindi risultavano maggiormente eccitabili rispetto ai controlli. Inoltre in neuroni esposti per 6 giorni a BCAA, l'iniezione di +20 pA di corrente era sufficiente per indurre la produzione di potenziali d'azione, evento che non si è verificato in nessuna delle cellule registrate in condizioni di controllo. Indipendentemente dalla quantità di corrente iniettata, la frequenza di firing risultava significativamente maggiore dopo 6 giorni di esposizione a BCAA ( $n=26$ ), rispetto ai Controlli ( $n=54$ ). I valori variavano da  $9.73 \pm 7.53$  a  $40.07 \pm 14.99$  Hz nei Controlli e da  $17.37 \pm 11.51$  a  $61.36 \pm 13.35$  Hz nelle cellule trattate con BCAA. Per testare la specificità d'azione dei BCAA sull'osservata ipereccitabilità di neuroni corticali, si sono utilizzati due aminoacidi, Fenilalanina e Alanina. Gli stessi esperimenti riportati in precedenza sono stati condotti su neuroni esposti per 6 giorni a 200  $\mu$ M di Fenilalanina, o Alanina, o Valina, o Leucina, o Isoleucina.

Le frequenze registrate in risposta alla stimolazione con 60 pA di corrente, in condizioni di Controllo ( $14.26 \pm 8.85$ ;  $n=55$ ), in presenza di Alanina ( $13.39 \pm 5.79$ ;  $n=8$ ), e Fenilalanina ( $14.93 \pm 10.43$ ;  $n=8$ ) non erano significativamente diverse tra loro (ANOVA test;  $P>0.05$ ), mentre risultavano differenti rispetto alle frequenze riscontrate nei neuroni esposti a 200  $\mu$ M Valina ( $28.66 \pm 11.19$ ;  $n=20$ ), Isoleucina ( $23.18 \pm 15.92$ ;  $n=9$ ) e Leucina ( $22.47 \pm 11.05$ ;  $n=7$ ) singolarmente (ANOVA test;  $P<0.05$ ).

**Conclusioni** – I dati riportati in questa tesi rappresentano un primo studio elettrofisiologico degli effetti dei BCAA sulle proprietà attive e passive delle membrane neuronali. Da questi esperimenti è emerso che alte e prolungate esposizioni ad aminoacidi ramificati inducono delle alterazioni nelle proprietà attive delle membrane di neuroni corticali. Infatti, mentre le proprietà passive non risultano influenzate dalla presenza eccessiva di BCAA, i valori dei potenziali e dei tempi di raggiungimento della soglia dei potenziali d'azione risultano significativamente inferiori rispetto a quelli registrati in condizioni di controllo. Queste alterazioni possono giustificare la maggiore eccitabilità riscontrata in neuroni corticali esposti ad aminoacidi ramificati. Gli esperimenti condotti consentono anche di dimostrare che queste alterazioni sono attribuibili all'azione specifica di aminoacidi a catena ramificata, in quanto il trattamento con altre classi di aminoacidi non determina gli stessi effetti.

Questi dati suggeriscono che l'assunzione di integratori alimentari a base di BCAA può essere dannosa, essendo in grado di alterare le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni corticali.

### **ANALISI DELLA FOSFORILAZIONE DI CASPASI-8 NELLA TUMORIGENESI E NELLA METASTATIZZAZIONE (Caterina Cenci)**

Il progetto di lavoro svolto si è basato sull'analisi dei meccanismi che regolano il ruolo non apoptotico di Caspasi-8, una proteina principalmente nota per svolgere un ruolo essenziale nell'attivazione dei processi che inducono alla morte cellulare. Cellule in cui Caspasi-8 è assente o inattiva sono resistenti all'apoptosi indotta dai ligandi per i recettori di morte (Fas e TRAIL). Sorprendentemente però, diversi studi hanno rilevato un ruolo non apoptotico per questa proteina [per delle *reviews* Maelfait, Beyaert (2008) *Biochem Pharmacol* 76: 1365-1373; Frisch SM (2008) *Cancer Res* 68: 4491-4493] evidenziando una nuova funzione della Procaspasi-8 nel promuovere l'adesione e la motilità cellulare, processi che contribuiscono in modo significativo alla metastatizzazione dei tumori. Uno studio precedente ha indicato Caspasi-8 come un nuovo substrato delle chinasi appartenenti alla famiglia Src [Cursi et al. (2006) *EMBO J* 19: 931-941]. Src, che risulta aberrantemente attiva in diversi tipi di tumori, fosforila Caspasi-8 alla Tirosina 380 (Y380), un residuo aminoacidico situato nella regione di legame fra la subunità maggiore e quella minore di Procaspasi-8. La fosforilazione di Y380 ad opera di Src (Caspasi-8 P-Y380) interferisce col processamento della Procaspasi-8 e ne impedisce l'attività proapoptotica. Src non è invece in grado di bloccare l'induzione dei processi apoptotici in cellule in cui è espressa una variante di Caspasi-8 che non può essere fosforilata (Caspasi-8Y380F).

*Ruolo della fosforilazione di Caspasi-8 nei processi di ancoraggio e migrazione cellulare* – Diversi studi hanno evidenziato un ruolo della Procaspasi-8 nei processi di migrazione cellulare. Sulla base di queste osservazioni è stato scelto di analizzare il possibile ruolo della forma fosforilata di Caspasi-8 nella promozione della crescita tumorale e della metastatizzazione. Per questo progetto sono stati prodotti cloni di cellule in cui l'espressione della forma *wild-type* o di quella non fosforilabile di Caspasi-8 è regolata tramite induzione con doxyciclina. È stato scelto di utilizzare la linea DLD1R, cellule derivate da un tumore del colon. Queste sono caratterizzate da livelli estremamente bassi di Caspasi-8 e dalla presenza di Src attivo, da cui ne segue una resistenza all'apoptosi indotta da Fas e TRAIL. I vettori inducibili pSMVcaspasi-8WT e pSMVcaspasi-8Y380F sono stati clonati in laboratorio e trasfettati nelle cellule che quindi sono state selezionate stabilmente e caratterizzate per la capacità di esprimere Caspasi-8 in seguito a trattamento con doxyciclina. Esperimenti di immunoprecipitazione anti-Caspasi-8 e conseguente immuno-detezione con anticorpo anti fosfo-tirosina hanno permesso di confermare che Src endogeno fosforila la forma *wild type* ma non quella mutata in Y380 della proteina. Inoltre è stata calcolata l'efficienza di induzione della morte cellulare in seguito a trattamento di queste cellule con TRAIL. Ciò è stato effettuato tramite analisi al FACS dell'incorporazione cellulare di Propidio Ioduro ed ha

permesso di osservare che l'espressione inducibile di Caspasi-8 risensibilizza le cellule all'apoptosi, in particolare la forma non fosforilabile. Infatti, se in seguito a sei ore di trattamento con TRAIL si osserva un aumento del 23% dell'apoptosi per cellule DLD1RSMVcaspasi-8WT, cellule DLD1RSMVcaspasi-8Y380F subiscono un ulteriore aumento (42%). La maggiore efficienza di Caspasi-8Y380F nell'indurre l'apoptosi è a conferma del ruolo antiapoptotico della fosforilazione della Caspasi ad opera di Src.

Al fine di studiare il possibile ruolo di Caspasi-8 P-Y380 nel promuovere la crescita tumorale, cellule DLD1RSMV, DLD1RSMVcaspasi-8WT e DLD1RSMVcaspasi-8Y380F sono state analizzate per la loro capacità di formare colonie quando coltivate in *soft agar*, in una condizione di crescita cioè che è indipendente dall'ancoraggio con un substrato. Da questi esperimenti è emerso che cellule esprimenti la forma *wild type* della proteina sono più efficienti nel formare colonie rispetto a quelle che non la esprimono o che esprimono la forma non fosforilabile. In particolare, cellule DLD1R hanno una scarsa efficienza nella crescita (in media 3 colonie dopo 21 giorni) al contrario delle cellule ricostituite per Caspasi-8 *wild type* che crescono con un'efficienza dieci volte maggiore (in media 32,6 colonie). Sebbene l'espressione di Caspasi-8Y380F comporti un aumento nella capacità di crescere in *soft agar* rispetto a cellule che non esprimono la proteina, l'efficienza è comunque minore quando confrontata con cellule DLD1RSMVcaspasi-8WT (in media 17 colonie) (per questo esperimento N = 3). Gli stessi esperimenti di crescita in *soft agar* sono poi stati effettuati in cellule della linea HepG2 che esprimono normalmente Caspasi-8. La crescita di queste cellule è stata confrontata con quella delle stesse cellule in cui Caspasi-8 è stata silenziata stabilmente (HepG2shcaspasi-8) tramite infezione con il vettore retrovirale pRetroSuper-shcaspasi-8 clonato in laboratorio. Questi studi hanno confermato quanto osservato con le cellule DLD1R. Cellule silenziate per Caspasi-8, infatti, esibiscono una minore efficienza nel formare colonie rispetto a cellule che esprimono livelli normali della proteina (Numero colonie HepG2=45, HepG2scramble=33, HepG2shcaspasi-8=22; N=3). Questi esperimenti suggeriscono che, paradossalmente, Caspasi-8 è necessaria per garantire un maggiore tasso di crescita cellulare e indicano che la fosforilazione in Y380 promuove la tumorigenesi.

Al fine di analizzare l'intervento di Caspasi-8 nei processi di migrazione cellulare, cellule HepG2scramble e HepG2shcaspasi-8 sono state analizzate per la loro capacità di attraversare una membrana porosa per spostarsi in un compartimento in cui è presente un chemoattrattante, nel caso specifico rappresentato da siero fetale bovino (*Transwell assay*). Da questi primi studi emerge che cellule che esprimono Caspasi-8 migrano con maggiore efficienza (59%) rispetto alle cellule silenziate. Ulteriori studi sono in corso per definire la risposta di queste cellule in seguito a trattamento con fattori di crescita noti per indurre migrazione cellulare e, in particolare, per definire il ruolo della fosforilazione in Y380 in questi processi.

*Meccanismi molecolari che modulano la fosforilazione di caspasi 8* – La defosforilazione della Y380 è un prerequisito essenziale affinché Caspasi-8 possa svolgere il proprio ruolo di effettore apoptotico in risposta a determinati sti-

moli. Per questo motivo è essenziale individuare quali Tirosin fosfatasi (PTP *Protein Tyrosin Phosphatase*) possano riconoscere e defosforilare Y380 e contrastare così gli effetti indotti da Src. A tale scopo sono stati condotti studi di co-immunoprecipitazione di Caspasi-8 con diversi domini di PTP non cataliticamente attivi (mutanti *Trapping*). Questi esperimenti preliminari hanno evidenziato una possibile interazione funzionale fra la Caspasi-8 fosforilata in Y380 ed un ampio numero di tirosin-fosfatasi, tra cui SHP1, SHP2, PTP-1B e TC-PTP. Per quanto riguarda SHP1, questa induce la defosforilazione di molti substrati di Src, è principalmente espressa in cellule della linea ematopoietica e la sua alterazione conduce allo sviluppo di neoplasie linfoidi e mieloidi. È importante sottolineare che un ruolo diretto nella defosforilazione di Caspasi-8 da parte di SHP1 era stato precedentemente evidenziato in neutrofilii apoptotici [Hui Jia et al. (2008) *JBC*]. Per quanto riguarda le altre PTP isolate da questo studio un loro ruolo nella defosforilazione di Caspasi-8 non era stato finora caratterizzato. SHP2 e PTP1B sono fosfatasi ubiquitarie a differenza di TC-PTP che è invece principalmente espressa in linfociti T.

Saggi di overespressione in cellule HEK293T e immunoprecipitazione di Caspasi-8 con conseguente analisi con l'anticorpo anti P-Y380 hanno rilevato che tutte queste fosfatasi sono in grado di defosforilare la Caspasi, sebbene con diversa efficienza. Questa osservazione è inoltre stata confermata tramite saggi di defosforilazione *in vitro*. In questi esperimenti i domini catalitici delle diverse PTP sono stati purificati e la loro attività catalitica misurata osservando la capacità di defosforilazione di un substrato sintetico (pNPP). L'estratto proteico di cellule HEK293T over-esprimenti Caspasi-8 e Src è stato quindi posto in incubazione a diversi tempi con le diverse PTP. A pari di attività enzimatica è stato osservato che SHP1 e SHP2 defosforilano Y380 con maggiore efficienza rispetto a PTP1B e TC-PTP.

Infine, studi preliminari hanno indicato che l'espressione di SHP1, PTP1B e TC-PTP è in grado di risensibilizzare cellule DLD1R all'apoptosi indotta da TRAIL. Ulteriori studi sono in corso per confermare questi dati e definire un legame funzionale diretto fra defosforilazione di Y380 ad opera di queste PTP e apoptosi.

## **IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI DI TIPO IMMUNOLOGICO**

### **A SCOPO DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO**

#### **NELLE DEMENZE DEGENERATIVE (Antonio Ciaramella)**

**Introduzione** – È stato descritto che il cervello delle persone colpite dalla malattia di Alzheimer (AD) mostra un'intensa attivazione dei processi infiammatori e della risposta immune innata [Akiyama et al. (2000) *Neurobiol Aging* 21: 383-421; Wyss-Coray (2006) *Nat Med* 12: 1005-1015]. Infatti, a livello delle placche amiloidi, sono state identificate numerose cellule attivate della microglia ed è stata descritta un'alterata espressione di citochine, chemochine e proteine del complemento [McGeer et al. (1988) *Neurology* 38: 1285-1291]. Per questo motivo, di recente è emersa l'ipotesi che le citochine pro-infiammatorie possano giocare un ruolo nella patogenesi dell'AD. In particolare, studi condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato come l'interleuchina-

18 (IL-18) sia coinvolta nell'AD. Da una parte, specifiche varianti polimorfiche del promotore di IL-18 sono state associate sia al rischio che al decorso della malattia [Bossù et al. (2007) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78: 807-811]. Dall'altra, una maggiore produzione di IL-18, correlata al deficit cognitivo, è stata riscontrata nei linfo-monociti derivati dal sangue periferico di pazienti con AD rispetto a soggetti di controllo [Bossù et al. (2008) *Brain Behav Immun* 22: 487-492].

Allo scopo di verificare a quale stadio dello sviluppo della demenza di Alzheimer sia coinvolta l'IL-18, nel presente studio è stata effettuata l'analisi di questa citochina e del suo inibitore naturale (IL-18BP) nei soggetti nei quali l'AD è solamente in fase preclinica. Infatti, la possibilità di analizzare i soggetti con deficit cognitivo lieve (in inglese Mild Cognitive Impairment, MCI), ulteriormente classificati in base al tipo di deficit (amnesici e non amnesici; a singolo e multiplo dominio), rappresenta il modello ideale per identificare il gruppo di soggetti con più elevato rischio di ammalarsi di AD. In questo modo, si potrebbero individuare precocemente delle alterazioni biologiche che sono alla base dello sviluppo della malattia, gettando le basi per nuovi approcci terapeutici.

**Metodi** – In questo studio sono stati arruolati 103 soggetti MCI così suddivisi: 49 soggetti MCI amnesici puri (MCIa) e 54 soggetti MCI amnesici multidominio (MCI<sub>m</sub>). Sono stati inoltre arruolati 32 soggetti sani di controllo (CTR), paragonabili per sesso ed età al gruppo degli MCI. Da un sottogruppo di 7 MCIa, 12 MCI<sub>m</sub> e 16 CTR sono state isolate le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), poste in coltura e stimolate con LPS (200 ng/ml). Dopo 18 ore di coltura, i sovranatanti dei PBMC sono stati analizzati per valutare la produzione di IL-18 e delle molecole pro-infiammatorie TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , tramite saggi ELISA. Parallelamente ai sovranatanti di coltura, i livelli di IL-18 e del suo inibitore naturale (IL-18BP) sono stati analizzati anche nel siero. Infine sono state correlate le quantità di molecole circolanti con i valori di deficit cognitivo dei soggetti in esame.

**Risultati** – In maniera analoga a quanto evidenziato precedentemente nei pazienti AD, i PBMC dei donatori MCI, in particolare gli MCI amnesici puri, rilasciano maggiori quantità di IL-18 rispetto ai controlli sani ( $82 \pm 24$  pg/ml negli MCIa rispetto a  $31.4 \pm 8.6$  nei CTR,  $p = 0.02$ ). Risultati analoghi sono stati ottenuti anche in termini di produzione di TNF- $\alpha$  ( $439 \pm 99$  pg/ml negli MCIa rispetto a  $131 \pm 41$  nei CTR,  $p = 0.002$ ) e IL-1 $\beta$  ( $10.1 \pm 2.0$  ng/ml negli MCIa rispetto a  $2.8 \pm 0.5$  nei CTR,  $p = 0.0001$ ). Nel siero degli MCI, così come precedentemente osservato per i pazienti AD, i parametri infiammatori rimangono stabili.

Questa ultima caratteristica evidenzia che, seppure esiste una maggiore propensione delle cellule circolanti a produrre IL-18, tuttavia non si manifesta come un'infiammazione sistemica. Al contrario, potrebbe rispecchiare un'infiammazione cronica, ma di bassa intensità, come quella descritta nel cervello degli individui affetti da processi neurodegenerativi. Per finire, sebbene i livelli di IL-18 nel siero non risultano diversi negli MCI rispetto ai CTR, esiste una correlazione significativa tra la concentrazione di IL-18BP nel siero degli MCI e il grado del loro deficit cognitivo ( $r = -0.274$ ,  $p = 0.0045$ )

**Conclusioni** – Da questi dati emerge che l’alterazione riscontrata nelle cellule di pazienti AD relativa alla capacità di produrre aumentate quantità di IL-18 è presente dalle fasi precliniche della malattia. Inoltre, la correlazione tra valori di deficit cognitivo e la concentrazione di IL-18BP nel siero, riscontrata negli MCI, sembra confermare l’ipotesi che le alterazioni osservate a carico del sistema IL-18 possano avere un coinvolgimento nella patogenesi del danno neurologico nell’AD, già dalle fasi più precoci di malattia.

Questi risultati candidano l’IL-18 come potenziale bersaglio terapeutico nella lotta contro la malattia di Alzheimer.

## **REGOLAZIONE DELLA NEUROGENESI**

### **DA PARTE DEL GENE PC3/TIS21** (Irene Cinà)

**Introduzione e obiettivi** – La neurogenesi, ovvero la produzione di nuovi neuroni, è un processo continuo che persiste nel cervello adulto di numerose specie, compreso l’uomo. Questo meccanismo è stato intensamente studiato in due regioni cerebrali: la zona ventricolare che delimita la parete laterale del ventricolo laterale (SVZ), e la zona subgranulare del giro dentato ippocampale (SGZ) (Gage FH, 2002).

Gli obiettivi del programma di ricerca sono stati, quindi, quelli di caratterizzare i meccanismi molecolari alla base della neurogenesi ippocampale. In questa zona le nuove cellule destinate a diventare neuroni vengono generate lungo la parte interna della SGZ. Queste cellule migrano a breve distanza nello stato granulare del giro dentato, inviando i propri dendriti nello strato molecolare dell’ippocampo ed i propri assoni verso la regione CA3 ippocampale [Hastings, Gould (1999) *J Comp Neurol* 413(1): 146-154; Markakis, Gage (1999) *J Comp Neurol* 406(4): 449-460]. Sulla base delle caratteristiche morfologiche, della presenza di marker proteici peculiari e dell’attività proliferativa delle cellule è stato proposto un modello che descrive sei differenti stadi di sviluppo nell’ippocampo adulto [Kempermann (2004) *Trends Neurosci* 27(8): 447-452]. Secondo questo modello la divisione di una cellula staminale (cell di tipo 1) dà origine a tre stadi consecutivi di progenitori proliferanti (tipo 2ab e tipo 3) che differiscono tra loro per capacità proliferative e per un progressivo aumento dello stato differenziativo. Successivamente i neuroblasti escono dal ciclo cellulare ed entrano in uno stato transiente postmitotico durante il quale si stabiliscono connessioni neurali. Infine si giunge alla formazione del neurone maturo integrato correttamente nel microambiente ippocampale.

Numerosi studi hanno iniziato a far luce sui segnali molecolari specifici che controllano la neurogenesi del giro dentato, ed in questo complesso contesto molecolare si inserisce la recente scoperta del ruolo del gene PC3 nel processo di maturazione dei precursori granulari del giro dentato adulto. Il gene PC3 fisiologicamente viene espresso nei precursori neuronali prima dell’ultima divisione asimmetrica [Iacopetti et al. (1994) *Mech Dev* 47(2): 127-137; Iacopetti et al. (1999) *PNAS USA* 96(8): 4639-4644], e durante la neurogenesi, in alcune aree del CNS, è in grado di indurre il loro differenziamento terminale [Corrente et al. (2002) *Neuroreport* 13(4): 417-422; Canzoniere et al. (2004) *J Neurosci* 24(13): 3355-3369]. Per tentare di capire quali geni vengano

regolati da PC3 e quali siano le implicazioni funzionali dell'espressione di tale gene nell'ippocampo adulto abbiamo deciso di utilizzare un modello murino in cui PC3 viene sovraespresso in modo condizionale ed in particolare soltanto nelle cellule che esprimono la nestina, una proteina peculiare delle cellule staminali cerebrali presenti nella SGZ ed in pochissime altre zone del cervello adulto.

**Risultati e discussione** – La nostra analisi del giro dentato, tramite saggi di immunohistochimica, mostra che l'attivazione del transgene PC3 sotto la guida del promotore nestina porta ad un forte aumento dei granuli neuronali ippocampali (stadio 6, cellule positive per NeuN e Brdu), accompagnato da una diminuzione parallela delle cellule staminali (tipo 1) e dei progenitori cellulari (tipo 2ab-3) della stessa età. Questo chiaramente indica una transizione accelerata dei nuovi progenitori verso il differenziamento terminale. Tale differenziamento anticipato dei progenitori cellulari dipendente da PC3 è in linea con le proprietà differenziali di PC3 sui precursori cerebellari [Canzoniere et al. (2004) *J Neurosci* 24(13): 3355-3369]. Questo differenziamento potrebbe derivare in prevalenza dalla divisione neurogenica di tipo asimmetrico, alla quale l'espressione di PC3 è associata [Kosodo et al. (2004) *EMBO J* 23(11): 2314-2324; Gotz, Huttner (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(10): 777-788]. Quest'ultima ipotesi è in accordo con l'osservazione che l'azione neurogenica esercitata da PC3 non è accompagnata da una riduzione della frequenza di proliferazione dei progenitori cellulari del giro dentato dei topi con il transgene attivato, come suggerito dai saggi di immunohistochimica e dalla conta delle cellule esprimenti BrdU e Ki67.

È stato dimostrato, da uno studio recentissimo, che i nuovi neuroni generati nel giro dentato sono progressivamente integrati nei circuiti relativi alla memoria spaziale dopo 4-6 settimane di età. Tali evidenze sono state ottenute con la misurazione dell'espressione di c-fos [Kee et al. (2007) *Nat Protoc* 2(12): 3033-3044]. I cambiamenti nell'espressione di questo gene precoce sono correlati con l'attivazione neuronale, e di conseguenza può essere utilizzato come marcatore dell'attivazione neuronale nel cervello [Guzowski et al. (2005) *Curr Opin Neurobiol* 15(5): 599-606]. Noi volevamo capire se il differenziamento anticipato dei nuovi granuli del giro dentato avesse un effetto sul tempo in cui, questi granuli, diventano attivi all'interno dei circuiti coinvolti nella memoria, e sull'estensione della loro attivazione. Abbiamo contato il numero di nuovi neuroni che si sono formati a 2, 4 e 6 settimane che, oltre ad essere positivi per NeuN, lo erano anche per c-fos, indicando in questo modo una categoria di neuroni attivati durante i test comportamentali. Quello che abbiamo riscontrato è l'assenza dell'attivazione di c-fos nei nuovi neuroni di 4-6 settimane di età che esprimono sin dalla nascita in maniera continua PC3, suggerendo che questi neuroni non raggiungono uno stato funzionale nei circuiti ippocampali.

A questo punto ci siamo chiesti se questo differenziamento prematuro e le alterazioni funzionali da noi osservate potessero trovare una correlazione strutturale nelle alterazioni morfologiche, che sono molto evidenti nei nuovi neuroni di 4 settimane, identificati mediante infezione con il retrovirus espri-

mente GFP. Infatti, in questi neuroni è stata evidenziata una forte riduzione delle arborizzazioni dendritiche, in termini di lunghezza dendritica, e una riduzione della densità delle spine. La riduzione della struttura dendritica che noi abbiamo osservato ha sicuramente effetti sulla formazione delle spine – essendo spazialmente limitata dai dendriti – ed in ultima analisi anche sugli input sinaptici afferenti, dato che ciascuna spina riceve un solo bottone sinaptico [Harris, Kater (1994) *Annu Rev Neurosci* 17: 341-371]. Quindi, di conseguenza, i neuroni potrebbero avere una riduzione degli input afferenti. Quindi, possiamo concludere che l'anticipazione del differenziamento dei nuovi neuroni generati nel giro dentato adulto indotto nel modello transgenico per PC3 rivela un ruolo critico del tempo di sviluppo per la formazione di neuroni pienamente in grado di integrare nuove informazioni di memoria spaziale.

### **RISPOSTE NEURONALI A CONCENTRAZIONI TOSSICHE DI AMINOACIDI ECCITATORI** (Maria Letizia Cucchiaroni)

**Introduzione** – L'“ALS-PDC complex” è una sindrome complessa caratterizzata da sintomatologie cliniche tipiche della sclerosi laterale amiotrofica (SLA), della malattia di Parkinson e dell'Alzheimer che si sviluppa prevalentemente tra la popolazione dell'isola di Guam [Garruto, Yase (1986) *Trends Neurosci* 9: 368-374; Spencer et al. (1987) *Science* 237: 517-522; Reed, Brody (1975) *Am J Epidemiol* 101: 287-301]. Sembra che alla base di questa malattia ci sia un'esposizione prolungata all'aminoacido non proteico  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) [Spencer et al. (1987) *Science* 237: 517-522]. La recente scoperta che la BMAA può essere prodotta da cianobatteri presenti in tutto il mondo [Cox et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13380-13383; Ince, Codd (2005) *Neuropathol Appl Neurobiol* 31: 345-353] ha aumentato l'interesse per il coinvolgimento di questa tossina in altre malattie neurodegenerative. Inoltre la BMAA si può accumulare in batteri, piante, animali e tessuti umani sia come aminoacido libero che legato alle proteine [Murch et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12228-12231]. Questo crea una riserva di neurotossina all'interno del corpo umano, che viene rilasciata lentamente nel cervello ed altri tessuti durante il catabolismo proteico per anni o decenni dopo il suo consumo. Studi *in vivo* [Spencer et al. (1987) *Science* 237: 517-522; Smith, Meldrum (1990) *Eur J Pharm* 187: 131-134; Rakonczay et al. (1991) *J Neurosci Res* 29: 121-126; Chang et al. (1993) *Chin J Physiol* 36: 79-84; Santucci et al. (2009) *J Neurochem* 109: 819-825] e *in vitro* hanno dimostrato che la BMAA agisce come agonista glutammatergico sui motoneuroni spinali [Rao et al. (2006) *Exp Neurol* 201: 244-252], corticali [Lobner et al. (2007) *Neurobiol Dis* 25: 360-366] e cerebellari [Staton, Bristow (1997) *J Neurochem* 69: 1508-1518]. Tuttavia, non è ancora presente uno studio dettagliato della sua azione sulle cellule dopaminergiche della substantia nigra pars compacta (SNpc). Quindi, lo scopo del presente progetto era quello di identificare i cambiamenti elettrofisiologici, le variazioni intracellulari di calcio e gli effetti tossici indotti dalla BMAA sui neuroni SNpc. È stato dimostrato che la BMAA attiva preferenzialmente i recettori metabotropici del glutammato (mGluR1)

sui neuroni dopaminergici della SNpc e in minore misura i recettori AMPA. Inoltre, la sua prolungata applicazione induce un massivo rilascio di *cyt-c* dai mitocondri che viene mitigato dall'applicazione degli antagonisti dei recettori mGluR1 e AMPA.

**Materiali e metodi** – *Preparazione del tessuto* – Ratti Wistar (P18-P22) (Laboratori Charles River, Milano, Italia) sono stati anestetizzati profondamente con l'alotano e decapitati. Il cervello è stato poi rapidamente rimosso dalla scatola cranica e con il vibratomo sono state tagliate fettine orizzontali dello spessore di 250  $\mu$ m contenenti la SNpc. Queste sono state mantenute in una soluzione (ACSF) contenente (mM): NaCl 126, KCl 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.4, glucosio 10, e NaHCO<sub>3</sub> 24; 290 mOsm<sup>-1</sup> saturato con 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4). Dopo 30 minuti di stabilizzazione, una singola fettina è stata trasferita in una cameretta di registrazione (volume 0.6 ml) e continuamente sommersa da ACSF a 34-35 °C.

*Registrazioni di patch-clamp* – Registrazioni di whole cell patch clamp, combinate a microfluorimetria, sono state effettuate sui neuroni della SNpc, localizzati in una regione ad elevata densità neuronale adiacente al nucleo mediale terminale del tratto ottico accessorio. La pipetta di registrazione (2-5 M $\Omega$ ), forgiata con il puller PP 83 Narishige (Tokyo, Giappone), è stata riempita con una soluzione contenente (in mM): K-gluconato (115), CaCl<sub>2</sub> (4), MgCl<sub>2</sub> (2), KCl (10), EGTA (10), Hepes (10), Mg<sub>2</sub>-ATP (2), Na<sub>3</sub>-GTP (0.3); pH 7.3; osmolarità 280 mOsm. Per esperimenti di microfluorimetria, è stata utilizzata la seguente soluzione (mM): K-gluconato (135), CaCl<sub>2</sub> (0.1), MgCl<sub>2</sub> (2), KCl (10), EGTA (0.75) e 0.25 fura-2 pentapotassium salt (Invitrogen, USA); pH 7.3; osmolarità 280 mOsm.

Gli esperimenti in whole-cell voltage-clamp o current-clamp sono stati condotti usando l'amplificatore Axopatch 200 B (Molecular Devices, CA, USA), filtrati ad 1 kHz e digitalizzato a 10 kHz. In voltage-clamp il potenziale di holding ( $V_{\text{hold}}$ ) era -60 mV. Non è stata aggiunta nessuna corrente di holding durante registrazioni in current-clamp. BMAA (3 mM), disciolta in ACSF, è stata spruzzata nelle immediate vicinanze della cellula per applicazione di pressione positiva (10 psi, 0.5-1.0 s), attraverso un elettrodo di registrazione connesso al Pneumatic Pico-pump PV 800 (WPI, Berlino, Germania). Le applicazioni sono state ripetute costantemente ogni 2 minuti. I dati sono stati acquisiti usando i software Clampex e AxoScope (v.9, Molecular Devices).

*Microfluorimetria* – I neuroni sono stati riempiti usando una soluzione in pipetta di registrazione contenente Fura-2 (sale pentapotassio), composto sensibile al Ca<sup>2+</sup> (Invitrogen, USA). Un monocromatore (Till Photonics) ha fornito una luce UV di eccitazione (340 and 380 nm). Le variazioni di fluorescenza sono state espresse come "Ratio" (R) e calcolate con la seguente formula  $R = (F_{340\text{soma}} - F_{340\text{bg}})/(F_{380\text{soma}} - F_{380\text{bg}})$ , dove  $F_{340}$  e  $F_{380}$  erano le fluorescenze emesse ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 340 e 380 nm, rispettivamente, per il corpo cellulare (soma) e lo sfondo (bg), misurate da una regione >100  $\mu$ m lontana dal corpo cellulare [Guatteo et al. (1998) *J Neurophysiol* 80: 2237-2243]. I valori raziometrici sono stati convertiti in concentrazione usando il metodo di Grynkiewicz et al. [(1985) *J Biol Chem* 260: 3440-3450].

*Microscopia confocale* – La preparazione del tessuto era identico a quello precedentemente descritto per gli esperimenti di elettrofisiologia. Dopo il taglio, le fettine sono state divise in 6 camerette contenenti ACSF standard saturato con  $O_2/CO_2$ . Nella prima cameretta (CTRL) non è stato aggiunto nessun composto; nella seconda (BMAA) è stata aggiunta BMAA (3 mM) e nelle altre BMAA più CPCCOEt (100  $\mu$ M), o CNQX (10  $\mu$ M), o JNJ (1  $\mu$ M), o una miscela di JNJ più CNQX. Dopo 1h di trattamento, le fettine dalle 6 camerette sono state lasciate recuperare per 5h in 6 distinte camerette riempite solo con ACSF. Dopo le fettine sono state fissate tutta la notte in paraformaldeide 4% e, dopo 3 lavaggi in PB, trasferite in 30% sucrosio/PB a 4°C per 48h. Subito dopo, sono state tagliate in sotto-fettine dello spessore di 35  $\mu$ m usando un microtomo e direttamente montate su vetrini. Le sezioni sono state incubate tutta la notte in una miscela contenente i seguenti anticorpi primari: anti-tirosina idrossilasi di capra (TH; 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-citocromo-*c* di topo (Cyt-*c*; 1:100; Promega, Madison, WI, USA).

Dopo questa incubazione, le sezioni sono state incubate per 2h a temperatura ambiente in una miscela di anticorpi secondari inclusi anti-capra IgG di asino Cy3-coniugati, e anti-topo IgG di asino Cy2- coniugati (1:100; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Le sezioni sono state poi asciugate all'aria e ricoperte con il Gel/Mount (Biomedica, Foster City, CA, USA). Le immagini sono state acquisite attraverso un microscopio confocale (Leica SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipaggiato con 4 linee di luce: a 405 nm, 488 nm, 543 e 633 nm. Le misurazioni quantitative e qualitative sono state limitate alla SNpc e sono state ottenute da 25 sezioni (5 sezioni per ognuna delle 5 fettine).

**Risultati** – *Azione della BMAA sulle proprietà di membrane e sulle variazioni di calcio intracellulare nelle cellule della SNpc* – Prima di tutto abbiamo indagato, in modalità current-clamp, gli effetti della BMAA sulla capacità del neurone di emettere potenziali d'azione (firing). L'applicazione in bagno (1.5-2 minuti) della BMAA (0.1-10 mM) aumentava la frequenza di firing spontaneo in modo dose-dipendente (progressivamente da  $0.7 \pm 0.5$  Hz a  $4.5 \pm 1.3$  Hz) e induceva una depolarizzazione di membrana rapida e reversibile (da  $1.4 \pm 0.1$  mV a  $19.6 \pm 0.7$  mV).

Registrazioni in modalità voltage-clamp hanno permesso di dimostrare che la depolarizzazione di membrana indotta dalla BMAA era dovuta ad una corrente entrante (inward,  $I_{BMAA}$ ), la cui ampiezza media era compresa tra  $20.8 \pm 3.85$  pA e  $1004 \pm 160.3$  pA in risposta a concentrazioni crescenti di BMAA (0.1-10 mM). Per eseguire degli esperimenti di farmacologia della  $I_{BMAA}$  e delle associate variazioni di calcio intracellulari abbiamo spruzzato la tossina (3 mM) ogni 2 minuti nelle immediate vicinanze della cellula registrata attraverso applicazione di pressione positiva.

Per mezzo di questo approccio sperimentale, abbiamo ottenuto transienti rapidi e riproducibili di  $I_{BMAAs}$  di ampiezza media  $454.5 \pm 34.6$  pA ( $n = 73$ ), che erano accompagnati da transienti di calcio reversibili e riproducibili di  $139.3 \pm 23.7$  nM ( $n = 13$ ). Poiché la forma  $\beta$ -carbammato della BMAA, prodotta in una soluzione contenente bicarbonato, ha una struttura chimica simile al glu-

tammato [Brownson et al. (2002) *J Ethnopharmacol* 82: 159-167; Myers, Nelson (1990) *J Biol Chem* 265: 10193-10195], ci siamo proposti di indagare quale recettore glutammatergico fosse attivato dalla BMAA usando antagonisti selettivi dei recettori glutammatergici. In presenza di CPCCOEt (100  $\mu$ M), un selettivo antagonista dei recettori mGluR1,  $I_{BMAA}$  è stata ridotta al  $41.6 \pm 3.6$  % rispetto al controllo ( $p < 0.0001$ ,  $n = 24$ ). In presenza di CNQX (10  $\mu$ M), un antagonista selettivo dei recettori AMPA,  $I_{BMAA}$  era leggermente ma significativamente ridotta al  $93.1 \pm 2$  % del controllo ( $p < 0.01$ ,  $n = 24$ ). Gli antagonisti dei recettori NMDA, MK801 (10  $\mu$ M) e APV (50  $\mu$ M), e quelli del recettore mGluR5, MPEP (10  $\mu$ M), non hanno modificato significativamente l'ampiezza della  $I_{BMAA}$ . Infatti, in presenza di APV o MK801 la corrente era  $98.7 \pm 2.2$  % del controllo ( $p = 0.6$ ,  $n = 6$ ) e  $104 \pm 8.8$  % del controllo ( $p = 0.7$ ,  $n = 4$ ), rispettivamente mentre in presenza di MPEP  $I_{BMAA}$  era  $95.4 \pm 4.9$  % del controllo ( $p = 0.4$ ,  $n = 7$ ). Questi risultati dimostrano che  $I_{BMAA}$  è attivata soprattutto da mGluR1 e, in misura minore, dagli antagonisti AMPA.

*La BMAA non è sequestrata dai trasportatori degli aminoacidi eccitatori (EAATs)* – Abbiamo verificato la possibilità che gli EAATs possano contribuire alla regolazione della concentrazione della BMAA nello spazio extracellulare influenzando l'ampiezza e la durata della  $I_{BMAA}$  nei neuroni della SNpc. Quindi, abbiamo studiato gli effetti di un potente inibitore degli EAATs, DL-TBOA (100  $\mu$ M) [Shimamoto et al. 1998], su ampiezza ed area.  $I_{BMAA}$  non era influenzata dalla presenza dell'inibitore TBOA. Infatti, l'ampiezza della  $I_{BMAA}$  era  $90.6 \pm 8.7$  % ( $p = 0.3$ ,  $n = 6$ ) e l'area  $101.8 \pm 7.8$  % del controllo ( $p = 0.8$ ,  $n = 6$ ).

*La BMAA induce rilascio di citocromo-c che è prevenuto dagli antagonisti AMPA e mGluR1* – Abbiamo verificato gli effetti tossici della BMAA attraverso analisi morfologiche e quantificazione del rilascio di cyt-c dalle cellule TH-positive. L'esposizione di BMAA (3mM, 1h) induceva un chiaro restringimento delle cellule DAergiche e un massivo rilascio di cyt-c rispetto alle cellule di controllo. Gli antagonisti dei recettori AMPA (CNQX) e/o mGluR1 (JNJ o CPC-COEt) prevenivano significativamente tutti gli effetti tossici indotti dalla BMAA, confermando che la tossicità indotta dalla BMAA è mediata dall'attivazione dei recettori metabotropici e ionotropici (AMPA) del glutammato.

**Conclusioni** – Data la sempre più diffusa presenza della BMAA nelle acque di laghi e fiumi presenti in tutto il mondo, questo studio aiuta a comprendere la sua azione tossica sulle cellule dopaminergiche della SNpc, migliorando la comprensione delle cause alla base della patologia dell'ALS-PDC e, in generale, di forme idiopatiche del morbo di Parkinson.

## **STUDIO DEI MECCANISMI DI RAPPRESENTAZIONE MENTALE DI MOTI NATURALI E NON NATURALI IN SOGGETTI SANI E IN PAZIENTI CON DEFICIT VESTIBOLARE CENTRALE E PERIFERICO (Francesca Figliozzi)**

**Introduzione** – Diversi studi hanno investigato la capacità degli esseri umani di rappresentare ed intercettare i movimenti degli oggetti, suggerendo la possibilità che esista una rappresentazione interna delle leggi fisiche dettate dal-

l'ambiente. Nello specifico, è stato proposto che il Sistema Nervoso Centrale (SNC) possieda un modello interno della legge di gravità, un'invariante cui siamo continuamente esposti durante il corso della nostra vita [Lacquaniti et al. (1993) In: Berthoz (ed) *Oxford, UK: Oxford University Press*, 379393; Lacquaniti, Maioli (1989) *J Neurosci* 9: 134-148; McIntyre et al. (2001) *Nat Neuroscie* 4: 693-694]. È plausibile ipotizzare lo sviluppo di pattern di movimento biologico compatibili con tali leggi, allo scopo di minimizzare l'energia impressa al movimento.

L'obiettivo di questo lavoro era studiare se gli esseri umani fossero in grado di utilizzare le proprie conoscenze implicite sulle leggi fisiche imposte dall'ambiente, per valutare la corretta temporizzazione di scene visive in movimento. In particolare, si intendeva comparare la prestazione ottenuta dai soggetti nelle due condizioni di stimolazione: scene contenenti movimento biologico vs scene contenenti oggetti in movimento. La percezione dei parametri temporali del movimento biologico è tutt'ora poco esplorata. L'unico tentativo di valutare la capacità degli esseri umani di stimare la temporizzazione di scene visive si trova nel resoconto di un esperimento non pubblicato di Johansson e Jansson [Johansson, Jansson (1967). In Watson et al. (1992) *Perception* 21: 6976], in cui i partecipanti dovevano regolare la velocità di una serie di filmati (che riproducevano tuffatori in caduta da un trampolino), per portarli ad un valore che rendesse la scena il più naturale possibile. I risultati descritti in questo studio indicano che gli osservatori sono in grado di emettere una stima abbastanza accurata della velocità naturale del movimento. Purtroppo nel breve resoconto non sono specificati: il numero dei soggetti, il dettaglio delle condizioni sperimentali e la direzione dell'errore osservato. Allo scopo di esplorare in modo più approfondito tale tematica, ai soggetti sono stati presentati diversi filmati contenenti movimenti di tipo biologico o non biologico.

Si assume che gli esseri umani siano in grado di utilizzare una rappresentazione interna delle leggi fisiche dettate dall'ambiente per percepire e valutare il movimento biologico in modo analogo a quanto suggerito per il movimento degli oggetti. Partendo da queste premesse, l'accuratezza nella stima della temporizzazione di scene visive contenenti movimento biologico non dovrebbe differire da quanto osservato con stimoli costituiti da oggetti in movimento.

**Metodo** – *Soggetti* – Hanno partecipato allo studio pilota sette soggetti sani, destrimani (24-34 anni; 2 femmine, 5 maschi) con acuità visiva normale o corretta da lenti. I soggetti erano ignari degli scopi della ricerca ma informati sulla procedura sperimentale e la non invasività del test.

*Stimoli* – Gli stimoli consistevano in 10 diversi filmati in cui era presentato un pendolo in oscillazione e 10 diversi filmati in cui era presentato un esercizio alla trave. Ciascun filmato aveva la durata di circa 3 secondi. Ogni singolo filmato è stato presentato a sette diverse velocità di partenza (rispettivamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 Hz). Una di queste velocità corrispondeva alla velocità naturale, registrata durante la ripresa del filmato (25 Hz). In totale sono stati presentati 140 filmati.

*Apparato e procedura* – I soggetti sedevano di fronte allo schermo di un computer (schermo: 21 pollici; distanza: 57cm; definizione: 1024 × 768; frequenza di refresh: 60 Hz). L'area di proiezione del filmato (414 × 414 pixel) era contenuta in un riquadro che misurava 15 × 15 cm (15 gradi). Le risposte erano emesse mediante l'utilizzo dei tasti destro e sinistro del mouse. Per la realizzazione del programma è stato utilizzato il software "Presentation" (Version 14.0; Neurobehavioral Systems Inc., CA).

*Compito* – Il compito consisteva nel valutare la velocità di presentazione del filmato indicando, mediante pressione del tasto corrispondente, se la velocità doveva essere ridotta o aumentata perché corrispondesse a quella naturale. Il soggetto era istruito ad emettere il suo giudizio su un determinato filmato finché il computer non presentava il successivo. Il passaggio al trial successivo era gestito da software dedicato, in base al criterio prescelto per la determinazione della soglia (v. sotto).

*Disegno* – Gli stimoli erano suddivisi in sette diversi blocchi sperimentali, ognuno composto da 20 stimoli presentati in ordine casuale. L'ordine dei blocchi era randomizzato tra i soggetti. La durata di ciascun blocco era di circa 20 minuti. L'esperimento era diviso in due sessioni eseguite in giorni diversi.

*Determinazione della soglia* – La determinazione della soglia per i filmati è stata effettuata mediante la procedura adattativa denominata PEST (Parameter Estimation by Sequential Testing) [Taylor, Creelman (1967) *J Acoust Society Am* 41: 782-787].

**Risultati e conclusioni** – Sono state registrate le velocità scelte dai soggetti nelle diverse condizioni sperimentali. I valori medi sono stati sottoposti ad una ANOVA a due vie (2X7) nella quale i fattori ripetuti erano il tipo di filmato (pendolo in oscillazione/esercizio alla trave) e la velocità iniziale del filmato (10/15/ 20/25/30/35/40 Hz). Lo scostamento medio percentuale tra i due tipi di filmato (+15% dalla velocità corretta: pendolo libero di oscillare; +28% dalla velocità corretta: ginnaste che eseguivano esercizi alla trave) non è risultato significativo ( $F_{1,6} = 1.435$ ;  $p = .2760$ ).

È emersa una significatività per il fattore principale relativo alla velocità iniziale del filmato ( $F_{1,5} = 10.770$ ;  $p = .0000$ ). In particolare, la velocità di partenza più elevata (40 frame per secondo) produce una performance diversa da quella prodotta dalle altre velocità iniziali (10Hz = +19%; 15Hz = +19%; 20Hz = 18%; +25Hz = +22%; 30Hz = +22%; 35Hz = +24%; 40Hz = +28%; Post hoc Test HSD Tukey  $p < 0.05$ ). L'interazione tra il fattore tipo di filmato e velocità iniziale del filmato non è risultata significativa ( $F_{1,36} = 0.557$ ;  $p = .7615$ ).

In sintesi si può concludere che la velocità che i soggetti individuano come naturale differisce da quella corretta. La prestazione ottenuta con stimoli costituiti da movimento biologico non differisce significativamente da quella ottenuta con stimoli di tipo non biologico suggerendo la possibilità che i due tipi di stimoli possano essere entrambi elaborati basandosi su un analogo tipo di rappresentazione.

L'errore commesso dai soggetti risulta però maggiore di quanto previsto in base all'ipotesi che sappiano utilizzare le proprie conoscenze implicite sulle

leggi fisiche imposte dall'ambiente per valutare la corretta temporizzazione di scene visive in movimento. La percentuale di errore è più elevata di quella riscontrata in precedenza da Johansson (5-15%) [Johansson, Jansson 1967. In: Watson et al. (1992) *Perception* 21: 6976]. È possibile che fattori legati alla tipologia e alla familiarità degli stimoli oppure alla metodica utilizzata possano spiegare tale discrepanza. Ulteriori studi potranno chiarire tali risultati.

**RIABILITAZIONE E RISONANZA MAGNETICA FUNZIONALE (F-MRI):  
STUDIO LONGITUDINALE NEI PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI MULTIPLA**  
(Licia Finamore)

**Introduzione, materiali e metodi** – Lo studio portato avanti dalla nostra equipe ha provveduto, ad oggi, all'arruolamento di 19 pazienti destrimani affetti da Sclerosi Multipla (Relapsing Remitting o Secondary Progressive). I pazienti sono stati sottoposti a Risonanza Magnetica con acquisizioni funzionali (event-related) e con acquisizioni standard (FLAIR, T1 vol, T2 vol) al tempo 0 (baseline), dopo 3 e 6 mesi. Con le stesse tempistiche i pazienti sono stati valutati da un punto di vista clinico (esame neurologico) e sono stati calcolati i punteggi di: MSIS, FSS, Barthel Index, Rivermead Mobility Index, MS-QoL scale, Nine hole peg Test, Back Depression Inventory (BDI) e PASAT.

**Obiettivi** – Lo scopo dello studio consiste nel verificare se, osservando longitudinalmente una popolazione di pazienti affetti da Sclerosi Multipla in storia naturale e dopo un ciclo riabilitativo, la fMRI è in grado di identificare una modificazione al termine del trattamento di: grado di attivazione corticale; numero ed estensione delle aree attivate in risposta ad un target motorio; evoluzione comparata dei due emisferi; grado di attivazione corticale e/o zone attivate per target di afferenza somato/sensitiva; programmazione corticale del movimento, immaginazione del movimento, esecuzione effettiva del target motorio (event-related fMRI); attivazione cerebellare (apprendimento motorio); aumento dell'attivazione della corteccia sensori-motoria controlaterale e riduzione di quella ipsi-laterale segno di un efficace meccanismo di recupero dei network motori corticali; correlazione tra questi dati e il carico lesionale in T2, in T1, l'atrofia cerebrale (separatamente per sostanza bianca e sostanza grigia), il punteggio delle scale cliniche prima citate.

**Risultati** – I risultati che esporremo sono descrittivi e non possono ritenersi conclusivi visto che sono costituiti da un'analisi preliminare su un campione ancora non statisticamente significativo. Abbiamo arruolato fino ad oggi 19 pazienti affetti da Sclerosi Multipla di cui 4 hanno concluso correttamente lo studio (sono arrivati alla RMN n° 3).

La popolazione in ingresso è costituita, ad oggi, da pazienti con Sclerosi Multipla accertata secondo i criteri di Mc Donald; forma Relapsing Remitting per il 10,52% (2 pz) e Secondary Progressive per il restante 89,48% (17 pz). Cinque pazienti (26,31%) al momento dell'arruolamento non mostravano alcun impaccio nel mimo (grado 0); 6 (31,57%) mostravano un impaccio lieve (grado 1); 3 (15,78%) un impaccio medio (grado 2) e 5 (26,31%) un impaccio severo (grado 3). L'EDSS eseguita all'ingresso ha mostrato un valore medio di

4,5±3,7 ed un trend di miglioramento con una media al tempo 2 pari a 3,5±4,2. Il Barthel Index medio all'ingresso è risultato di 67,87±35,58 anche in questo caso abbiamo evidenziato un trend di miglioramento che al terzo controllo ha raggiunto 80,24±31,29. Il Rivermead Mobility Index medio all'arruolamento è risultato di 7,4±4,96 e al tempo 2 è stato in media di 8,1±5,36. La scala scelta per valutare il sintomo "fatica" nei pazienti arruolati è la Fatigue Severity Scale (FSS) che ha mostrato nei pazienti all'ingresso un punteggio medio di 5,4±1,3 e al terzo controllo una media di 4,2±1,4.

Abbiamo quindi analizzato preliminarmente i dati di risonanza magnetica funzionale. Confermando i dati ampiamente presenti in letteratura, anche i nostri pazienti al tempo 0 presentano un aumento dell'ampiezza delle aree attivate in seguito ad un target motorio nella corteccia motoria e pre-motoria controlaterale ed una co-attivazione di aree dell'emisfero omolaterale alla mano in movimento. L'immaginazione del movimento al tempo 0 (pre-riabilitazione) mostra un'attivazione bilaterale del cervelletto e della corteccia pre-motoria. Nell'immaginazione di un movimento effettuato con la mano non dominante (sinistra) le aree di attivazione sono più estese di quelle controlaterali e solo in questo caso si attiva anche il lobo frontale bilateralmente. Probabilmente lo schema motorio della mano non dominante ha bisogno anche di un'integrazione con la memoria e la motivazione per completarsi. Si nota, inoltre, la co-attivazione anche delle cortecce occipitali (zona calcarina) che deriva dalla stimolazione visiva applicata nei nostri pazienti tramite la presentazione delle fotografie.

Abbiamo proceduto poi ad un'analisi di confronto mediante sottrazione statistica tra le mappe funzionali al tempo 0, 1 e 2. Per l'immaginazione destra (mano dominante) si mostra un risultato evidente: prima della riabilitazione (tempo 1 - tempo 0) il paziente chiamato ad immaginare/pianificare un movimento con la mano destra, attiva le stesse aree evidenti al tempo 0, tra cui anche la zona di integrazione parieto-occipitale omolaterale al movimento e la zona peripontina controlaterale (zona di passaggio per le informazioni cerebellari). Dopo il ciclo di riabilitazione il paziente mostra sempre le solite aree attivate (occipitale calcarina bilaterale per lo stimolo visivo applicato, motoria e pre-motoria bilaterale) e mette in evidenza una differenza importante e congrua: non attiva più l'area di integrazione parieto-occipitale omolaterale al movimento bensì quella controlaterale e non attiva più la zona peri-pontina controlaterale ma quella omolaterale.

Si può concludere preliminarmente, che la riabilitazione sembra in grado di ripristinare un pattern corticale di attivazione controlaterale fisiologico, a fronte di un pattern indotto dalla malattia che predilige la bilateralità e la messa in opera dell'emisfero omolaterale al movimento. Lo stesso risultato è evidente per la funzionalità cerebellare che come sappiamo, a causa del doppio incrocio in discesa delle sue vie è fisiologicamente attivata in maniera omolaterale al movimento, il paziente pre-riabilitazione attiva la zona peripontina controlaterale e post-riabilitazione quella omolaterale. La stessa immagine prodotta per l'immaginazione di un movimento con la mano non dominante sembra confermare l'ipotesi formulata poc'anzi e l'importanza della zona di passaggio parieto-occipitale con un andamento omo-controlate-

rale identico a quello descritto per la mano destra. In aggiunta si evidenzia un'attivazione bilaterale del lobo frontale a conferma di quanto osservato al tempo 0 e cioè che la mano non dominante ha bisogno dell'attivazione frontale probabilmente per un'integrazione polimodale e motivazionale del movimento. Si evince, quindi, come ultimo concetto che la riabilitazione è maggiormente efficace sulla mano dominante.

### **ESPRESSIONE GENICA DEI DIVERSI TRPC NELLO STRIATO E NELLA CORTECCIA DEL MODELLO MURINO DI COREA DI HUNTINGTON (Carmela Giampà)**

**Introduzione** – Il calcio è un secondo messaggero implicato nel controllo di diverse funzioni cellulari; nel sistema nervoso centrale, per esempio, è importante nella propagazione del potenziale d'azione, nella trasmissione sinaptica e per la trasduzione del segnale; interviene in molte funzioni che variano dalla crescita, divisione e differenziazione cellulare, all'apoptosi e morte cellulare [Berridge et al. (2000) *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21]. Sia nelle cellule eccitabili che non, l'entrata del  $Ca^{2+}$  è regolata da una serie di meccanismi che includono l'attivazione di canali ionici voltaggio e recettore dipendenti. In merito a questo meccanismo, negli ultimi anni è stato introdotto il concetto di "store-operated calcium entry" [Putney et al. (1990) *Cell Calcium* 11(10): 611-624]. Secondo questo modello la liberazione di calcio dalle riserve intracellulari, mediata dall' $IP_3$ , scatena una rapida entrata dello stesso ione dallo spazio extracellulare attraverso canali SOC posti sulla membrana [Parekh et al. (1997) *Physiol Rev* 77: 901-930; Putney et al. (2001) *J Cell Sci* 114: 2223-2229]. Questi canali sarebbero attivati dallo ione calcio che si libera dalle riserve o da una qualche interazione tra questi canali e i recettori per l' $IP_3$ . I candidati migliori come SOC sono i "transient receptor potential channel (TRPC).

Mutazioni a livello dei geni che codificano per queste proteine sono state, infatti, associate a diverse malattie neurodegenerative come l'Alzheimer e la corea di Huntington [Montell et al. (2001) *Sci STKE* 90: 1-17; Minke, Cook (2002) *Physiol Rev* 82(2): 429-472. *Review*]. Questi canali partecipano nei processi di differenziazione che avvengono alla nascita nel sistema nervoso centrale ed è, inoltre, ritenuto coinvolto nei fenomeni di modulazione mediati dalla neurotrofina BDNF [Montell et al. (2001) *Sci STKE* 90: 1-17]. Studi recenti hanno dimostrato che l'attivazione dei canali TRPC è associata all'effetto neuroprotettivo svolto dal BDNF [Jia et al. (2007) *Nat Neurosci* 10(5): 559-567].

L'attivazione dei canali TRPC3 e TRPC6 porta ad un aumento dei livelli del calcio intracellulare con conseguente attivazione della trascrizione del BDNF mediata dalla CREB. È stato dimostrato che nella corea di Huntington la proteina huntingtina mutata (mhtt) porta ad una riduzione dell'espressione dei geni per il BDNF [Ferrer et al. (2000) *Brain Res* 866(1-2): 257-261; Zuccato et al. (2001) *Science* 293(5529): 493-498]. Studi recenti hanno anche evidenziato che l'htt mutata può legarsi in modo specifico alla porzione C-terminale del recettore per l' $IP_3$  e che questo legame porterebbe ad un aumento dell'atti-

vità di questo recettore in particolare modo nei neuroni spinosi dello striato, popolazione neuronale più vulnerabile alla corea di Huntington.

In studi precedenti abbiamo descritto la distribuzione dei canali TRPC in condizioni fisiologiche [Fusco et al. (2004) *Neurosci Lett* 365(2): 137-142; De March et al. (2006) *Neurosci Lett* 402(1-2): 35-39; Martorana et al. (2006) *Eur J Neurosci* 24(3): 732-738; Giampà et al. (2007) *Neurosci Lett* 424(3): 170-174]. Nel tentativo di capire una relazione tra l'aumento della tripletta CAG dell'huntingtina mutata (mhtt) e i livelli di espressione dei canali TRPC, l'obiettivo di questo studio è stato quello di determinare l'espressione genica di questi canali nei modelli murini per la corea di Huntington (topi transgenici R6/1 e R6/2). È stata valutata la quantità dell'RNA messaggero nelle fasi presintomatiche e sintomatiche della malattia mediante quantitative reverse-PCR.

**Materiali e metodi** – Per questo studio sono stati utilizzati topi transgenici R6/1 e R6/2. Gli animali sono stati sacrificati, previa anestesia con 3,3% di cloruro idrato, nelle fasi presintomatiche e sintomatiche della malattia. I cervelli sono stati rimossi e da questi isolati lo striato e la corteccia. L'RNA totale è stato estratto dalle aree di interesse, mediante il solvente organico TRIZOL. 1mg di mRNA totale è stato trascritto in una molecola di DNA (cDNA) mediante il kit “*Superscript III reverse transcriptase*” (Invitrogen). La quantificazione dell'mRNA maturo per i diversi TRPC ed isolato dallo striato o corteccia è stata effettuata mediante una PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR) utilizzando il software LightCycler thermal cycler system (Roche Applied Science).

**Risultati** – Da questo studio è emerso che i livelli di mRNA per i TRPC presi in esame (TRPC1-7) sono molto più alti nella corteccia che non nello striato, sia nei topi WT che nei modelli transgenici per corea di Huntington. È stato osservato anche un effetto del tempo sull'espressione genica di questi canali; i livelli di mRNA per i TRPC aumentavano con il progredire della patologia. Un effetto del genotipo invece è stato osservato solo per l'isoforma TRPC3. I livelli di mRNA per il TRPC3 diminuivano in maniera drastica nei topi transgenici R6/1 rispetto ai topi WT e al modello transgenico R6/2.

**Conclusioni** – I TRPC sono canali permeabili al calcio e permettono l'influsso di questo ione attraverso la membrana plasmatica mediante l'attivazione della PLC [Putney (2001) *J Cell Sci* 114: 2223-2229]. L'attivazione dei canali TRPC è coinvolta nell'espressione del fattore neurotrofico BDNF. In relazione al BDNF, l'huntingtina mutata porta ad una riduzione dell'espressione genica per il BDNF e la stessa proteina può influenzare l'attività dei recettori per la PLC. Questo studio mostra per la prima volta che l'espressione dell'mRNA per i TRPC3 è diminuita nel modello murino R6/1 e che questo potrebbe essere legato alla presenza della proteina mutata nel modello transgenico. L'mhtt potrebbe portare ad una disfunzione nell'omeostasi del calcio intracellulare influenzando l'espressione dei canali per il calcio TRPC3 e portare di conseguenza a morte cellulare.

Questo studio dimostra che questi canali potrebbero rappresentare una potenziale strategia terapeutica in molte patologie del sistema nervoso centrale.

## **RUOLO DELL'IMMAGINAZIONE MENTALE DEL MOVIMENTO**

**NELLA RIABILITAZIONE DOPO INFORTUNI SUL LAVORO** (*Silvio Gravano*)

**Introduzione** – L'immaginazione mentale del movimento, detta anche immaginazione motoria, ha trovato sempre più evidenze sperimentali di similitudini tra l'immaginazione di un compito motorio e l'esecuzione effettiva dello stesso compito [Kosslyn et al. (2001) *Nat Rev Neurosci* 2(9): 635-642; Thompson et al. (2009) *Psychol Sci* 20(10): 1245-1253]. Dunque non solo l'immaginazione motoria può essere definita come uno stato mentale dinamico durante il quale il soggetto simula mentalmente una azione motoria [Decety (1996) *J Behav Brain Res* 77: 45-52], ma è anche parte di un più vasto fenomeno (la rappresentazione motoria) relativo alla decisione ed alla preparazione dei movimenti [Jeannerod (1995) *Neuropsychologia* 33(11): 1419-1432].

Molti lavori in letteratura hanno sottolineato che esistono notevoli vantaggi nella riabilitazione motoria quando essa è associata ad esercizi di immaginazione [Daprati et al. (2009) *Cortex Aug 13 (Epub ahead of print)*; Feltz, Landers (1983) *J Sport Psychol* 5: 25-57; Herbert et al. (1998) *Acta Physiol Scand* 163: 361-368; Pascual-Leone et al. (1995) *J Neurophysiol* 74: 1034-1045; Yue, Cole (1992) *J Neurophysiol* 67: 1114-1123]. Tuttavia nei lavori presenti in letteratura sull'immaginazione motoria non è stato approfondito lo studio della simulazione mentale del moto di oggetti esterni o del movimento di terze persone.

**Materiali e metodi** – Al fine di studiare la capacità del Sistema Nervoso Centrale (CNS) di simulare il moto di un oggetto esterno, come per esempio una pallina da tennis, è stato sviluppato il protocollo sperimentale IMAGINE. A questi esperimenti hanno partecipato 8 soggetti (21±2 anni) senza esperienza di compiti di simulazione mentale o di meditazione e non esperti nelle leggi della Fisica. In questo protocollo i soggetti dovevano immaginare di avere nella mano una pallina da tennis, evocandone non solo l'immagine mentale, ma anche le sensazioni tattili e propriocettive. Quindi era loro chiesto di mimare il movimento di lancio della pallina fittizia verso il soffitto, seguire con l'immaginazione la traiettoria verticale della palla, immaginare l'urto con il soffitto e la traiettoria verticale di ritorno verso il basso ed infine mimare il movimento di presa della pallina immaginaria con la mano. La cinematica del braccio e la postura della mano sono state registrate con il sistema ottico di Motion Capture Optotrak (accuratezza <1mm, frequenza di acquisizione 100 Hz).

Il protocollo prevedeva di eseguire il compito di simulazione mentale in 48 prove alternando tre livelli di forza di lancio (minima, massima e media) ed immaginando di compiere il lancio in presenza della normale gravità terrestre ed in assenza di gravità, come avviene in orbita nella Stazione Spaziale. Ogni soggetto ha ripetuto l'intero protocollo tre volte, cambiando ogni volta l'altezza del soffitto che avevano al di sopra di loro (2, 3 e 5m). Inoltre sono stati sottoposti a 105 soggetti, studenti universitari non esperti di fisica, tests sulla conoscenza esplicita delle leggi della fisica riproducenti la situazione del compito richiesto per il protocollo IMAGINE.

**Risultati** – Sono stati studiati i dati dei lanci osservando il tempo di volo della palla immaginata (dal momento della mimica del lancio a quello della presa)

in funzione della velocità di lancio (misurata dalla cinematica del punto distale del braccio al momento del lancio). Questi dati sono stati quindi comparati con i risultati di sessioni sperimentali IMAGINE precedenti condotte con soggetti esperti nelle leggi della Fisica e con astronauti. Mentre i risultati dei tests sulla conoscenza esplicita delle leggi della fisica indicano una grande incertezza nella simulazione cognitiva del moto di una palla, i risultati delle prove sperimentali IMAGINE mostrano come gli 8 soggetti non esperti in Fisica hanno sorprendentemente riprodotto la non linearità del legame fisico tra velocità di lancio e tempo di volo di una palla lanciata contro un soffitto, sia per i lanci immaginati in presenza di gravità che per quelli simulati mentalmente in assenza di gravità.

I soggetti con una educazione scientifica maggiore hanno ottenuto risultati simili e con una accuratezza maggiore, in modo particolare i soggetti astronauti.

**Discussione** – I risultati ottenuti permettono di affermare che l'immaginazione sia in grado di simulare non solo i movimenti del proprio corpo, come già descritto in letteratura, ma anche condizioni più complicate come la simulazione mentale del moto di oggetti esterni. In particolare è interessante notare che l'esperienza e la comprensione delle leggi della fisica hanno un effetto positivo sulla accuratezza e qualità della simulazione mentale, ma non sono necessarie per ottenere un buon risultato durante l'immaginazione di un compito motorio e del moto di un oggetto. Questi risultati suggeriscono la grande utilità dell'impiego della immaginazione durante la riabilitazione, soprattutto nella prima fase post-traumatica quando non è ancora possibile effettuare la riabilitazione motoria standard.

I risultati descritti in questo lavoro indicano che la simulazione mentale potrebbe rivestire un ruolo importante nel momento in cui il soggetto comincia a riappropriarsi della relazione spaziale tra il proprio corpo ed il mondo esterno.

## **VALUTAZIONE STRUMENTATA E TRATTAMENTO ROBOTICO DEI DEFICIT MOTORI IN RIABILITAZIONE (Marco Iosa)**

**Introduzione** – In ambito clinico, la valutazione motoria spesso si effettua visivamente, guardando il paziente che esegue alcuni compiti motori richiestigli e, talvolta, assegnando un punteggio definito da delle specifiche e validate scale di valutazione. Tutto ciò ha però una componente soggettiva che rende tali valutazioni poco sensibili, poco ripetibili, insomma poco oggettive. Eppure la facilità con cui queste scale vengono somministrate ne fa lo strumento di valutazione ancora oggi più diffuso.

Al contrario l'analisi strumentata del movimento umano, ovvero la misurazione di alcuni parametri legati al movimento dei soggetti mediante opportuni strumenti e metodi, fornisce dati oggettivi (quindi sensibili e ripetibili), ma ha costi ben più elevati (in termini di strumentazione, impegno del paziente, risorse umane specializzate per l'analisi dati). Tuttavia la valutazione strumentata ha l'ulteriore vantaggio di fornire misure continue (e non ordinali come fanno le scale) permettendo così di utilizzare una statistica

parametrica (mentre è necessaria quella non parametrica per le scale di valutazione, a meno di andare su campioni molto elevati) che essendo più potente permette anche analisi su campioni ridotti.

Scopo di questo anno di studio è stato quello di introdurre la valutazione motoria strumentata come mezzo di indagine in ambito clinico, per diverse patologie.

*La valutazione strumentata nei pazienti con distrofia* – Un primo studio svolto dall'Unità F della Fondazione Santa Lucia in collaborazione con il Dipartimento di Scienze del Movimento Umano e dello Sport (DISMUS) dell'Università degli Studi di Roma "Foro Italico", con l'Università Cattolica e la Fondazione Don Gnocchi di Roma, è stato condotto su un gruppo di pazienti con distrofia facioscapolomerale (n=13) e un gruppo di controllo di soggetti sani di pari età (n=13).

Scopo dello studio era quello di comprendere i meccanismi relativi al controllo della stabilità del cammino compromessi in questi pazienti. A tal fine è stato utilizzato un sistema stereofotogrammetrico a 9 telecamere per seguire il movimento di tre punti del corpo (posti a livello di pelvi, tronco, testa) durante il cammino. Il range delle oscillazioni di tali punti e le attenuazioni delle accelerazioni tra pelvi e testa sono stati calcolati e si è visto che le oscillazioni erano più ampie nei pazienti a seguito di una ridotta capacità di ridurre le accelerazioni andando dalla pelvi alla testa. Ciò probabilmente era dovuto ad una debolezza dei muscoli del tronco per quel che riguardava i movimenti in direzione antero-posteriore, mentre era principalmente dovuto ad una debolezza degli ab-adduttori d'anca per i movimenti in direzione latero-laterale. Tutto questo ha mostrato l'importanza di un approccio strumentato al fine di quantificare la stabilità del cammino di questi pazienti, anche per valutare eventuali effetti di trattamenti riabilitativi.

*La valutazione strumentata per la valutazione degli effetti del bendaggio funzionale nei bambini con paralisi cerebrale* – Un secondo studio dall'Unità F della Fondazione Santa Lucia in collaborazione con il DISMUS dell'Università degli Studi di Roma "Foro Italico" è stato condotto su bambini (n=8) con emiplegia spastica dovuta ad esiti da paralisi cerebrale per valutare gli effetti del bendaggio funzionale all'arto inferiore. È stata misurata la cinematica degli arti inferiori durante il cammino di questi bambini mediante sistema stereofotogrammetrico (6 telecamere, 16 marcatori) prima del primo bendaggio, dopo sei mesi di trattamento, e dopo altri sei mesi di follow-up. Il bendaggio funzionale, una tecnica usata prevalentemente in medicina dello sport, veniva eseguito principalmente alla caviglia dei bambini (ma eventualmente poteva essere esteso al ginocchio e, in rari casi, all'anca) per supportare i muscoli deboli e limitare l'azione dei muscoli spastici. Il bendaggio veniva tenuto in sede per 6 giorni e poi rimosso dai genitori, i bambini stavano un giorno senza e poi veniva fatto un nuovo bendaggio, dopo un'attenta valutazione visiva del cammino dei bambini.

I risultati hanno mostrato, dopo sei mesi di trattamento, benefici in termini di funzioni grosso-motorie, incremento della velocità del cammino, riduzione della larghezza del passo, miglioramento della simmetria tra i due arti,

e miglioramenti a livello di caviglia per quanto riguardava ab-adduzione e rotazione interna-esterna, a livello di ginocchio e di anca. Tali risultati si sono mantenuti anche sei mesi dopo la fine del trattamento. Ciò che però non è migliorato è stata l'eccessiva pianta-flessione del piede (equinismo). Questi risultati hanno provato l'efficacia del bendaggio funzionale nei bambini con paralisi cerebrale nel far apprendere nuovi schemi locomotori più funzionali, sicuri e stabili.

*Un metodo per valutare le differenze tra curve di gait analysis* – Durante i due precedenti studi ci si è accorti della mancanza di un metodo semplice ed efficace per comparare curve di analisi del movimento tra pazienti e soggetti sani. A tale proposito si è sviluppato un metodo lineare per valutare la similarità di due curve in termini di forma, ampiezza e offset verticale.

*La valutazione strumentata e il trattamento robotico Gait Trainer nei pazienti post-ictus* – Un terzo studio ha riguardato la valutazione strumentata degli effetti del presidio robotico Gait Trainer per il recupero della deambulazione nei pazienti con emiplegia post-ictus. Il Gait Trainer è un dispositivo che consente di sostenere parte del peso del paziente mediante un'imbracatura e di muovere i suoi piedi, simulando un movimento prossimo al cammino naturale, mediante piattaforme motorizzate a cui i piedi del paziente vengono fissati per mezzo di cinghie.

Mediante diverse scale di valutazione si sono valutati tali effetti su un gruppo di pazienti (n=14) che hanno sostituito 20 sedute di terapia convenzionale con altrettante sedute riabilitative al Gait Trainer e su un gruppo di pazienti (n=14) che hanno fatto solo terapia convenzionale. Ogni gruppo è stato poi suddiviso in due sottogruppi (n=7) a seconda del livello di menomazione all'arto inferiore (motricity index minore o maggiore di 29).

I risultati hanno mostrato una maggiore efficacia del trattamento robotico rispetto al trattamento convenzionale solo per chi aveva un grado di menomazione elevato all'inizio della riabilitazione, mentre nessuna differenza si è registrata tra i due sottogruppi con ridotta menomazione iniziale.

Un'ulteriore indagine ha mostrato come variava lo scarico del peso corporeo durante la seduta rispetto a quello selezionato inizialmente, fornendo così utili informazioni sull'importanza di un corretto setting iniziale dei parametri della macchina e della necessità di un continuo feedback relativo al peso scaricato che il fisioterapista deve saper interpretare.

*La valutazione strumentata dell'arto superiore in soggetti sani mediante interfaccia virtuale* – Questo studio svolto dal Laboratorio di Fisiologia Neuro-motoria della Fondazione Santa Lucia ha investigato in che modo i soggetti sani riescano ad interagire con oggetti in movimento. La comprensione dei meccanismi alla base della capacità di intercettare un oggetto possono infatti facilitare la determinazione di percorsi riabilitativi più efficaci per l'arto superiore.

In questo studio i soggetti sani (n=42) erano chiamati ad intercettare un oggetto in movimento all'interno di un ambiente virtuale proiettato su un grande schermo (3m per 4m) posto davanti a loro mediante un comune mouse da computer che tenevano in mano.

I risultati hanno mostrato che tanto più l'informazione virtuale era difficile da interpretare tanto più i soggetti si rifacevano alle loro conoscenze pregresse (a priori). Al contrario, semplici task virtuali portavano ad un'elevata capacità di adattamento dei soggetti sani, cosa che non accadeva in precedenti studi in cui i soggetti interagivano con oggetti reali. Il comportamento diverso a seconda dell'interazione con oggetti virtuali o reali pone dei quesiti che necessitano di ulteriori indagini relative all'uso di riabilitazione in ambiente virtuale, che sta sempre più prendendo piede in ambito clinico.

*La valutazione strumentata dell'arto superiore pre e post intervento per il drenaggio di idrocefalo cerebellare* – Infine, un ultimo studio, ormai in fase conclusiva, è stato svolto dall'unità F della Fondazione Santa Lucia in collaborazione con il Policlinico Gemelli di Roma, al fine di valutare in modo quantitativo, mediante accelerometro triassiale, gli effetti di un intervento neurochirurgico di drenaggio di idrocefalo cerebellare in una paziente sui suoi deficit motori.

*Conclusioni* – I risultati ottenuti nei diversi studi hanno mostrato l'efficacia di una valutazione motoria strumentata non solo a fini di ricerca, ma anche in ambito clinico. Infine, tale evidenza ha portato alla fondazione di un nuovo laboratorio interno all'Unità F, il Movement and Brain Laboratory, che ha coordinato un Progetto Formativo Aziendale interno alla Fondazione Santa Lucia dal titolo "Misurare il Movimento in Clinica: la Valutazione Motoria Strumentata".

## **DANNO CELLULARE A DISTANZA NELLE LESIONI FOCALI DEL SNC.**

### **MODULAZIONE FARMACOLOGICA E RECUPERO FUNZIONALE (Laura Latini)**

**Introduzione** – Il danno neuronale a distanza rappresenta un evento peculiare nella determinazione dello status funzionale e, in particolare, del recupero funzionale in seguito a danno focale del SNC. Per "morte cellulare a distanza" si intende quell'insieme di fenomeni degenerativi che avvengono in regioni distanti, ma funzionalmente collegate, al sito di lesione primaria. Questi eventi sono stati associati a fenomeni di degenerazione sia anterograda che retrograda. Sebbene i meccanismi coinvolti rimangano ancora oscuri, è certo come essi siano legati ad una serie di cambiamenti cellulari, funzionali e molecolari, correlati tra loro sia temporalmente che spazialmente. Poiché i fenomeni di degenerazione remota avvengono in tempi successivi rispetto all'insorgenza della lesione, l'utilizzo e lo studio di terapie neuroprotettive mirate ad una specifica finestra temporale potrebbero risultare interessanti dal punto di vista di un possibile recupero funzionale. Sebbene gli effetti neuroprotettivi svolti dagli endocannabinoidi siano stati studiati in varie patologie del SNC, il loro ruolo nel controllo della morte cellulare a distanza è un campo di indagine ancora poco esplorato.

Nei processi di neuroinfiammazione e neurodegenerazione, è ormai noto, infatti, il ruolo dei recettori per gli endocannabinoidi nella regolazione del pathway di morte cellulare per apoptosi. Gli endocannabinoidi sono molecole di origine lipidica che, mediante l'attivazione di recettori accoppiati a proteine G regolatorie (CBR, recettori di tipo 1 (CB1) e recettori di tipo 2 (CB2)) agi-

scono sul processo di morte cellulare programmata. Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che le vie di trasduzione del segnale mediate dagli endocannabinoidi svolgono un ruolo protettivo sui neuroni in una serie di eventi cellulari dannosi quali l'eccitotossicità, l'ischemia, lo stress ossidativo e la neuroinfiammazione. Molti degli effetti protettivi sembrano essere mediati dall'attivazione del recettore CB1, sebbene studi recenti vedano coinvolto anche il recettore CB2. Poiché molti sono i dati riguardanti il ruolo dei recettori per gli endocannabinoidi e delle cellule gliali dopo danno del SNC e, al contrario, pochi quelli riguardanti la loro implicazione nei processi di morte cellulare, lo scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare l'espressione dei recettori CB1-CB2 e l'attivazione della glia (microglia e astrociti) nei fenomeni di neuroprotezione/neurodegenerazione dopo danno focale del sistema nervoso centrale (emicerebellectomia).

**Materiali e metodi** – È stato utilizzato come paradigma sperimentale l'emicerebellectomia chirurgica [Florenzano et al. (2002) *Neuroscience* 115(2): 425-434; Viscomi et al. (2004) *Neuroscience* 123: 393-404] per indagare l'espressione dei recettori CB1 e CB2 e gli effetti relativi alla loro modulazione nella cascata di eventi che conduce alla degenerazione neuronale dei nuclei precerebellari controlaterali all'area lesionata. A tale scopo, sono state utilizzate delle sostanze farmacologiche note per essere, selettivamente, agoniste ed antagoniste dell'attività dei recettori CB1 e CB2. Tali farmaci sono rispettivamente: *a*) ACEA (agonista) e SR1 (antagonista), per CB1; *b*) JWH-015 (agonista) e SR2 (antagonista), per CB2.

Dopo aver effettuato sugli animali un'emicerebellectomia chirurgica, gli stessi sono stati suddivisi in 5 gruppi sperimentali secondo il trattamento cronico effettuato: il primo gruppo è stato trattato con una soluzione salina (Hcb-Sal); il secondo gruppo con l'agonista del recettore CB1, ACEA (Hcb-ACEA); il terzo gruppo con l'antagonista del recettore CB1, SR1 (Hcb-SR1); il quarto gruppo con l'agonista del recettore CB2, JWH-015 (Hcb-JWH); il quinto gruppo con l'antagonista del recettore CB2, SR2 (Hcb-SR2). A 1, 3, 5 e 7 giorni dalla lesione, gli animali dei vari gruppi sono stati sottoposti a test neurologico (NSS) per verificarne il recupero funzionale. Ad una settimana di trattamento cronico con i farmaci, gli animali sono stati sacrificati e, mediante le tecniche di immunoistochimica, Western blotting e PCR quantitativa, sono stati analizzati i nuclei precerebellari dell'oliva inferiore e dei nuclei pontini controlaterali alla lesione.

**Risultati** – I risultati ottenuti hanno evidenziato, innanzitutto, che nel sistema di neurodegenerazione utilizzato, l'espressione del recettore CB1, localizzata nelle cellule neuronali in condizioni di controllo, rimaneva invariata anche dopo la lesione. Al contrario, l'espressione del recettore CB2, completamente assente in condizioni fisiologiche, veniva indotta dopo il danno assonale senza trattamento farmacologico (Hcb-Sal), aumentava trattando gli animali lesionati con l'agonista del recettore, JWH-015 (Hcb-JWH), e diminuiva, al contrario, dopo trattamento con l'antagonista selettivo SR2 (Hcb-SR2). La maggiore espressione del recettore CB2 nei neuroni precerebellari, inoltre, si associava non solo con una maggiore sopravvivenza delle cellule neuronali al

danno stesso, ma anche con un minor rilascio del citocromo C (marcatore apoptotico per eccellenza) ed un maggior recupero funzionale dell'animale sottoposto al test (come indicato dall'indice di NSS). Inoltre, abbiamo indagato il signaling intracellulare responsabile della neuroprotezione CB2-mediata e abbiamo dimostrato il ruolo chiave della via di trasduzione del segnale di PI3K/Akt, che attivata dall'agonista del recettore CB2 blocca il rilascio di citocromo-c e quindi i fenomeni di morte cellulare.

**Discussione** – Questo studio, dunque, ha dimostrato per la prima volta come l'induzione del sistema degli endocannabinoidi (in particolare attraverso il recettore CB2) in neuroni centrali assotomizzati possa avere effetti protettivi sia a livello della sopravvivenza cellulare, che a livello del recupero funzionale, e come tali effetti possano essere potenziati selettivamente dall'azione di sostanze agoniste, nel caso specifico JWH-015. Inoltre, questo studio documenta per la prima volta un coinvolgimento del sistema cannabinoide, indipendente dal sistema gliale, che abbia un ruolo anti-apoptotico anche in un modello sperimentale *in vivo*.

### **EFFETTI DELL'INIBIZIONE DELLA FOSFODIESTERASI 10 (PDE10) NEL MODELLO MURINO DI COREA DI HUNTINGTON (Daunia Laurenti)**

**Introduzione** – Nella Corea di Huntington si riscontra una diminuzione dei livelli sia della CREB (cAMP responsive element binding protein) che della CBP (la CREB-binding protein) [Steffan et al. (2000) *PNAS USA* 97: 6763-6768; Gines et al. (2003) *Hum Mol Genet* 12: 497-508; Sugars et al. (2004) *J Biol Chem* 279: 4988-4999; Rouaux et al. (2004) *Biochem Pharmacol* 68(6): 1157-1164]. Questi valori diminuiti sembrerebbero essere il risultato di un dismetabolismo energetico che è stato riscontrato e documentato nel modello murino della Corea di Huntington, in cui si è osservato un abbassamento dei livelli di cAMP all'interno dello striato [Gines et al. (2003) *Hum Mol Genet* 12: 497-508]. CREB è stato dimostrato svolgere un effetto neuroprotettivo [Lonze, Ginty (2002) *Neuron* 35: 605-623]. Di conseguenza, l'utilizzo di farmaci che agiscano sulla CBP causando una perdita di funzione di tale proteina possono rappresentare una strategia terapeutica valida contro i disordini neurodegenerativi quali la Corea di Huntington.

Le fosfodiesterasi (PDE) sono una famiglia di enzimi capaci di degradare il cAMP. Un'inibizione selettiva di tali enzimi potrebbe risultare rilevante come strategia terapeutica nei disordini del sistema nervoso centrale, vista la distribuzione ubiquitaria delle PDE nel cervello [Menniti et al. (2007) *Curr Opin Investig Drugs* 8: 54-59]. A questo proposito è già stato dimostrato l'effetto positivo del Rolipram, un inibitore della PDE di tipo IV (PDE4) [Lee et al. (2004) *Ann Neurol* 56: 611-623]. Tale effetto è verosimilmente mediato da un aumento dei livelli di CREB fosforilato [DeMarch et al. (2007) *Neurobiol Dis* 25: 266-273]. Inoltre il Rolipram svolge un effetto protettivo anche sul modello murino della Corea di Huntington, il topo R6/2, prolungando la sopravvivenza e ritardando il manifestarsi dei sintomi. La fosfodiesterasi 10A (PDE10A) svolge due funzioni, idrolizza cAMP e cGMP. Tale enzima è altamente espresso nello striato, principale bersaglio della Corea di Huntington.

**Materiali e metodi** – Per lo studio sono stati usati ratti wistar maschi (Harlan, Italia) di 200-220 gr. Gli animali sono stati iniettati con acido quinolinico come descritto in Fusco et al. [(2003b) *Eur J Neurosci* 18: 1093-1102]. Gli animali sono stati trattati con iniezioni quotidiane intraperitoneali di Rolipram o veicolo ed in seguito sacrificati mediante perfusione transcardiaca a due e a 8 settimane. I cervelli sono stati rimossi, postfissati overnight, e dopo un opportuno trattamento di crioprotezione sono stati congelati e sezionati al microtomo. Sono stati valutati 2 parametri: la grandezza delle lesioni striatali con la sopravvivenza cellulare e il livello di CREB fosforilata.

Le lesioni sono state evidenziate utilizzando un anti-NeuN (1:200) per marcare i neuroni nello striato tramite colorazione DAB come già precedentemente descritto [Fusco et al. [(2003b) *Eur J Neurosci* 18: 1093-1102], quindi le sezioni sono state esaminate al microscopio. La grandezza delle lesioni è stata analizzata con software Zeiss LSM™. Per la sopravvivenza cellulare è stata calcolata la densità apparente dei neuroni immunoreattivi su 1mm<sup>2</sup> [Fusco et al. (2003b) *Eur J Neurosci* 18: 1093-1102], a questo scopo l'area intorno alle lesioni è stata divisa in dorsale, laterale e mediale [DeMarch et al. (2007) *Neurobiol Dis* 25: 266-273] e il centro della lesione calcolato a parte. Per calcolare i livelli di CREB attivata e del BDNF nei neuroni sopravvissuti è stato utilizzato un metodo di doppia immunofluorescenza utilizzando anticorpi specifici per le proteine di interesse (anti-Phospho-CREB Rabbit e anti-BDNF mouse) entrambi diluiti 1:200, incubati per 72 ore a -4°C. Le sezioni sono state poi incubate con anticorpi secondari (Goat anti-rabbit Cy3 coniugato e Donkey anti-mouse Cy2 coniugato). I dati ottenuti sono stati poi analizzati per rilevare gli effetti del farmaco sulla sopravvivenza cellulare e l'inattivazione di CREB nello striato nei diversi gruppi di animali. L'analisi statistica è stata effettuata tramite ANOVA seguita dal test HDS Tukey.

**Risultati** – Negli animali trattati con TP10 l'estensione delle lesioni risulta essere diminuita in maniera statisticamente significativa rispetto agli animali non trattati. Sia nella parte centrale della lesione che nelle aree circostanti è stata riscontrata una maggior sopravvivenza cellulare negli animali trattati con TP10 rispetto ai trattati con veicolo ad entrambi i time points considerati. La perdita di neuroni corticali è ridotta del 27% nei gruppi trattati con TP10. Negli animali trattati con TP10 l'intensità di CREB attivata aumentava rispetto a quelli lesionati e trattati con il veicolo. Il trattamento era in grado di riportare i livelli di CREB fosforilata a livelli molto simili a quelli degli animali non lesionati. L'analisi della fluorescenza del BDNF ha dimostrato invece un aumento del 10% di questa proteina negli animali trattati con TP10 rispetto agli animali veicolo. Nella corteccia è stato trovato un aumento del 2,5% (a 2 settimane dopo la lesione) e del 12% (8 settimane dopo la lesione) di CREB fosforilata negli animali trattati con TP10 rispetto al veicolo. In relazione al BDNF espresso in corteccia è stato mostrato un incremento del 16% negli animali trattati e sacrificati dopo due settimane, mentre non è stata rilevata una differenza significativa negli animali sacrificati a 8 settimane dalla lesione.

**Discussione** – Il TP10 ha effetto sulla neuroprotezione, come mostrato nella conta cellulare. È possibile che l'efficacia del TP10 possa essere un risultato dovuto, in parte, dall'incremento del segnale cAMP e dall'upregolazione della fosforilazione di CREB. Il TP10 aumenta l'attivazione di CREB nei ratti lesionati con conseguente aumento della sopravvivenza dei neuroni striatali. Inoltre è stato mostrato che il TP10 è efficace nell'incremento dell'immunoreattività del BDNF nei neuroni striatali di ratti lesionati, e ha avuto anche effetti benefici sui neuroni corticali, è stato infatti osservato un effetto retrogrado nella perdita di neuroni corticali, accompagnata da un aumento dei livelli di CREB fosforilata (in entrambi i time point) e di BDNF (limitato al primo time point). Il risparmio dei neuroni striatali dato dal TP10 può essere ricondotto all'aumentato livello di attività da parte dei neuroni corticali che di rimando potrebbero essere dovuti all'incremento dei livelli di CREB fosforilata e di BDNF. Infine i risultati indicano che l'inibizione della PDE10A può essere di beneficio nel prevenire la morte cellulare e le disfunzioni demielinizzanti nel modello eccitotossico di neurodegenerazione. Questo risultato conferma ed estende l'importanza dell'inibizione delle fosfodiesterasi come nuovo approccio al trattamento dei disordini neurodegenerativi.

## **INVESTIGAZIONI DI PROTEOMICA IN MALATTIE EREDITARIE (Valeria Marzano)**

**Introduzione e obiettivo** – I termini “proteoma” e “proteomica” furono introdotti nel 1995 da un gruppo australiano [Wasinger VC (1995) *Electrophoresis* 16: 1090-1094] e derivano dalle parole “PROTein” e “genOME”; come l'insieme dei geni di un organismo è definito dal suo genoma, così l'insieme delle proteine espresse da quel genoma è il suo proteoma. La proteomica è, quindi, una disciplina basata sullo studio delle variazioni qualitative e quantitative delle proteine presenti in un particolare tessuto/tipo cellulare/distretto dell'organismo, con il fine di comprendere i processi biologici e funzionali nel loro insieme a partire da modelli proteici complessi. Le ricerche di proteomica si rivelano, quindi, di particolare interesse nello studio di malattie genetiche, permettendo di studiare gli effetti dei difetti genetici sulla conseguente alterata espressione proteica [Gloerich J (2007) *J Proteome Res* 6: 506-512].

L'ataxia telangiectasia (AT) è una patologia genetica (autosomale recessiva) rara causata da mutazioni a carico del gene che codifica per la chinasi ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), proteina che gioca un ruolo centrale nelle risposte cellulari da stress indotte dal danno al DNA. Tali mutazioni impediscono l'espressione della proteina funzionale in cellule di pazienti affetti da AT. La conseguente progressiva deficienza neurologica, dovuta a degenerazione progressiva di particolari neuroni del cervelletto, si manifesta normalmente verso i due anni di età con una ridotta mobilità (movimenti scoordinati o atassici) associati con telangiectasia oculare (vasi sanguigni dilatati nella congiuntiva bulbare) [Shiloh Y. (2003) *Nat Rev Cancer* 3: 155-168].

Evidenze sperimentali portano ad attribuire alla proteina ATM un ruolo fondamentale nel condizionare la composizione proteica cellulare; i processi molecolari difettivi risultanti da sua non corretta funzionalità e le evidenze

che descrivono la capacità di ATM di fosforilare almeno tre E3 ubiquitin-ligasi, MDM2, COP1, Siah-1 [Maya R (2001) *Genes Dev* 15: 1067-1077; Dornan D (2006) *Science* 313: 1122-1126; Winter M (2008) *Nat Cell Biol* 10: 812-824] ed una deubiquitinasi, USP10 [Yuan J (2010) *Cell* 140: 384-396], mettono in luce un ipotetico ruolo di ATM nel modulare la via di segnalazione e degradazione cellulare che si basa sul sistema ubiquitina-proteasoma (Ub-P). A sostegno di questa ipotesi vi è una ricerca del 2002 [Taylor A (2002) *Oncogene* 21: 4363-4373] che riporta l'aumento dei coniugati di ubiquitina in risposta al danno al DNA dovuto a rotture nella doppia elica, processo che induce appunto l'attivazione di ATM.

È proprio studiare il possibile ruolo di ATM nel processo di degradazione delle proteine Ub-P dipendente l'obiettivo di questo progetto di ricerca.

**Materiali e metodi** – I modelli cellulari sperimentali selezionati per l'indagine di proteomica sono stati la linea linfoblastoide L6, derivata da un paziente con AT, e la corrispondente linea stabilmente trasfettata con il costrutto ATM-wt (chinasi funzionale, L6ATM). Entrambe le linee cellulari sono state incubate o meno con 10 $\mu$ M MG132 (inibitore del proteosoma) per 2 ore e le proteine sono state estratte lisando in 6M Urea, 100mM Tris, 0.5% CHAPS. È stato effettuato un western blot con l'anticorpo anti-ubiquitina (Santa Cruz, P4D1) per valutare l'accumulo delle proteine poli-ubiquitinate nelle cellule trattate. La stessa quantità proteica, per ogni condizione, è stata digerita con l'enzima tripsina ed i peptidi risultanti son stati identificati e quantificati grazie alla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa di tipo tandem (LC-MS/MS); 1.7 $\mu$ g di digesto proteico son stati iniettati in un sistema cromatografico UPLC nanoAcquity accoppiato a spettrometro di massa nanoESI-Q-TOF (Q-Tof Premiere, Waters Corp.) con acquisizione in MS<sup>E</sup>. Nella particolare configurazione strumentale adottata (cromatografia liquida a fase inversa), la separazione dei peptidi avviene utilizzando una miscela di acqua e acetonitrile come fase mobile (gradiente da 3 a 40% di ACN in 120 minuti) e una colonna C18 come fase stazionaria. La successiva acquisizione dei dati di spettrometria di massa in modalità MS<sup>E</sup> [Vissers JP (2007) *Mol Cell Proteomics* 6: 755-766] consiste in un protocollo di frammentazione peptidica in parallelo: lo spettrometro di massa fornisce l'energia di collisione alternando due tipologie di MS ad elevata (15-40 eV) e bassa (4 eV) energia di collisione.

L'insieme dei dati risultante dagli spettri di massa, contenenti informazioni sui precursori peptidici e sui relativi ioni figli prodotti, associati con i corrispondenti tempi di ritenzione, sono stati elaborati con il programma ProteinLynx Global Server (Waters) che ha permesso sia l'identificazione delle proteine interrogando la banca dati di UniProtKB/SwissProt (versione 54.0) sia la quantificazione relativa, tra i diversi campioni, delle proteine identificate (grazie all'utilizzo di uno standard interno, 200fmoli del digesto di Enolase di *Saccharomyces cerevisiae*) con validazione statistica dei risultati. L'elevata sensibilità e riproducibilità del sistema nano-cromatografico e l'elevata efficienza di rivelazione dell'acquisizione MS<sup>E</sup> rendono questo approccio "label free" il metodo ideale per l'identificazione di proteine in campioni

molto complessi. L'insieme dell'elenco di proteine differenzialmente espresse nei diversi campioni in esame sono poi state valutate con il programma bioinformatico Ingenuity Pathway Analysis (IPA 8.0; Ingenuity® Systems) per poter associare ai risultati sperimentali le molteplici e complesse funzioni biologiche e trovare relazioni dirette ed indirette tra le proteine identificate.

**Risultati** – Sono state identificate 53 proteine differenzialmente espresse tra la linea cellulare L6 e L6ATM dopo trattamento con MG132 e 63 proteine tra le due linee non trattate; nei due insiemi è stato interessante notare la differente espressione delle proteine SUB1, STAT1, GSTP1, AK2, EIF5A, PPIA nelle cellule L6ATM rispetto alla loro controparte L6, proteine note dalla letteratura per essere bersagli dell'azione di MG132. Nel confronto tra le due linee cellulari entrambe trattate con MG132, è stata evidenziata una differente espressione sia della proteina Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 (UBA1) che della  $\beta$ -2-microglobulin ( $\beta$ 2M), entrambe macromolecole fondamentali del sistema Ub-P. Inoltre anche la 14-3-3 zeta/ $\delta$  (YWHAZ), proteina che regola il ciclo di divisione cellulare dopo l'attivazione della replicazione del DNA e in risposta ad un danno del DNA, risulta sottoregolata nel nostro studio ed in un lavoro precedente è già stato descritto un legame diretto tra essa e la UBA1 [Meek SE (2004) *J Biol Chem* 279: 32046-32054].

I due insiemi di proteine differenziali sono direttamente collegati al metabolismo di carboidrati, in particolare alla glicolisi e gluconeogenesi, con una probabilità calcolata con un p-value di  $5.8e^{-07}$  e  $4.9e^{-09}$  rispettivamente, evidenza bioinformatica che viene confermata dai dati in letteratura che descrivono un legame tra l'AT e patologie di tipo metabolico (aterosclerosi, resistenza all'insulina) e cardiovascolari [Bar RS (1978) *N Engl J Med* 298: 1164-1171; Schneider JG (2006) *Cell Metab* 4: 377-389].

## **CORRELATI NEURALI DELL'OSSERVAZIONE DI ERRORI IN SISTEMI MOTORI ESPERTI** (Mariella Pazzaglia)

**Introduzione e obiettivi** – La scoperta dei “neuroni specchio” nella corteccia F5 della scimmia e recenti dati neurofisiologici nell'uomo mostrano come l'osservare un'azione generi una rappresentazione interna che coinvolge anche strutture neurali attive durante l'esecuzione della stessa azione [Rizzolatti, Craighero (2004) *Annu Rev Neurosci* 27: 169-192].

Questi dati supportano l'idea di una comunanza di rappresentazioni percettive e motorie e avvalorano l'ipotesi “simulativa”, secondo la quale osservare implica anche una rappresentazione interna dell'azione [Jordan (1996) *Computational aspects of motor control and motor learning* In: Heuer, Keele (Eds.) *Handbook of Perception and Action Motor Skills*, New York, NY, Academic Press; Carruthers, Smith (1996) *Theories of Theories of Mind*, Cambridge University Press; Gallese, Goldman (1998) *Trends Cogn Sci* 12: 493-501; Blakemore, Decety (2001) *Nat Rev Neurosci* 2: 561-567; Gallese (2003) *Networks* 1: 24-47], in sostanziale antitesi con l'ipotesi classica secondo la quale l'analisi dello stimolo ha luogo attraverso meccanismi esclusivamente percettivi.

L'idea di fondo è che in sistemi motori esperti, nei quali il piano motorio è ampiamente consolidato, l'osservazione di un'azione appartenente al proprio

repertorio comportamentale possa innescare una rappresentazione simulativa, e che questo tipo di rappresentazione visuo-motoria influisca nella detezione di caratteristiche dell'azione stessa, come per esempio il rilevamento di errori di esecuzione, coinvolgendo alcuni substrati neurali in maniera differente rispetto a soggetti non esperti.

In questo caso sono stati coinvolti in uno studio di fMRI dei pianisti esperti con un elevato grado di stabilità e fluenza nei movimenti fini delle dita ed un gruppo di controllo costituito da soggetti senza nessuna abilità motoria specifica. Nella prima sessione (compito di discriminazione percettiva) ai soggetti è stato chiesto di indicare attraverso la pressione di un tasto il numero dei tasti neri premuti dalla mano che esegue l'azione musicale, in modo da misurare l'attivazione funzionale durante il rilevamento di una caratteristica dello stimolo che non richiede nessun tipo di conoscenza sulla modalità di esecuzione dell'azione. Nella seconda sessione (compito di discriminazione dell'errore motorio), ai soggetti è stato chiesto di discriminare la correttezza dell'azione osservata, in modo da ottenere una mappa di attivazione collegata alla discriminazione attiva durante l'osservazione di un errore motorio. Per entrambi i compiti sono state registrate l'accuratezza di risposta ed i tempi di reazione. Un confronto fra le mappe statistiche di attivazione cerebrale fra i due diversi compiti cognitivi e fra i due gruppi di soggetti ci ha altresì permesso di identificare i substrati neurali coinvolti nell'osservazione di azioni e quali aree cerebrali siano modulate in maniera specifica nella detezione dell'errore osservato.

**Paradigma sperimentale** – 2 gruppi sperimentali differenti per abilità motorie (pianisti esperti (M) e musicisti non pianisti (NM) x 2 compiti sperimentali (compito di discriminazione percettiva (kd) e compito di detezione dell'errore osservato (ed)), ognuno con 2 livelli indipendenti di risposta. Per ogni run è prevista una baseline sotto forma di immagini statiche cui il soggetto non deve rispondere.

**Discussione e risultati** – L'osservazione di azioni sembra attivare specifici meccanismi di risonanza visuomotoria. Nei sistemi motori esperti, nei quali il piano motorio è ampiamente consolidato, la lettura della cinematica del corpo comporta che il sistema motorio compia operazioni discriminative molto fini. Il trasferimento al sistema motorio di codici percettivi sembra giocare un ruolo fondamentale nella detezione di caratteristiche dell'azione stessa, come per esempio il rilevamento di errori di esecuzione nell'eseguire una scala al pianoforte.

Lo studio dimostra l'esistenza di substrati neurali distinti per i pianisti esperti rispetto ai novices indicando una relazione tra l'osservazione dominio specifica e la capacità di raggiungere degli elevati standard esecutivi e strategici nel dominio osservato.

In particolare, le aree prefrontali, premotorie e del cingolo risultano maggiormente attive nella detezione dell'errore nei sistemi motori esperti. Al contrario, per i soggetti con nessuna esperienza visiva del gesto motorio sono risultati maggiormente attivi i circuiti corticali dell'azione, comprendendo il parietale inferiore e le aree premotorie.

**PROFUNDISTANCE: UNA BANCA DATI DI INTERAZIONI PROTEICHE UMANE RELAZIONATE ED INTEGRATE CON DATI DI COLOCALIZZAZIONE ED ASSOCIATE A PATOLOGIE MENDELIANE (Daniele Peluso)**

**Introduzione** – L'applicazione, su scala genomica, di nuovi potenti strumenti della proteomica ha permesso di ottenere, in breve tempo, una quantità d'informazioni senza precedenti riguardanti il numero e la distribuzione di molecole biologiche cellulari e le loro interazioni. Per citare i database più importanti: HPRD, Intact, DIP, MPact, BioGRID, MPIDB, MatrixDB e tra queste le banche dati del nostro gruppo: MINT, VirusMINT e HomoMINT.

MINT (<http://mint.bio.uniroma2.it/mint/>), basata su standard specifici, riconosciuti dalla comunità internazionale, è stata sviluppata con l'ambizione di raccogliere tutte le informazioni pubblicate riguardanti l'interazione tra proteine, attraverso la condivisione di dati curati con le altre grandi banche informatiche biologiche, rappresentandoli attraverso una forma binaria o di rete complessa. La crescita di MINT è stata costante a partire dal 2002, anno in cui MINT è stata per la prima volta descritta in una pubblicazione scientifica, ora contiene più di 111.000 interazioni fisiche di cui oltre 23.000 riguardanti proteine umane.

Partendo proprio dalla mole di dati a nostra disposizione si è pensato di sfruttare l'interattoma umano associandolo ad informazioni relative alla colocalizzazione e alle patologie relazionate alle proteine coinvolte nelle interazioni, sviluppando una banca dati, con interfaccia web dedicata, in modo da offrire uno strumento che permetta di avere un visione di insieme riguardo alle interazioni proteiche attualmente conosciute permettendo esperimenti mirati in modo da ridurre di molto le risorse sperimentali.

**Metodi** – Il progetto è stato sviluppato in 4 fasi: 1) Integrazione: a) dati di interazione tra proteine umane; b) associazione gene/malattia; c) localizzazione proteica; 2) Creazione Banca Dati; 3) Inserimento dati; 4) Progettazione e sviluppo di un'interfaccia WEB.

Nella prima fase l'obiettivo è stato integrare i dati provenienti dall'interattoma umano, che rappresenta una rete di interazioni tra proteine umane con informazioni su gene/malattia ed una classificazione delle localizzazioni proteiche. L'informazione sul proteoma è immagazzinata nella banca dati MINT e nella banca dati HomoMINT che invece contiene interazioni inferite da esperimenti su organismi modello. La raccolta dei dati concernenti patologie umane/geni, è avvenuta attraverso la banca dati OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) che conserva tutte le informazioni su malattie umane mendeliane ricavate dalla letteratura e con informazioni provenienti da collaborazioni con gruppi sperimentali. Per finire, la localizzazione proteica è stata caricata a partire dalla banca dati cellMINT (<http://mint.bio.uniroma2.it/CellMINT/>).

Una volta raccolti i dati e comprese le caratteristiche di ogni informazione abbiamo progettato la Banca Dati relazionale vera e propria, sviluppata con il DBMS ad oggetti PostgreSQL (<http://www.postgresql.org/>), a licenza

libera. Per l'inserimento, è stato fondamentale creare dei filtri che permettesero di descrivere una relazione coerente fra i dati, con confronti che validino le relazioni stesse.

Terminata la Banca Dati ProFunDistance è stata sviluppata un'interfaccia web facilmente accessibile e navigabile dove l'utente può compilare dei campi chiave, lanciando query ed avendo come risposta tutta l'informazione possibile, chiara e scaricabile in locale. L'interfaccia è stata sviluppata con JAVA per la parte server, HTML e javascript per la visualizzazione lato client ed oltre una home page, ad una pagina per effettuare le query di ricerca con le relative pagine di visualizzazione dei dati risultanti, anche una pagina che mostra delle statistiche operate sulla Banca Dati.

**Conclusioni** – Una volta terminata la fase di test del sistema informatico, sarà fondamentale valutare l'applicazione che gruppi sperimentali ne faranno ed eventualmente avere una rete di feedback per una ulteriore validazione delle interazioni a seguito degli esperimenti.

A questo scopo diverrà molto utile avere una misura di tipo probabilistico della precisione dell'informazione per ogni singola interazione, quindi generare una punteggio vero e proprio per dare all'utente la possibilità di capire quanto affidarsi a quel dato e quanto invece prenderlo con cautela. Questo tipo di score verrà costruito proprio sulla base di tutti i dati raccolti.

Potrebbe essere interessante sviluppare un predittore che dia una stima della probabilità per cui una determinata proteina possa interagire con altre proteine sulla base delle sue interazioni, della sua localizzazione e delle patologie ad essa associate. Per questo diviene fondamentale aggiungere ulteriori annotazioni alle proteine implicate nelle interazioni, come per esempio dei dati riguardanti la coespressione, aumentando la precisione predittiva del sistema.

## **RUOLO DELLA CHINASI ATM (ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED) NEL CONTROLLO DELL'UBIQUITINAZIONE PROTEASOMA-UBIQUITINA DIPENDENTE (Simonetta Santini)**

**Introduzione** – L'Atassia-Telangiectasia è una malattia genetica autosomica recessiva caratterizzata da neurodegenerazione cerebellare progressiva che determina atassia, telangiectasia, sensibilità alle radiazioni ionizzanti, ed alta incidenza nello sviluppo di tumori soprattutto a carico dell'apparato immunitario. A livello molecolare tale patologia è caratterizzata dall'assenza funzionale di una proteina chiamata ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). ATM è una serina/treonina chinasi ed è il principale trasduttore cellulare del danno al DNA a doppia elica (DSB). In risposta al danno al DNA, ATM fosforila in serina e treonina diversi substrati attivando quindi una cascata di trasduzione del segnale che indirizza la cellula verso l'arresto del ciclo o la morte programmata (apoptosi). È stato recentemente identificato nel nostro laboratorio un nuovo ruolo di ATM come modulatore dell'apoptosi indotta dal recettore Fas. Si è riscontrato che cellule linfoblastoidi prive di una proteina ATM funzionale sono sensibilmente resistenti alla morte indotta dal recettore Fas; tale

resistenza all'apoptosi correla con alti livelli di espressione della proteina anti-apoptotica FLIP.

Basandosi sulla recente osservazione che trattando linee cellulari esprimenti una forma attiva della chinasi con inibitori del proteosoma si determina un aumento dei livelli di FLIP (aumento che di contro non si osserva in linee cellulari non esprimenti una forma attiva della chinasi), si è ipotizzato che l'attività chinasi di ATM moduli la stabilità di FLIP tramite una via proteosoma dipendente. In un recente lavoro è stata individuata l'E3 ubiquitina ligasi ITCH come l'enzima responsabile della degradazione specifica della proteina FLIP. Si è quindi ipotizzato che ATM possa regolare i livelli di FLIP modulando l'attività della sua E3 ubiquitina ligasi specifica: ITCH.

**Risultati** – *ITCH svolge un ruolo nella degradazione ATM dipendente di FLIP* – Inibendo l'attività di ITCH mediante specifico siRNA si è verificato che l'attenuazione dei livelli della E3 ubiquitina ligasi è in grado di abrogare la degradazione ATM-dipendente di FLIP indotta da trattamento con Neocarzinostatina (radiomimetico in grado di indurre lesioni di tipo "rottura su doppio filamento" che inducono attivazione della chinasi ATM).

*ATM modula l'attività della ubiquitina ligasi ITCH* – Allestendo un primo saggio di ubiquitinazione in cellule 293T in cui si sovra-esprime ITCH-Myc, Ubiquitina-HA in presenza o meno della chinasi ATM (od in alternativa attivando o meno la chinasi endogena previo trattamento con Neocarzinostatina), si è rilevato tramite immunoblotting anti-HA su Immunoprecipitato (IP) di ITCH un incremento nell'attivazione della ubiquitina ligasi nei soli campioni in cui la chinasi è attiva.

*ATM svolge un ruolo nella modulazione dell'ubiquitinazione di FLIP* – Si è allestito un saggio di ubiquitinazione in cellule 293T in cui si sono co-espresse FLIP-Flag, Ubiquitina-HA e ITCH-Myc in modo da osservare ATM promuovere la degradazione di FLIP modulando l'attività di ITCH. Si rileva l'ubiquitinazione di FLIP tramite immunoblotting anti-HA su IP di FLIP. Si è testato inoltre il contributo peculiare dell'attività chinasi di ATM utilizzando sia l'inibitore specifico KU55933, sia la Neocarzinostatina.

I suddetti esperimenti confermano che in risposta a danno al DNA l'attività di ATM è necessaria per modulare l'attività di ITCH ed i livelli di FLIP regolandone la sua ubiquitinazione.

*ITCH potrebbe essere un substrato diretto di ATM* – È riportato in letteratura che ATM modula l'attività di alcuni suoi effettori mediante la loro diretta fosforilazione principalmente all'interno di siti specifici definiti "siti SQ-TQ", composti da un residuo di serina o treonina seguito da un glutammato. Da un'analisi della sequenza genica di ITCH si riscontrano ben nove "siti SQ-TQ"; si è ipotizzato che ATM fosse in grado di fosforilare la ligasi. È stato effettuato un IP su colonna cromatografica partendo da 30mg di estratto proteico da cellule 293T cotrasfettate con ITCH ed ATM e trattate con Neocarzinostatina. Il campione è stato separato per elettroforesi su SDS-PAGE ed il gel colorato con Brilliant Blue per evidenziare le proteine. L'analisi di spettrometria di massa è stata svolta nel Laboratorio di Spettrometria di Massa, dell'Istituto DIBIT-H-San Raffaele di Milano. La banda separata tramite elettroforesi su

gel di acrilammide corrispondente al peso molecolare di ITCH è stata eluita dal gel e processata per la digestione enzimatica con tripsina; la miscela di peptidi così ottenuta è stata analizzata per spettrometria di massa. Tale approccio ha evidenziato un peptide caratterizzato dalla presenza di una Metionina la cui ossidazione genera un incremento di peso molecolare di 16Da e da una possibile fosforilazione che genera un incremento di peso molecolare di 80Da. Tale peptide ha la seguente sequenza, KTLFEDSFQQIM-SFSPQDLR, ed è localizzato tra i residui aminoacidici 555-574 della sequenza umana di ITCH all'interno del dominio HECT. Nel suddetto peptide non è presente alcun motivo SQ/TQ, substrato canonico di ATM; è invece presente un sito SP che in letteratura è noto essere riconosciuto in maniera specifica dalla chinasi JNK che è noto regolatore dell'attività di ITCH da TNF.

In conclusione, tale esperimento seppure preliminare, ed ovviamente da riconfermare, suggerisce due ipotesi: la prima, basata sulla descrizione in letteratura di alcuni siti di fosforilazione "non canonici" da parte di ATM, consiste nella capacità di ATM di fosforilare un sito presente nel peptide identificato tramite spettrometria di massa; la seconda è che ATM sia in grado di modulare l'attività di ITCH in risposta al danno al DNA, mediante l'attività della chinasi JNK.

### **MECCANISMI CELLULARI DI BASE DEL DANNO A CARICO DELLA PLASTICITÀ SINAPTICA NEL MODELLO MURINO DI DYT1 DYSTONIA (Giuseppe Sciamanna)**

**Introduzione** – La distonia comprende un ampio gruppo di disordini del movimento caratterizzati da contrazioni involontarie dei muscoli oppositori che causano forti movimenti di torsione e posture del tutto anomale. L'eziologia di tale sindrome rimane per molti versi sconosciuta ma è stata tuttavia accertata un'importante componente genetica associabile a molte forme di tale patologia. Circa 14 mutazioni geniche sono ad oggi correlate a sindromi di tipo distonico e la più diffusa tra esse risulta essere la distonia DYT1, caratterizzata dalla delezione di una tripletta genica ( $\Delta$ GAG) a livello del cromosoma 9q che causa la produzione di una proteina mutata (TorsinA). La funzione di tale proteina non è ancora del tutto definita ma si ritiene che possa essere implicata nella regolazione delle interazioni fra citoscheletro, membrana nucleare e reticolo endoplasmatico, e nei processi di trasporto delle vescicole sinaptiche all'interno degli assoni neuronali [Goodchild et al. (2005) *Neuron* 48: 923-932; Hewett et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7271-7276]. Lo striato appartiene ai cosiddetti gangli della base (GB) e svolge all'interno dei processi di controllo dell'attività motoria un fondamentale ruolo di integrazione e bilanciamento dell'attività degli altri nuclei dei GB nonché di altre strutture come la corteccia motoria, frontale ed associativa. Sempre maggiori evidenze riportano come alterazioni a carico dello striato stesso siano fortemente coinvolte nella sviluppo della distonia ed in particolare della distonia DYT1. In un modello animale di distonia DYT1 ad esempio, i neuroni spinosi striatali (MSNs) presentano infatti profonde alterazioni nei fenomeni di plasticità a lungo termine quali "long term potentia-

tion" (LTP) e "long term depression" (LTD) [Martella et al. (2009) *Brain* 132(9): 2336-2349].

Nello stesso modello animale l'attivazione del recettore D2-like sugli interneuroni colinergici (LA) di topi mutati, induce un abnorme effetto eccitatorio assente in condizioni fisiologiche di base [Pisani et al. (2006) *Neurobiol Dis* 24(2): 318-325]. Inoltre, studi in precedenza condotti dimostrano come l'attività GABAergica striatale sia significativamente aumentata in topi mutati per la TorsinA [Sciamanna et al. (2009) *Neurobiol Dis* 2009 34(1): 133-145], confermando lo stretto coinvolgimento dello striato nella fisiopatologia della distonia DYT1. Diversi e distinti fattori sono in grado di modulare l'attività GABAergica dello striato. Particolare importanza riveste soprattutto l'innervazione dopaminergica, la cui disfunzione è ritenuta oggi fortemente implicata nell'insorgenza di fenomeni distonici. In pazienti affetti da distonia DYT1 sono stati individuati dei ridotti livelli di dopamina nel caudato/putamen [Furukawa et al. (2000) *Neurology* 54(5): 1193-1195] così come un aumentato turnover della dopamina [Augood et al. (2004) *Adv Neurol* 94: 53-60]. Studi di PET dimostrano, in pazienti con distonia DYT1 non conclamata, la presenza di una moderata riduzione del *binding* del recettore striatale D2 [Asanuma et al. (2005) *Neurology* 64: 347-349].

Sulla base di tali considerazioni, obiettivo del presente progetto è stato quindi quello di realizzare un più dettagliato e ampio studio della trasmissione sinaptica GABAergica striatale in un modello animale di distonia DYT1, individuando eventuali alterazioni a carico del circuito stesso così come i fattori in grado di regolarne l'attività.

**Materiali e metodi** – La realizzazione del suddetto progetto ha visto l'utilizzazione di tecniche di registrazione elettrofisiologica di tipo *patch-clamp* in configurazione *whole-cell*. Gli esperimenti sono stati condotti su fettine cortico-striatali di cervello prelevate da topi di controllo (NT), da topi che sovraesprimevano la proteina umana non-mutata (hWT) e infine da topi che sovraesprimevano la proteina umana mutata (hMT). Gli animali venivano sacrificati tramite dislocazione cervicale in stato di anestesia totale e il cervello immediatamente rimosso. Le fettine sono state preparate tramite utilizzo di un vibratomo e mantenute costantemente in sospensione in una soluzione contenente in mM: 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 18 NaHCO<sub>3</sub>. Per gli esperimenti concernenti l'analisi di eventi sinaptici evocati (eIPSCs) e spontanei (sIPSCs) gli elettrodi di registrazione sono stati riempiti con la seguente soluzione intracellulare in mM: CsCl (110), K<sup>+</sup>-gluconate (30), EGTA (1.1), Hepes (10), CaCl<sub>2</sub> (0.1), Mg-ATP (2.0), GTP (0.3).

Gli eventi GABAergici evocati venivano indotti ad una frequenza di 0.1 Hz, tramite un elettrodo bipolare posto in prossimità della cellula registrata. I dati sono stati acquisiti tramite amplificatore Multiclamp 700b (Axon Instruments) e il software pClamp 9.2. Al fine di evitare la sovrapposizione di attività di tipo glutammatergico, tutti gli esperimenti sono stati effettuati in presenza di antagonisti specifici dei recettori del glutammato AMPA e NMDA (MK801; CNQX). I dati acquisiti sono stati analizzati off-line tramite l'utilizzo di software specifico: Minianalysis (Synaptosoft), pClamp 9.2 (Molecular

Devices), Origin 6.1. I risultati ottenuti nelle tre popolazioni sono stati confrontati applicando il test statistico ANOVA e sono stati considerati significativamente diversi per valori di  $p < 0.05$ .

**Risultati** – Tramite registrazioni elettrofisiologiche è stata valutata l'attività sinaptica evocata di tipo GABAergico (eIPSCs) in neuroni spinosi striatali (MSNs) e in interneuroni striatali GABAergici fast-spiking (FSi). Gli eventi sinaptici sono stati valutati in ognuno dei tre gruppi di animali (NT, hWT, hMT), analizzandone parametri quali ampiezza, rise time, decay time e slope value. Nessuna significativa differenza è stata riscontrata nelle proprietà di base degli sIPSCs registrati nei tre gruppi. Tuttavia la valutazione dell'effetto inibitorio indotto dall'attivazione dei recettori D2-like ha mostrato come sia gli MSNs che gli FSi degli animali hMT presentino delle alterazioni a carico della modulazione del circuito GABAergico. Negli MSNs infatti, l'applicazione dell'agonista D2-like (quinpirolo) induce una netta riduzione dell'ampiezza degli eIPSCs sia negli animali NT che hWT (rispettivamente  $67.7 \pm 2.1\%$  e  $66.1 \pm 2.3\%$  del controllo,  $p < 0.05$ ). Tale effetto risulta essere perduto negli MSNs di animali hMT ( $98 \pm 4.6\%$  del controllo;  $p > 0.05$ ), confermando il forte coinvolgimento del sistema dopaminergico nella patogenesi della distonia. Tale alterazione è stata riscontrata anche per ciò che riguarda gli interneuroni FSi. Infatti l'applicazione di quinpirolo induce la riduzione dell'ampiezza degli eIPSCs sia negli animali NT che negli hWT (rispettivamente  $68.2 \pm 3.2\%$ ;  $68.3 \pm 3\%$  del controllo,  $p < 0.05$ ), mentre modifica solo parzialmente l'ampiezza degli eIPSCs registrati da animali hMT ( $85.9 \pm 1.6\%$  del controllo;  $p > 0.05$ ).

Al fine di valutare se tale perdita di effetto fosse specifica per il recettore dopaminergico D2-like o fosse piuttosto un'alterazione che coinvolgesse anche altri complessi recettoriali che come il recettore D2-like utilizzano il sistema di proteine Gi/G0, è stato analizzato l'effetto sia dell'agonista specifico per i recettori GABA<sub>B</sub> (baclofen) sia l'agonista del recettore CB1 per gli endocannabinoidi (HU210). L'applicazione di Baclofen riduce significativamente la frequenza degli eventi sinaptici spontanei (sIPSCs) registrati da MSNs in tutti i gruppi di animali considerati. (NT =  $74 \pm 5.1\%$ ; hWT =  $75 \pm 6.3\%$ ; hMT =  $69.2 \pm 3.4\%$ ;  $p < 0.05$ ) senza tuttavia modificare l'ampiezza degli eventi. In maniera simile, l'applicazione di HU210 riduce la frequenza degli sIPSCs nei tre gruppi di animali senza alterazioni significative dell'ampiezza degli eventi (NT =  $54.3 \pm 3.1\%$ ; hWT =  $52.1 \pm 3.6\%$ ; hMT =  $57.4 \pm 3.6\%$ ;  $p < 0.05$ ). Tali dati confermano la specificità dell'alterazione a livello del recettore D2-like. Inoltre al fine di verificare un possibile rilascio tonico di endocannabinoidi è stato testato l'effetto dell'antagonista del recettore CB1 (AM251).

Sia la frequenza che l'ampiezza degli eventi non sono state modificate dall'applicazione di AM251 in nessuno dei tre gruppi di animali (NT:  $82 \pm 10\%$ ; hWT:  $84.4 \pm 16.8\%$ ; hMT:  $81.2 \pm 14.4\%$  del controllo;  $p > 0.05$ ).

**Conclusione** – I seguenti dati dimostrano come in un modello animale di distonia DYT1 il circuito GABAergico striatale presenti evidenti e significative alterazioni. In particolare sia neuroni MSN che interneuroni FS presentano un alterato effetto modulatore indotto dall'attivazione esogena del recettore dopaminergico D2-like, un effetto del tutto specifico e che non coinvolge vie

intermedie di traduzione del segnale intracellulare. Data l'importanza dell'attività dello striato all'interno della regolazione dell'attività motoria, e in considerazione del fatto che la distonia non presenta evidenti fenomeni di degenerazione cellulare, l'individuazione e lo studio di alterazioni funzionali a carico del circuito GABAergico striatale rappresenta un importante punto strategico per l'individuazione di nuovi *target* terapeutici nella cura della distonia.

**I DISTURBI COMPORTAMENTALI NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE:  
VALUTAZIONE DEI BEHAVIOURAL AND PSYCHOLOGICAL SYMPTOMS  
OF DEMENTIA E LORO INSERIMENTO NELLE LINEE GUIDA  
PER LA DIAGNOSI DI DEMENZA (Ilaria Spoletini)**

**Introduzione** – I disturbi comportamentali nelle malattie neurodegenerative sono stati per la prima volta descritti agli inizi del 1900 da Alzheimer, in riferimento al caso di una paziente con deterioramento cognitivo associato a sintomi psichiatrici quali deliri paranoidei, deliri di gelosia, irritabilità e aggressività [Finkel (2000) *Int J Geriatr Psychiatry* 15(S1): S2-S4]. Nonostante tali iniziali evidenze, l'interesse clinico degli studiosi si è concentrato per molti anni esclusivamente sui deficit cognitivi nella demenza, trascurando gli aspetti comportamentali. Inoltre, fino agli anni '80 i pochi studi sull'argomento erano di discutibile attendibilità anche a causa della mancanza di strumenti validi e attendibili per la valutazione dei disturbi comportamentali nella demenza. Finalmente, nel 1996 si è giunti alla definizione di *Behavioural and Psychological Symptoms of Dementia* (BPSD) da parte dell'International Psychogeriatric Association [Finkel et al. (1996) *Int Psychogeriatr* 8 (S3): 497-500].

Oggi, in letteratura emergono due approcci per valutare i disturbi comportamentali nelle demenze: un approccio che potremmo definire *sintomatologico* o dimensionale, che individua singoli sintomi, e uno *sindromico*, che clusterizza i singoli sintomi in gruppi di sintomi correlati. L'obiettivo auspicabile è di arrivare a una migliore caratterizzazione dei cluster sintomatologici anche al fine di individuare linee guida diagnostiche che permettano una maggiore specificità terapeutica. Infatti, nonostante i BPSD accompagnino quasi invariabilmente, sul piano clinico, la sintomatologia cognitiva delle demenze, essi non sono annoverati tra i criteri diagnostici, neanche nella forma più comune di demenza neurodegenerativa, la demenza di Alzheimer (AD). L'unico BPSD preso in considerazione nella procedura di valutazione diagnostica della demenza è l'allucinazione visiva, nella diagnosi di demenza con corpi di Lewy, la seconda forma di demenza neurodegenerativa dopo la AD [Tröster (2008) *Neuropsychol Rev* 18: 103-119].

Alcuni BPSD sono stati proposti nella valutazione diagnostica della demenza fronto-temporale ma attualmente solo la mancanza di consapevolezza di malattia è annoverata tra i criteri diagnostici [McKeith (2006) *J Alzheimers Dis* 9 (S 3): 417-423]. Infine, è documentato che i BPSD sono la causa principale di stress per i caregivers, di ricovero e di incremento della spesa sanitaria [Grossberg (2000) *Int Psychogeriatr* 14(S1): 27-49]. Infatti, i

pazienti AD istituzionalizzati hanno una maggiore incidenza di BPSD rispetto ai pazienti non istituzionalizzati (e tale dato è in contrasto con il grado di compromissione cognitiva, che è paragonabile tra i due gruppi [Grossberg (2000) *Int Psychogeriatr* 14(S1): 27-49]. Per tali motivi, la conoscenza e l'individuazione dei BPSD è di primaria importanza al fine di intraprendere un approccio terapeutico mirato ed efficace, soprattutto nella fase preclinica di AD, ovvero Mild Cognitive Impairment (MCI).

**Materiali e metodi** – *Soggetti* – Nell'anno 2008 sono stati inclusi 50 pazienti con una diagnosi di MCI amnestico singolo dominio, 50 pazienti con una diagnosi di MCI multidominio, 50 con una diagnosi di AD probabile di grado lieve (Mini Mental State Examination  $\geq 18$ ) e 50 soggetti anziani di controllo (CON). È stato così possibile ampliare un campione già esistente di pazienti AD e MCI reclutati presso diverse cliniche neurologiche, per un totale di 245 pazienti (119 con AD; 68 con MCI multidominio; 58 con MCI amnestico singolo dominio) e 107 controlli. In accordo con gli obiettivi previsti dallo studio tutti i pazienti sono stati sottoposti a una valutazione diagnostica secondo i criteri NINCDS-ADRDA per la malattia di Alzheimer (AD) ed i criteri per la diagnosi di MCI amnestico singolo dominio [Petersen et al. (1999) *Arch Neurol* 56: 303-308] e MCI multidominio [Winblad et al. (2004) *J Intern Med* 256: 240-246].

*Test* – I soggetti inclusi sono stati sottoposti ad una estensiva batteria neuropsicologica (Mental Deterioration Battery) [Carlesimo et al. (1996) *Eur Neurol* 36: 378-384]. In accordo con gli obiettivi previsti dallo studio, tutti i pazienti sono stati sottoposti a una valutazione psichiatrica che includeva i criteri diagnostici specificatamente sviluppati per la depressione [Olin et al. (2002) *Am J Geriatr Psychiatry* 10: 129-141], l'apatia [Starkstein et al. (2001) *Am J Psychiatry* 158: 872-877] e la psicosi [Jeste e Finkel (2000) *Am J Geriatr Psychiatry* 8: 29-34] nella demenza. Inoltre, è stato somministrato ad ogni caregiver il Neuropsychiatric Inventory (NPI) [Cummings et al. (1994) *Neurology* 44: 2308-2314], un questionario che consente la valutazione di 12 sintomi psichiatrici: deliri, allucinazioni, depressione/disforia, ansia, disinibizione, euforia, agitazione/aggressività, irritabilità/labilità dell'umore, apatia, comportamento motorio aberrante, disturbi dell'appetito e disturbi del sonno. È stato calcolato un punteggio totale di frequenza (da 1 a 4) e gravità (da 1 a 3) per ogni sintomo. I BPSD sono stati così categorizzati in tre gruppi: assenza di sintomi (punteggio=0); lievi (punteggio=1-3); severi (punteggio=4+).

*Analisi statistiche* – I confronti statistici tra i gruppi di partecipanti per le variabili nominali sono stati effettuati utilizzando il test del chi-quadro. Le differenze tra i gruppi per le altre variabili sono state esplorate tramite una analisi multivariata utilizzando una serie di analisi della regressione logistica, condotte per confrontare le probabilità di avere sintomi psichiatrici nei gruppi di pazienti rispetto ai controlli. In tale modello i risultati sono stati aggiustati per età, genere, livello di istruzione e livello cognitivo globale.

**Risultati** – Per quanto riguarda le variabili sociodemografiche, i pazienti AD, come ci si aspettava, differivano per età e scolarità dai controlli, mostrando

una maggiore età e un minore livello di istruzione. I controlli e i pazienti con MCI amnestico singolo dominio mostravano un maggiore livello di istruzione rispetto ai pazienti AD e ai pazienti MCI multidominio. Circa la metà del campione di pazienti AD ha ricevuto la diagnosi di depressione e apatia. In particolare, i pazienti AD mostravano una probabilità tre volte maggiore di avere depressione rispetto ai pazienti con MCI amnestico singolo dominio (adjusted OR=3.0 CI= 1.1-7.6). Non vi erano differenze nella frequenza della depressione tra pazienti AD e MCI multidominio (OR=1.4, CI=0.7-3.1). La frequenza di diagnosi di depressione nei pazienti con MCI multidominio e AD era significativamente maggiore rispetto ai pazienti con MCI amnestico singolo dominio. Ad ogni modo, l'analisi di regressione logistica non ha evidenziato alcuna differenza significativa nelle probabilità di avere depressione nei pazienti con MCI multidominio rispetto ai pazienti con MCI amnestico singolo dominio (OR=1.9, CI=0.9-4.0), anche dopo aver corretto per età, genere, istruzione e livello cognitivo globale (adjusted OR=1.9, CI=0.8-4.6).

Per quanto riguarda l'apatia, i pazienti AD avevano un rischio di avere una diagnosi di apatia significativamente maggiore rispetto ai pazienti con MCI amnestico singolo dominio (adjusted OR=16.9, CI=4.6-61.8) e con MCI multidominio (adjusted OR=7.5, CI=3.0-19.2). Più del doppio di pazienti con MCI multidominio avevano una diagnosi di apatia rispetto ai pazienti con MCI amnestico singolo dominio. Nove pazienti con AD (7.6%), 1 paziente con MCI amnestico singolo dominio (1.7%) e 1 con MCI multidominio (1.5%) hanno ricevuto la diagnosi di psicosi. A causa della bassa prevalenza di psicosi nei gruppi non è stato possibile condurre ulteriori analisi.

Per quanto riguarda i singoli sintomi neuropsichiatrici valutati tramite l'NPI, si conferma il dato che apatia e depressione mostrano una frequenza proporzionale all'aumento della gravità del deficit cognitivo. Apatia e depressione erano infatti maggiormente prevalenti nell'AD (78.2% del campione mostrava sintomi depressivi, e l'84.9% apatia). I pazienti con MCI multidominio mostravano circa la stessa frequenza di sintomi depressivi dei pazienti AD, ma di gravità lieve. I sintomi di agitazione/aggressività erano più frequenti nei pazienti AD che nei gruppi MCI, mentre non differenziavano i gruppi MCI. Il pattern di sintomi di irritabilità era speculare a quello osservato per agitazione/aggressività. I sintomi di disinibizione colpivano più di un terzo dei pazienti AD (37.8%), solo il 5.2% dei pazienti con MCI amnestico singolo dominio e il 14.7% dei pazienti con MCI multidominio. I disturbi del sonno e i disturbi dell'appetito aumentavano in parallelo all'aumento di gravità del deficit cognitivo. Più di un terzo dei pazienti AD (35.3%) avevano disturbi dell'appetito, e il 27.8% mostrava sintomi gravi. I sintomi psicotici avevano una bassa frequenza nel campione di pazienti. I deliri erano presenti solo nei pazienti AD, di cui 10 (8.4%) aveva deliri di gravità lieve, e 4 pazienti (3.4%) aveva deliri severi. I sintomi di euforia erano riferiti in 29 pazienti con AD (24.4%), 7 con MCI multidominio (10.3%) e 5 con MCI amnestico singolo dominio (8.6%). Sintomi di comportamento motorio aberrante erano più comuni, essendo presenti in 62 pazienti AD (52.1%), 10 con MCI amnestico singolo dominio (17.2%) e 16 (23.5%) con MCI multidominio.

**Conclusioni** – Il presente studio mostra una elevata frequenza di BPSD in pazienti con MCI e AD. La depressione è il sintomo neuropsichiatrico più frequente, specialmente nei pazienti AD e con MCI multidominio. L'apatia è molto frequente in tutti i gruppi diagnostici e la probabilità di mostrare apatia aumenta progressivamente con l'aumento del deficit cognitivo. Vi è una elevata frequenza anche di altri sintomi neuropsichiatrici, soprattutto agitazione/aggressività, irritabilità, disinibizione, disturbi del sonno e dell'appetito, coerentemente coi dati di prevalenza esistenti in pazienti con MCI and AD [Apostolova, Cummings (2008) *Dement Geriatr Cogn Disord* 25: 115-126; Geda et al. (2008) *Arch Gen Psychiatry* 65(10): 1193-1198; Hwang et al. (2004) *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18(1): 17-21].

L'elevata frequenza di apatia e depressione evidenziata dal presente studio è coerente con precedenti studi [Starkstein et al. (2006) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 8-11; Apostolova e Cummings (2008) *Dement Geriatr Cogn Disord* 25: 115-126; Monastero et al. (2009) *J Alzheimers Dis* 19; Hwang et al. (2004) *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18(1): 17-21]. La progressiva prevalenza di apatia attraverso i gruppi diagnostici, speculare alla gravità della compromissione cognitiva, è in linea con i dati in letteratura che suggeriscono che la diagnosi di apatia in fase MCI può predire la progressione in AD [Robert et al. (2008) *Am J Geriatr Psychiatry* 16: 770-776; Vicini Chilovi et al. (2009) *Dement Geriatr Cogn Disord* 27: 390-398]. A differenza della depressione, che sembra comunque più frequente nella fase preclinica di demenza, quando il paziente è più consapevole del deficit cognitivo, l'apatia potrebbe essere una sindrome cognitiva, come già dimostrato [Spalletta et al. (2004) *J Neurol* 251: 688-695]. Infatti, vi è evidenza che l'apatia aumenta con l'aumento del deficit mnestico negli MCI [Robert et al. (2008) *Am J Geriatr Psychiatry* 16: 770-776], e che vi è una relazione tra apatia, funzionamento esecutivo e disfunzioni frontali nell'AD [Thomas et al. (2004) *Encephale* 30: 52-59], e tra apatia e atrofia delle regioni frontali [Apostolova et al. (2007) *Dement Geriatr Cogn Disord* 24: 91-97].

In conclusione, emerge l'importanza di valutare depressione e apatia utilizzando criteri diagnostici specifici, al fine di aumentare la distinzione tra queste due sindromi [Tagariello et al. (2009) *Arch Gerontol Geriatr* 49: 246-249] che vengono spesso erroneamente confuse, e di un loro futuro inserimento nelle linee guida diagnostiche di AD e MCI.

## **SINDROME DELLE APNEE OSTRUTTIVE DEL SONNO:**

### **CORRELAZIONI FISILOGICHE E NEURORADIOLOGICHE** (*Federico Torelli*)

**Introduzione** – La sindrome delle apnee ostruttive del sonno (OSAS) è accompagnata, nelle forme di grado moderato-severo, da deficit neurocognitivi verosimilmente mediati da danni micro- o macro-scopici in diverse regioni cerebrali. L'obiettivo principale del progetto è stato quello di valutare la presenza e l'estensione di danno cerebrale tramite l'utilizzo di tecniche avanzate di Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) e di correlare tali risultati con dati neuropsicologici e clinici.

**Metodi** – In seguito all'esecuzione di monitoraggio cardio-respiratorio completo tramite apparecchio portatile (Embletta, Flaga-Iceland), sono stati reclu-

tati 16 pazienti (13 maschi e 3 femmine) affetti da OSAS di grado moderato-severo (Indice di apnea/ipopnea:  $52.5 \pm 26.0/h$ ), di età media di  $55.8 \pm 6.7$  anni. Dopo valutazione clinico/anamnestica che ha escluso la presenza di disturbi respiratori sonno-correlati sono stati altresì inclusi nello studio 14 soggetti di controllo (9 maschi e 5 femmine, età media:  $57.6 \pm 5.1$  anni). Pazienti e controlli risultano ben appaiati in termini di età media, sesso, livello di scolarità, presenza di fattori di rischio cardiovascolare diversi dall'OSAS (ipertensione arteriosa, diabete mellito, patologie cardiovascolari). In tutti i soggetti è stata valutata l'assenza di specifici criteri di esclusione (precedente trauma cranico maggiore, ischemia cerebrale, encefalite, disturbi psichiatrici maggiori, punteggio inferiore a 28/30 nel Mini Mental State Examination).

I 30 soggetti inclusi sono stati quindi sottoposti ad un'unica sessione della durata di circa 50 minuti di RMN (apparecchio 3 Tesla Allegra, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) durante la quale sono state acquisite le seguenti sequenze: axial 3D-T1-weighted magnetization-prepared rapid-acquisition gradient echo (MPRAGE) (FOV  $20.8 \times 25.6$  cm<sup>2</sup>, matrix  $208 \times 256$ , in plane resolution  $1 \times 1$  mm<sup>2</sup>, 176 slices, 1 mm slice thickness); sagittal 3D TSE T2-weighted (FOV  $22.0 \times 25.6$  cm<sup>2</sup>, matrix  $220 \times 256$ , in plane resolution= $1 \times 1$  mm<sup>2</sup>, 176 slices, 1 mm slice thickness); sagittal 3D TSE T2 Fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) (FOV  $20.8 \times 25.6$  cm<sup>2</sup>, matrix  $208 \times 256$ , in plane resolution= $1 \times 1$  mm<sup>2</sup>, 144 slices, 1.3 mm slice thickness); Diffusion tensor imaging (DTI) (TE/TR= $89$  ms/ $8500$  ms, bandwidth= $2126$  Hz/voxel, matrix size= $128 \times 128$ , axial slices= $80$ , voxel size= $1.8 \times 1.8 \times 1.8$  mm<sup>3</sup>). Entro 48 ore dall'esecuzione di tale esame i soggetti hanno quindi effettuato una valutazione neurocognitiva, costituita da una batteria di test volti ad esplorare i principali domini cognitivi (funzioni esecutive, memoria a breve e lungo termine per materiale verbale e non verbale, linguaggio, attenzione, prassia, intelligenza logico-deduttiva). L'analisi delle immagini di RMN è avvenuta in collaborazione con il Center for Neurological Imaging – Brigham and Women's Hospital di Boston (USA), ed ha implicato l'utilizzo sia di tecniche automatizzate (Voxel-based morphometry [VBM], Freesurfer segmentation) che di tracing manuale di strutture corticali e sottocorticali.

**Risultati** – Dal punto di vista demografico, in accordo con quanto già riportato in letteratura, i pazienti affetti da OSAS hanno mostrato punteggi significativamente superiori rispetto ai controlli in termini di Body Mass Index ( $31.7 \pm 4.4$  vs  $25.5 \pm 2.4$ ,  $p < 0.01$ ) e di Epworth Sleepiness Scale (una scala soggettiva standardizzata per la valutazione della sonnolenza diurna,  $8.5 \pm 4.5$  vs  $2.6 \pm 1.6$ ,  $p < 0.01$ ). La valutazione neuropsicologica ha messo in evidenza la presenza di punteggi significativamente inferiori nei pazienti rispetto ai controlli in test di valutazione della memoria verbale (test delle 15 parole di Rey con richiamo immediato [ $40.9 \pm 5.4$  vs  $45.9 \pm 6.4$ ,  $p = 0.026$ ] e ritardato [ $7.7 \pm 2.3$  vs  $9.7 \pm 1.4$ ,  $p = 0.011$ ]) e delle funzioni esecutive (test di Stroop [ $1.12 \pm 0.3$  vs  $0.89 \pm 0.2$ ,  $p = 0.021$ ] e Digit span backward [ $3.8 \pm 0.9$  vs  $4.4 \pm 0.6$ ,  $p = 0.049$ ]). A livello neuroradiologico, infine, le tecniche di segmentazione volumetrica hanno consentito di evidenziare nei pazienti la presenza di atrofia sia globale (riduzione del volume di tutta la gray matter corticale) che focale (riduzione

di volume dell'ippocampo destro), nonché la correlazione tra il volume di strutture sottocorticali (ippocampo ed amigdala) e i dati di ossimetria notturna (tempo di sonno trascorso al di sotto del 90% e dell'80% di saturazione); la VBM ha evidenziato nei pazienti affetti da OSAS di grado severo regioni di significativa riduzione volumetrica a livello degli ippocampi bilateralmente e nella corteccia temporale sinistra. Quest'ultima è risultata associata con i punteggi ottenuti nel test delle 15 parole di Rey.

**Conclusioni** – L'analisi dei dati fin qui effettuata ha consentito di evidenziare la presenza di un grado di impairment cognitivo superiore a quello riportato nella maggior parte degli studi precedenti. Questo potrebbe essere dovuto alla diversa tipologia di pazienti studiati (il nostro campione includeva anche soggetti con OSAS di grado molto severo), ma si deve notare che esiste un'ampia variabilità nei test neuropsicologici utilizzati nei diversi studi, che rende spesso difficile effettuare confronti. In accordo con i risultati osservati nei test di memoria verbale, i pazienti hanno mostrato alterazioni volumetriche e densitometriche a livello dell'ippocampo (similmente a quanto riportato in 2 studi precedenti); di particolare interesse, inoltre, il rilievo di atrofia corticale diffusa. Infatti, anche se solitamente non è possibile ricostruire con precisione la durata di malattia nei pazienti affetti da OSAS, i nostri soggetti mediamente hanno fatto risalire l'esordio dei sintomi tipici di OSAS di grado moderato-severo (sonno non ristoratore con conseguente eccessiva sonnolenza diurna, deficit attentivi, peggioramento del russamento notturno) a 1-2 anni prima; tale tempo, relativamente breve, sembrerebbe quindi sufficiente a causare significativi danni cerebrali sia focali che globali. A conferma di una relazione causale diretta tra durata/gravità della sindrome (e della cronica ipossipnea conseguente agli eventi apnoici ripetuti) va inoltre segnalato il rilievo di una correlazione tra atrofia sottocorticale e livello di desaturazione. Alcuni studi precedenti hanno dimostrato la parziale reversibilità dei deficit cognitivi in seguito a ventiloterapia a pressione positiva (CPAP); i nostri dati neuroradiologici sembrano enfatizzare l'importanza di una diagnosi precoce di malattia al fine di limitare o prevenire la comparsa di significativi danni cerebrali.

## **EFFETTI DEL RUMORE FISIOLÓGICO SUL SEGNALE BOLD IN IMMAGINI DI AMPIEZZA E FASE (*Elisa Tuzzi*)**

**Introduzione** – Negli studi fMRI basati sul contrasto BOLD, al fine di ottenere una corretta stima del valore assoluto del segnale, e quindi dell'attivazione, è essenziale individuare, misurare e quindi rimuovere ogni sorgente di rumore o contributo non desiderato. Tra le varie sorgenti di rumore i processi fisiologici, come ad esempio il respiro ed il battito cardiaco, rappresentano la fonte predominante nelle immagini in ampiezza, in certe condizioni [Krüger et al. (2001) *Magn Reson Med* 46: 631-637]. Il movimento del soggetto, il suo respiro e il suo battito cardiaco inoltre interagiscono con le disomogeneità del campo statico  $B_0$  dando origine ad errori statici e dinamici nella fase. D'altra parte nelle immagini in fase, per campi magnetici di 3T, si è dimostrato che in generale il rumore fisiologico si manifesta in maniera più evidente [Hagberg

et al. (2008) *Magn Reson Imaging* 26(7): 1026-1040] a causa degli effetti globali del campo magnetico  $B_0$ . Ciononostante è stato suggerito [Hagberg et al. (2008) *Magn Reson Imaging* 26(7): 1026-1040] che con adeguati metodi di correzione, teoricamente si può raggiungere una stabilità del segnale in fase simile a quella riscontrata per l'ampiezza.

**Materiali e metodi** – A questo scopo sono stati sperimentati quattro tipi di filtri sulle immagini in fase acquisite su 5 soggetti anziani e due metodi per la correzione del rumore fisiologico.

*Elaborazione della fase del segnale* – I dati in fase sono stati post-processati con 4 metodi differenti sviluppati in Matlab v. 7.4, dotato di strumenti per l'elaborazione e l'analisi statistica del segnale: 1) il metodo temporal unwrap (tu); 2) il metodo reference phase, rp, [Tomasi, Caparelli (2007) *J Cereb Blood Flow Metab* 27(1): 33-42] che calcola l'evoluzione della fase rispetto al valore complesso del primo volume acquisito della serie temporale seguito dal metodo temporal unwrap (tu); 3) adottando un filtro spaziale passa-alto realizzato con un filtro Homodyne, ottenuto moltiplicando i dati del k-spazio con una finestra Hamming (di larghezza pari alla metà della dimensione della matrice matrix size), per ogni volume della serie temporale; 4) un altro filtro spaziale, utilizzando una funzione Gaussiana 2D centrata nel k-spazio, e dove  $Dk=2*p/FOV$  è stato utilizzato al posto della finestra Hamming nell'approccio precedente.

*Correzione del rumore fisiologico* – Sono stati utilizzati 2 differenti metodi per correggere il rumore fisiologico: il primo metodo, basato sulla correzione RETROICOR [Glover et al. (2000) *Magn Reson Med* 44(1): 162-167] ha utilizzato quattro regressori per la respirazione e quattro regressori per il battito cardiaco tenenti conto delle variazioni del segnale indotte dal battito cardiaco. Il secondo metodo è basato sull'evoluzione temporale della fase del punto centrale del k-spazio, estratto dai valori complessi delle immagini della serie temporale fMRI, ed utilizzato come regressore variabile (NVRk) dopo che al segnale è stato sottratto un trend quadratico. Come nel metodo RETROICOR, l'analisi attraverso la regressione lineare è stata svolta utilizzando questo singolo regressore, e infine i dati SpT (spatio-temporal unwrapped), in ampiezza e fase, sono stati rimossi dal segnale originale. È stata dunque eseguita un'analisi voxel-wise per ogni pre-processamento della fase e ogni metodo di riduzione del rumore.

**Risultati** – Dopo la correzione RETROICOR il valore medio del rumore fisiologico, la cui stima è stata ottenuta attraverso il modello teorico proposto da Kruger e collaboratori per il rumore fisiologico, si è ridotto. Anche dopo il secondo metodo, basato sull'evoluzione temporale della fase del punto centrale del k-spazio, utilizzato come regressore variabile (NVRk), il rumore fisiologico è risultato accettabilmente ridotto. I due metodi hanno dato risultati confrontabili.

Come già detto in precedenza, le informazioni relative al rumore fisiologico provenienti dalle immagini in fase sono molto utili allo scopo di valutarne il contributo e di correggere per esso il segnale acquisito. Capire meglio

i meccanismi che si celano dietro alle variazioni di fase sperimentalmente osservati negli studi fMRI basati sull'effetto BOLD può costituire un ottimo mezzo per integrare informazioni di ampiezza e fase del segnale BOLD negli esperimenti fMRI. Feng e collaboratori [2009], con alcune simulazioni, hanno ottenuto come risultato una consistente distribuzione bipolare della fase. Allo scopo di verificare tali risultati, i dati in fase sono stati ulteriormente analizzati. I risultati delle zone di attivazione scelte non hanno dato un esito positivo in questa direzione. Le zone di attivazione delle immagini in fase, opportunamente scelte per tutti e 5 i soggetti dopo i diversi filtri, non hanno però dato un esito positivo in questa direzione. Ci si propone comunque di verificare gli stessi risultati su soggetti più giovani e ci si aspettano risultati più attendibili.

### **EFFETTI DELLA VIBRAZIONE MUSCOLARE SULLA ECCITABILITÀ CORTICALE INDAGATI TRAMITE STIMOLAZIONE MAGNETICA TRANSCRANICA** (Viviana Versace)

Le attività collegate alla borsa di studio sono documentate in tre lavori scientifici in extenso che vengono descritti di seguito.

**TMS activation of interhemispheric pathways between the posterior parietal cortex and the contralateral motor cortex** – Koch G, Ruge D, Cheeran B, Fernandez Del Olmo M, Pecchioli C, Marconi B, Versace V, Lo Gerfo E, Torriero S, Oliveri M, Caltagirone C, Rothwell JC (2009) *Journal of Physiology* 587: 4281-4292.

È stata testata in 17 soggetti sani l'interazione interemisferica tra l'area parietale posteriore cIPS (caudal intraparietal sulcus) e l'area motoria primaria controlaterale M1, utilizzando la metodica della TMS a twin-coil (tc-TMS). Abbiamo dimostrato che condizionando la cIPS destra si facilita la M1 controlaterale se lo stimolo condizionante è ad una intensità di 90% RMT, ma non a 70% o 110% RMT. La facilitazione è massimale quando gli intervalli interstimolo (ISIs) sono 6 o 12 ms. Questi effetti facilitatori sono mediati da specifici gruppi di interneuroni nella M1. Infatti la short intracortical inhibition (SICI) si riduceva in M1 a seguito della stimolazione in CIPS controlaterale.

Si è dimostrato inoltre che la facilitazione occorre sui circuiti I1/I2 piuttosto che I3. Di contro, la stimolazione dell'aIPS (anterior intraparietal sulcus) al 90% RMT induceva una inibizione della M1 controlaterale agli stessi ISIs. Abbiamo infine dimostrato una facilitazione simile tra la cIPS sinistra e la M1 dx se lo stimolo condizionante era di maggiore intensità (110% invece che 90% RMT). Questi dati dimostrano che differenti sottoregioni dell'area parietale posteriore nell'uomo esercitano effetti sia facilitatori che inibitori sull'area amotoria primaria controlaterale. Queste proiezioni cortico-corticali potrebbero essere coinvolte in compiti motori quali la coordinazione bimanuale, la prensione e la pianificazione del movimento nello spazio.

**In vivo definition of parieto-motor connections involved in planning of grasping movements** – Giacomo Koch, Mara Cercignani, Cristiano Pecchioli,

Viviana Versace, Massimiliano Oliveri, Carlo Caltagirone, John Rothwell, Marco Bozzali (2009) *Neuroimage (in press)*.

Abbiamo utilizzato congiuntamente la metodica della TMS a twin-coil (tcTMS) e della trattografia (DTI) per investigare nell'uomo il contributo delle connessioni originanti da diverse aree parietali e dirette all'area motoria per la pianificazione di movimenti di prensione con l'arto superiore. Gli esperimenti di TMS hanno rivelato che la connessione tra la porzione del giro angolare (AG) vicina al solco intraparietale caudale e l'area motoria primaria (M1) si modificava selettivamente durante le fasi precoci di preparazione della prensione di un oggetto nello spazio controlaterale con l'intera mano. Di converso, una via differente connette la parte del giro. Abbiamo utilizzato congiuntamente la metodica della TMS a doppio coil e della trattografia (DTI) per investigare nell'uomo il contributo delle connessioni originanti da diverse aree parietali e dirette all'area motoria per la pianificazione di movimenti di prensione con l'arto superiore. Gli esperimenti di TMS hanno rivelato che la connessione tra la porzione del giro angolare (AG) vicina al solco intraparietale caudale e l'area motoria primaria (M1) si modificava selettivamente durante le fasi precoci di preparazione della prensione di un oggetto nello spazio controlaterale con l'intera mano. Di converso, una via differente che connette la parte del giro sopramarginale (SMG) vicina al solco intraparietale anteriore con la M1 si attiva solo nella preparazione di movimenti di precisione di prensione con la mano controlaterale.

L'inattivazione dell'area premotoria ventrale (PMv) omolaterale mediante somministrazione di theta burst stimulation continua (cTBS) annulla queste interazioni. La trattografia ha dimostrato che AG e SMG sono strettamente connesse con l'area premotoria ventrale e con M1 mediante distinte porzioni del fascicolo longitudinale superiore (SLF) che potrebbero essere responsabili delle selettive interazioni neurofisiologiche sopradescritte.

Questi risultati dimostrano l'esistenza di circuiti parieto-premotori cruciali per la preparazione di diversi compiti di prensione.

**Resonance of cortico cortical connections of the motor system with the observation of goal directed movements** – Giacomo Koch, Viviana Versace, Sonia Bonni, Federica Lupo, Emanuele Lo Gerfo, Massimiliano Oliveri, Carlo Caltagirone (2009) *J Neuroscience (in press)*.

Sono stati studiati 13 soggetti volontari sani mediante tecnica di TMS a doppio coil. In una prima sessione si è indagata neurofisiologicamente la connettività parieto-motoria (PPC-M1), mediante registrazione dal muscolo primo dorsale interosseo e adduttore del V dito, mentre il soggetto vedeva un video di prensione eseguita con la mano intera per un oggetto grande (*whole grasping*) o con le prime due dita per un oggetto piccolo (*pinching*), con movimento appropriato o inappropriato, ed un video di un braccio statico di fronte ad oggetto grande o piccolo (totale: 6 condizioni). In una seconda sessione si è esplorata la connettività premotoria-motoria (PMv-M1) nelle stesse condizioni.

I dati raccolti depongono per un'attivazione selettiva sia del circuito PPC-M1 che di PMv-M1 durante la visione di movimenti congrui, rispetto ai

movimenti incongrui ed alle situazioni statiche. All'interno dei movimenti congrui i circuiti risultavano selettivamente facilitati per il muscolo FDI nei movimenti di *pinching* e per il muscolo ADM nei movimenti di *whole grasping*.

## **GUARDARE IL MONDO DAGLI OCCHI DELL'ALTRO: UN CONFRONTO TRA ABILITÀ VISUO-SPAZIALI DI PRESA E CAMBIO DI PROSPETTIVA** (Vanda Viola)

**Introduzione** – Diversi studi hanno investigato l'abilità di assumere il punto di vista altrui nello spazio, intesa come capacità di spostare mentalmente il proprio punto di vista per allinearlo a quello di un altro osservatore (perspective taking) durante un compito di memoria spaziale. Tuttavia, lo studio delle basi neurali del perspective taking, come processo distinto da quello di cambio di prospettiva, sembra essere inesplorato. Nonostante molti esperimenti abbiano considerato il processo il perspective taking come una trasformazione visuo-spaziale che richiede una rotazione mentale del proprio punto di vista [Huttenlocher, Presson (1973) *Cognitive Psychol* 4(2): 277-299; Huttenlocher, Presson (1979) *Cognitive Psychol* 11: 373-394; Presson (1980) *J Experimental child psychology* 29: 391-402; Presson (1982) *J Exp Psychology: Learn, Mem & Cogn* 8: 243-251; Amorim, Stucchi (1997) *Cogn Brain Res* 5(3): 229-239; Creem et al. (2001) *Cognition* 81:b41-64], solo pochi di essi [Langdon, Coltheart (2001) *Cognition* 82(1):b1-26] hanno esaminato il perspective taking come la capacità di anticipare cosa un individuo sta osservando nella scena visiva.

In alcune ricerche [Lambrey et al. (2008) *Brain* 131: 523-534] per esempio, attraverso un paradigma di priming, è stato esplorato il processo di presa di prospettiva come meccanismo distinto da quello di cambio di prospettiva. Attraverso l'utilizzo di un paradigma simile, il presente progetto mira a chiarire le basi neurali del processo di perspective taking come meccanismo distinto da quello di cambio di prospettiva.

**Metodi** – Quattordici volontari sani sono stati sottoposti a risonanza magnetica funzionale (paradigma evento-relato), durante lo svolgimento di un compito di memoria spaziale. In particolare i soggetti dovevano osservare e memorizzare la posizione spaziale di un oggetto bersaglio all'interno di un ambiente virtuale a loro noto.

Dopo un cambio di prospettiva, i soggetti decidevano se la posizione dell'oggetto target era cambiata nell'ambiente virtuale adesso percepito da un nuovo punto di vista. Tuttavia, nella metà delle prove, la prospettiva di osservazione durante la fase di richiamo poteva essere anticipata fin dalla fase di codifica, grazie alla presenza di un personaggio virtuale.

Riassumendo, il punto di vista sulla scena di recupero poteva essere noto sin dalla fase di codifica (condizione Primed) oppure completamente imprevedibile (condizione Unprimed).

Infine, il punto di vista esperito nella fase di recupero (che nella condizione Primed era anticipato dalla posizione dell'avatar) poteva rimanere lo stesso oppure ruotare di 45 o 135 gradi.

**Risultati** – L'analisi statistica delle immagini sulla fase di codifica (che confronta le due condizioni Primed e Unprimed) evidenzia l'attivazione bilaterale del Giro Temporale Medio (MTG  $F_{3,39} = 9,86$ ;  $p < 0,01$ ). L'analisi sui cambiamenti in percentuale del segnale BOLD rivela un effetto principale della condizione (MTG sinistra:  $F_{1,13} = 88,99$ ;  $p < 0,00001$ ; MTG destra:  $F_{1,13} = 79,82$ ;  $p < 0,00001$ ) che riflette una maggiore attivazione nella condizione Primed rispetto alla condizione Unprimed. L'analisi statistica delle immagini sulla fase di recupero (che confronta le due condizioni Primed e Unprimed) evidenzia l'attivazione bilaterale della corteccia retrospleniale (RSC).

In entrambe le regioni (giro temporale medio e corteccia retrospleniale), l'analisi sul cambiamento in percentuale del segnale BOLD ha messo in evidenza un effetto principale sia della condizione, sia dell'angolo di rotazione del punto di vista ( $p < 0,01$ ). Per giunta nella RSC di destra è stata riscontrata un'interazione significativa tra i due fattori ( $F_{2,26} = 3,73$ ;  $p = 0,037$ ). Questa interazione riflette una parziale abolizione dell'effetto angolare nella condizione Primed, rispetto a quella Unprimed.

**Discussione e conclusione** – Il presente studio ha messo in evidenza il ruolo selettivo di MTG nel processo di presa di prospettiva. Questa regione, infatti, preferisce codificare le posizioni spaziali dalla prospettiva di un altro osservatore, indipendentemente dalla angolazione di tale prospettiva.

Inoltre, dal presente studio emerge che RSC è coinvolta nel riconoscimento di una scena visiva da diverse prospettive di osservazione, ma diventa meno sensibile all'angolo di rotazione del punto di vista, quando quest'ultimo può essere anticipato a partire dalla prospettiva di un altro osservatore.

In conclusione, il presente studio dimostra come l'assunzione del punto di vista altrui sia un processo distinto dall'esperire un reale cambio di prospettiva.

## **STUDIO MORFOSTRUTTURALE CEREBRALE IN PAZIENTI AFFETTI DA SINDROME DELLE APNEE OSTRUTTIVE DEL SONNO MEDIANTE RISONANZA MAGNETICA** (*Silvana Zannino*)

**Introduzione** – La Sindrome delle Apnee Ostruttive del Sonno (OSAS) è caratterizzata da ripetitivi episodi di cessazione del flusso oro-nasale (>10 secondi) determinati da un'ostruzione funzionale delle vie aeree superiori che tendono a collabire soprattutto quando si dorme in posizione supina. Si associa a russamento che ne rappresenta lo stadio preclinico. Presenta una prevalenza pari a circa il 4% della popolazione generale ed incrementa con l'avanzare dell'età. Tale patologia rappresenta un fattore di rischio indipendente per patologie cardio e cerebrovascolari. In particolare, numerosi meccanismi possono essere responsabili della patogenesi della patologia cerebrovascolare nell'OSAS: ipossia, modificazioni della emodinamica cerebrale con perdita dell'autoregolazione cerebrale, modificazioni emoreologiche con incremento della viscosità ematica e trombofilia, promozione dei processi aterogenetici, cardioembolia paradossa. Le forme severe di OSAS determinano inoltre sintomi e segni diurni caratterizzati da disturbi cognitivi (memoria, concentra-

zione) ed ipersonnolenza diurna ingravescente. Alla scarsa ossigenazione ematica a cui i soggetti con OSAS sono cronicamente esposti, è verosimile che si associ una sofferenza cerebrale di natura ipossica.

Nel corso degli ultimi anni, la RM si è arricchita di una serie di tecniche strutturali quantitative la Diffusion Tensor Imaging (DTI) e Voxel Based Morphometry (VBM) utili a caratterizzare non solo il danno tissutale cerebrale macroscopico (atrofia, carico lesionale) ma anche quello microscopico. La tecnica del DTI si basa sul fenomeno fisico della diffusione, a cui la RM è sensibile, e consente di rilevare il movimento microscopico delle molecole d'acqua che compongono i tessuti biologici. La misura del coefficiente di diffusione fornisce informazioni quantitative circa le dimensioni, la morfologia, l'orientamento e la geometria delle strutture cerebrali. Tale coefficiente è generalmente dipendente dalla direzione in cui viene effettuata la misura. Questa proprietà è nota con il termine di anisotropia. La tecnica del DTI, consente di derivare, dalla stima del tensore, due importanti misure quantitative: la diffusività media (MD) e l'anisotropia frazionaria (FA), la quale rappresenta una delle più robuste misure dell'anisotropia. La stima di MD e FA a livello del parenchima cerebrale fornisce indici di danno microscopico regionale.

La tecnica della VBM rappresenta un metodo di analisi quantitativa di immagini di RM in grado di riflettere, voxel per voxel, con elevata risoluzione spaziale, misure di densità neuronale a livello della sostanza grigia encefalica, offrendo pertanto una quantificazione regionale del grado di atrofia.

**Obiettivi e metodi** – Obiettivo principale della ricerca è stato quello di investigare, mediante tecniche di neuroimaging quantitativo, la presenza e l'estensione di danno cerebrale sia macro- che microscopico in soggetti affetti da OSAS. Lo studio è stato focalizzato sia sull'accertamento quantitativo delle anomalie identificabili mediante tecniche di RM convenzionale, che su indici di danno microscopico, sia a livello delle lesioni che del tessuto cerebrale apparentemente normale. L'insieme dei parametri derivati dallo studio neuroradiologico è stato inoltre correlato con dati clinici e psicometrici.

Sono stati reclutati 26 pazienti affetti da OSAS di grado severo diagnosticati mediante polisonnografia dinamica ambulatoriale (Embletta, Flaga), e 19 soggetti di controllo sovrapponibili per età e fattori di rischio vascolare. Pazienti e controlli sono stati sottoposti ad una batteria completa di test neuropsicologici esploranti i principali domini cognitivi includenti memoria, attenzione, linguaggio, funzioni esecutive, abilità visuo-spaziali e ragionamento (Mini Mental State Examination, Test delle parole di Rey, Test di memoria visiva immediata, Copia della figura complessa di Rey-Osterrieth, Rievocazione della figura complessa di Rey-Osterrieth, Stroop test, Copia di disegni a mano libera e copia con elementi di programmazione, Fluidità verbale fonologica e semantica, Matrici colorate progressive di Raven 47). È stato inoltre valutato il grado soggettivo di sonnolenza diurna mediante Epworth Sleepiness Scale (ESS).

Di tutti i soggetti reclutati, 10 pazienti e 5 soggetti di controllo sono usciti dallo studio, in quanto non sono riusciti ad eseguire lo studio neuroradiolo-

gico mediante Risonanza Magnetica per claustrofobia. Hanno completato lo studio sedici pazienti affetti da OSAS di grado severo (F/M= 3/13, età media  $55.8 \pm 6.7$  anni, AHI  $52.5 \pm 26.0$ /ora) e 14 soggetti di controllo (F/M 5/9, età media  $57.4 \pm 5.3$ ), che sono stati quindi sottoposti ad una sessione di RMN cerebrale ad alta risoluzione (3.0 T) includente le seguenti acquisizioni: TSE-Flair, TSE-T2, MPRAGE. I dati neuropsicologici hanno mostrato che i pazienti affetti da OSAS presentano dei punteggi significativamente inferiori rispetto ai soggetti di controllo sia al test delle 15 parole di Rey, che esplora la memoria verbale, sia allo Stroop Test, che valuta le funzioni esecutive. L'analisi Voxel Based Morfometry (VBM) ha indicato che i volumi della sostanza grigia e della sostanza bianca in pazienti affetti da OSAS di grado severo, confrontati ai controlli, sono bilateralmente ridotti a livello della sostanza grigia ippocampale e della sostanza bianca delle regioni temporali. Inoltre, è stata rilevata una correlazione diretta tra il punteggio ottenuto al Test della memoria di Rey ed il volume della sostanza grigia della corteccia orbito-frontale. È stata infine osservata una correlazione negativa tra l'indice di desaturazione di O<sub>2</sub> ed il volume dell'ippocampo e dell'amigdala. Questi risultati suggeriscono che il tessuto cerebrale dei pazienti affetti da OSAS è vulnerabile ad episodi ricorrenti di apnea/ipopnea soprattutto a livello delle strutture del lobo temporale mediale ed orbito-frontale. Tali modificazioni possono essere responsabili di alcune alterazioni cognitive principalmente la memoria verbale e le funzioni esecutive osservate nei pazienti con OSAS.