



**Progetti
di ricerca
finalizzata**

**APPROCCI NEUROPROTETTIVI
NEL DANNO DA DEPRIVAZIONE ENERGETICA**

PAOLO CALABRESI

Università di Roma Tor Vergata – IRCCS S. Lucia

OBIETTIVO PRINCIPALE DEL PROGETTO

Scopo della presente ricerca sarà l'analisi dei meccanismi cellulari alla base dell'azione neuroprotettiva di diversi farmaci utilizzando un approccio multidisciplinare (comportamentale, morfologico, biochimico, neurochimico ed elettrofisiologico). In particolare, verranno impiegate tecniche elettrofisiologiche, morfologiche e biochimiche al fine di chiarire se i diversi approcci farmacologici riducano sia il danno ipossico-ischemico che la sofferenza neuronale indotta da alterazioni del metabolismo mitocondriale. A tale scopo verranno utilizzati sia modelli sperimentali *in vitro* che *in vivo*.

Sintesi delle conoscenze disponibili sull'argomento

Il cervello presenta il più alto consumo energetico dell'intero organismo a dispetto delle scarse capacità di riserva necessarie per il mantenimento dei gradienti ionici extra ed intracellulari e quindi del potenziale di membrana neuronale. È sufficiente che la deprivazione energetica superi pochi minuti per determinare danni neuronali irreversibili, e conseguenti gravi disabilità. Benché negli ultimi anni si siano compiuti notevoli progressi nel controllo dei fattori di rischio responsabili delle malattie cerebrovascolari della popolazione adulta, esse rimangono tuttora una delle principali cause di morte e di invalidità nel mondo occidentale. Inoltre, sempre maggiore interesse riveste lo studio di patologie vascolari del cervello nei soggetti giovani, in cui più che i comuni fattori di aterosclerosi cerebrale rilevati nell'anziano, giocano un ruolo fondamentale fattori genetici e tossici.

La conoscenza dettagliata dei meccanismi cellulari che sono alla base dello sviluppo del danno ischemico cerebrale rappresenta un prerequisito fondamentale per lo sviluppo di agenti farmacologici neuroprotettivi. È noto che il danno delle cellule nervose indotto da ischemia è un processo che avviene per tappe progressive e che interessa le diverse aree cerebrali in modo differenziato. Alcune di tali tappe possono essere estremamente precoci, completando il processo di morte delle cellule nervose nell'ambito di minuti od ore (necrosi cerebrale). Altre tappe possono richiedere tempi più lunghi e tali processi vanno sotto il nome di apoptosi. Si comprende facilmente, quindi, che la conoscenza delle tappe iniziali e potenzialmente reversibili del danno ischemico, associata a interventi diagnostici e presidi terapeutici adeguati, possa essere in grado di modificare grandemente il decorso clinico di un paziente colpito da ictus, altrimenti destinato ad un importante deficit permanente o alla morte.

Tale idea è espressa nel concetto di finestra terapeutica. Con tale termine, infatti, si definisce il periodo di tempo entro il quale la somministrazione di un determinato farmaco può ancora esplicare effetti terapeutici, essendo il processo di morte cellulare non ancora completo. Più recentemente, l'attenzione dei ricercatori si è rivolta anche allo studio delle fasi più tardive del processo ischemico che in genere si sviluppano alla periferia di un area cerebrale colpita da ischemia e che portano a morte le cellule nervose con un meccanismo

ritardato (apoptosi). Anche l'apoptosi è un processo complesso che addirittura arriva a coinvolgere la partecipazione attiva delle cellule nervose mediante la attivazione di particolari geni. Diversi studi sperimentali hanno dimostrato come le alterazioni precoci elettrofisiologiche e morfologiche indotte da ipossia, ipoglicemia o da danno selettivo mitocondriale, siano significativamente diverse da regione a regione cerebrale. Così, i neuroni ippocampali delle aree CA1 e CA3 rispondono all'insulto ipossico con una iperpolarizzazione di membrana, mentre le cellule del tronco cerebrale e dello striato vanno incontro ad una precoce depolarizzazione. Tali evidenze suggeriscono che il danno neuronale indotto da deprivazione energetica è strettamente dipendente dal sottotipo neuronale che è soggetto a tale insulto.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre?

Scopo della presente ricerca sarà l'analisi dei meccanismi cellulari dei farmaci neuroprotettivi utilizzando un approccio multidisciplinare. In particolare, in modelli *in vitro* verranno impiegate tecniche elettrofisiologiche, morfologiche e biochimiche al fine di chiarire se i diversi approcci farmacologici riducano sia il danno ipossico-ischemico che la sofferenza neuronale indotta da alterazioni del metabolismo mitocondriale. In modelli *in vivo* quali la ischemia focale ottenuta mediante la occlusione della arteria cerebrale media (MCAO) e la somministrazione cronica della tossina mitocondriale 3-nitropropionato (3-NP) verranno applicate tecniche di studio di tipo comportamentale, morfologico, biochimico ed elettrofisiologico. Inoltre, verrà valutata la possibile azione neuroprotettiva della L-acetilcarnitina (LAC). La LAC sembra essere coinvolta nel metabolismo energetico mitocondriale giustificando, pertanto, la possibilità che il trattamento acuto e/o cronico con tale farmaco possa modificare in modo significativo le risposte neuronali sia alla deprivazione energetica che all'uso di agenti in grado di alterare le funzioni mitocondriali.

L'uso di un approccio multidisciplinare che si avvarrà di tecniche elettrofisiologiche, valutazioni comportamentali e morfologiche, e fini misurazioni molecolari, permetterà una migliore comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari che sottostanno al danno ipossico-ischemico e delle patologie collegate ad un alterato metabolismo mitocondriale.

La conoscenza dettagliata dei meccanismi cellulari che sono alla base dello sviluppo del danno ischemico cerebrale rappresenta un prerequisito fondamentale per lo sviluppo di agenti farmacologici neuroprotettivi.

METODOLOGIA

Tecniche elettrofisiologiche - Le fettine corticostriatali di ratti Wistar maschi (200-250 μm), ottenute mediante taglio al vibratomo, verranno mantenute prima e durante la registrazione elettrofisiologica in una soluzione fisiologica ossigenata a temperatura costante. Una singola fettina corticostriatale verrà

trasferita nella camera di registrazione e sommersa con soluzione fisiologica, ossigenata costantemente, così composta: (in mM) 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 2.4 CaCl₂, 11 glucosio e 25 NaHCO₃. La soluzione ischemica è ottenuta sostituendo il glucosio con 3.42 g/l saccarosio e gassandola con una miscela 95% N₂ - 5% CO₂. Per le registrazioni extracellulari ci avvarremo di elettrodi bipolari riempiti con 2M NaCl e con una resistenza tra i 15-20 MW. L'elettrodo bipolare verrà posto sulle fibre tra corteccia e striato per evocare i potenziali di campo extracellulari (FPs). Per le registrazioni elettrofisiologiche verranno utilizzati amplificatori Axon Axoclamp 2B, e i FPs verranno acquisiti, registrati ed analizzati mediante il software pClamp 9.

Tecniche neurochimiche - La liberazione di neurotrasmettitori verrà quantificata utilizzando terminazioni nervose isolate distribuite in mono-strato su filtri microporosi e superfusi dall'alto verso il basso. La rimozione rapida del liquido di superfusione previene il riassorbimento del trasmettitore liberato così come la sua interazione con strutture presinaptiche. Inoltre, si evitano effetti indiretti dovuti all'azione di composti liberati da terminali in grado di agire su strutture sinaptosomiali vicinali, permettendo quindi di evidenziare differenze funzionali tra differenti popolazioni di terminazioni nervose.

Tecniche di biologia molecolare - Le cellule verranno trasfettate in modo transiente e stabile con plasmidi derivati da pRC/CMV e codificanti la SOD1. Inoltre verrà utilizzato un sistema di espressione inducibile delle SOD1, in cui la trascrizione dell'enzima è regolata da un promotore inducibile del tipo TET-on. Per studiare i parametri di tossicità mitocondriale verranno utilizzati probes fluorescenti come la diidrotetidina in grado di rilevare la presenza di superossido a livello mitocondriale in cellule intere, nelle stesse utilizzeremo il composto fluorescente TMRE in grado di quantizzare lo stato di polarizzazione della membrana mitocondriale. Dosaggi enzimatici: le attività delle SOD1 e SOD2 verranno misurate tramite tecniche spettrofotometriche. Specificamente l'attività della SOD2 verrà misurata dopo aver trattato il campione con KCN con lo scopo di inibire direttamente il rame catalitico della SOD1.

Tecniche morfologiche - Il danno istologico verrà controllato utilizzando il metodo di Nissl per stimare la perdita neuronale e la marcatura di Golgi per quantificare la densità di spine dendritiche. Infine, verranno somministrati trattamenti associando vari fattori di neuroprotezione: in concomitanza al periodo di riperfusione (rimozione dell'occlusione) nel modello di ischemia e in parallelo all'infusione di 3-NP nel modello di danno mitocondriale per verificare la possibilità di ridurre o revertire *in vivo* i processi di neurodegenerazione.

Tecniche comportamentali - Verranno utilizzati: occlusione dell'arteria cerebrale media e modello di tossicità mitocondriale prodotto con infusione cronica di 3-NP mediante minipumps inserite sotto cute. Lo score neurologico degli animali verrà quantificato sia mediante un'analisi motoria (open field, rotarod), che valutando le loro capacità cognitive utilizzando prove comportamentali ippocampo-dipendenti più sofisticate (labirinto radiale, condizionamento avversivo al contesto).

TRASFERIBILITÀ DEI RISULTATI E DEI PRODOTTI

Il progetto per le sue caratteristiche interdisciplinari ha una trasferibilità su piani multipli. Infatti, i risultati della ricerca in oggetto potranno avere sia una trasferibilità dal punto di vista conoscitivo che una diretta ricaduta clinica delle informazioni ottenute per la terapia e l'inquadramento nosografico dei pazienti ischemici. Gli studi di base permetteranno di identificare i recettori coinvolti nel danno ipossico-ischemico e le funzioni cellulari e molecolari che essi mediano. Di tali informazioni si gioverebbe sia la Comunità Scientifica che il Sistema Sanitario Nazionale.

Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

La conoscenza dettagliata dei meccanismi cellulari che sono alla base dello sviluppo del danno ischemico cerebrale rappresenta un prerequisito fondamentale per lo sviluppo di agenti farmacologici neuroprotettivi. A tal fine, effettuare uno studio multidisciplinare che affronterà il problema da differenti punti di vista può portare più facilmente alla migliore comprensione dei meccanismi che sottostanno al danno ischemico cerebrale.

ARTICOLAZIONE DEL PROGRAMMA

Ogni U.O. articolerà il Programma di ricerca in 2 anni.

U.O. 1 (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma)

L'elevato rilascio dai terminali corticostriatali glutammatergici di amminoacidi eccitatori gioca un ruolo cruciale nello scatenare quella serie di eventi intracellulari che porta alla morte neuronale in seguito ad ischemia cerebrale nel nucleo striatale. Lo studio verrà condotto utilizzando metodiche di registrazione intracellulare ed extracellulare in tessuto cerebrale di ratto mantenuto *in vitro*. Un transitorio episodio ischemico (deprivazione di ossigeno e di glucosio) altera le proprietà dei potenziali di campo registrati. Se tale insulto ischemico si prolunga oltre i 10 minuti tale alterazione diventa irreversibile. Dati preliminari hanno dimostrato che farmaci che riducono il rilascio di glutammato dai terminali corticostriatali hanno un'azione neuroprotettiva sui potenziali di campo esposti ad una applicazione prolungata di ischemia. Anche farmaci utilizzati generalmente in clinica come neuroprotettivi riducono il danno ischemico sui potenziali di campo registrati con tecnica extracellulare. Nonostante l'azione presinaptica inibitoria sul rilascio di glutammato di questi farmaci, non tutti mostrano una efficace azione neuroprotettiva. Evidentemente l'azione neuroprotettiva del danno ischemico è legata, oltre che al ridotto rilascio di amminoacidi eccitatori, ad una azione dei farmaci sui recettori ionotropici del glutammato (NMDA ed AMPA).

Primo anno: Nella prima fase della ricerca l'U.O. analizzerà se i farmaci con effetto di antagonismo dei recettori NMDA ed AMPA possano interferire con le alterazioni elettrofisiologiche indotte dalla transitoria ischemia *in vitro* o con le alterazioni elettrofisiologiche e morfologiche indotte dalla ischemia focale *in vivo*.

Secondo anno: Nella seconda fase della ricerca caratterizzeremo gli effetti della somministrazione di L-acetilcarnitina e di altri composti che agiscono interferendo con il metabolismo energetico mitocondriale (LAC) sul danno elettrofisiologico indotto dalla applicazione di bloccanti del complesso I (rotenone) e II (3-NP) della catena respiratoria. Tali inibitori mitocondriali verranno applicati nel bagno di perfusione delle fettine corticostriatali durante la registrazione elettrofisiologica di potenziali di campo extracellulari (field potentials, FPs) corticostriatali. Analizzeremo dapprima l'entità del danno elettrofisiologico indotto da concentrazioni note di rotenone e 3-NP applicati per un certo periodo di tempo ed in seguito valuteremo se il pretrattamento con LAC è in grado di interferire significativamente con il danno indotto da tali agenti a carico dei neuroni corticostriatali. Il meccanismo molecolare responsabile dell'eventuale neuroprotezione da LAC verrà indagato mediante l'uso di specifici agenti farmacologici.

U.O. 3 (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma)

Numerose patologie neurodegenerative dell'età adulta sono notoriamente associate ad un aumentato stress ossidativo (aumento di specie reattive dell'ossigeno, ROS e di specie reattive dell'azoto, RNS). Questo può essere dovuto almeno in parte ad una minore capacità difensiva del SNC nei confronti di questo insulto, che si riflette in una maggiore suscettibilità anche al danno da ischemia-riperfusion. Fra i meccanismi comuni a molti sistemi di danno neuronale, l'alterazione della funzionalità mitocondriale ed il conseguente deficit energetico sembrano essere cruciali nell'induzione del danno e della morte cellulare (apoptotica o necrotica).

Obiettivo di questa U.O. sarà studiare la funzionalità mitocondriale in sistemi cellulari (neuroblastoma e glioblastomi umani; motoneuroni murini; culture primarie di midollo spinale murino) in cui sia modulato il contenuto di enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, catalasi) e di molecole antiossidanti a basso peso molecolare (ad es. glutatione).

Primo anno: A tale scopo le culture cellulari verranno esaminate sia in condizioni basali che in seguito a stimolazione con induttori di neurotossicità (ad es. ossido nitrico). Verranno effettuati saggi per valutare diversi parametri biochimici:

1. potenziale di membrana mitocondriale;
2. funzionalità dei complessi della catena respiratoria;
3. produzione di ATP;
4. livello di ROS intracellulari ed intramitocondriali;
5. rilascio di citocromo c ed altri fattori coinvolti nella induzione di morte apoptotica.

Secondo anno: Sarà inoltre valutata la capacità di revertire il danno mitocondriale indotto da ROS e da RNS di alcuni composti, tra cui la LAC (che possiede attività di scavenger dei ROS ed è in grado di modulare l'attività dei complessi della catena di trasporto degli elettroni), allo scopo di validare l'uso di tali composti in patologie da insulto ossidativo.

U.O. 2 (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma)

I meccanismi cellulari e molecolari alla base della morte neuronale da insulto ischemico sono ancora poco chiari. Utilizzando un modello *in vitro* di ischemia cerebrale indotto da deprivazione combinata di ossigeno e di glucosio (OGD) in fettine cerebrali di striato di ratto abbiamo registrato le modificazioni dell'attività elettrica di singoli neuroni striatali in seguito a deprivazione energetica. È noto, infatti, che lo striato è una struttura cerebrale particolarmente vulnerabile alla ischemia. Sappiamo, inoltre, che mentre i neuroni spinosi dello striato degenerano selettivamente dopo insulto ischemico, gli interneuroni colinergici striatali sono resistenti a tale danno. Le nostre registrazioni intracellulari hanno mostrato che l'ischemia induce una depolarizzazione di membrana nei neuroni spinosi. Al contrario, l'ischemia causa una iperpolarizzazione di membrana negli interneuroni. Abbiamo, inoltre, osservato che l'ischemia induce un aumento a lungo termine delle risposte sinaptiche delle cellule spinose alla attivazione dei recettori glutammatergici. Tale risposta non viene osservata negli interneuroni colinergici. Questo processo richiede la simultanea attivazione dei recettori glutammatergici NMDA e metabotropici. Inoltre, coinvolge l'attivazione, attraverso la proteina chinasi C, della complessa via di trasduzione del segnale delle MAP chinasi (mitogen-activated protein kinasi) che porta a nuova sintesi proteica.

Primo anno: Per valutare gli eventuali effetti neuroprotettivi del LAC sulle risposte neuronali all'ischemia, verranno effettuate registrazioni elettrofisiologiche intracellulari da singoli neuroni. Sarà studiato l'effetto della somministrazione acuta di concentrazioni note di LAC nella soluzione di perfusione, valutando gli eventuali cambiamenti delle proprietà di membrana dei neuroni registrati (potenziale di riposo, potenziale d'azione, resistenza d'ingresso).

Secondo anno: Nella seconda parte della ricerca verranno analizzate le modificazioni elettrofisiologiche (potenziale di membrana e ampiezza del potenziale sinaptico) indotte da OGD in presenza di concentrazioni note di LAC. L'eventuale efficacia di LAC nel prevenire le alterazioni indotte da deprivazione di ossigeno e glucosio verrà studiata con agenti farmacologici in grado di rivelare il meccanismo ionico e/o recettoriale alla base dell'effetto di LAC.

U.O. 4 (Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma)

La nostra Unità Operativa avrà il compito di analizzare, con tecniche comportamentali e istochimiche, il possibile ruolo neuroprotettivo di farmaci in modelli animali di ischemia cerebrale focale e di tossicità

mitocondriale. Infatti, è noto che, nell'uomo come nell'animale, l'ischemia cerebrale focale induce danni neurologici permanenti sostenuti da lesioni a carico di specifiche aree cerebrali. Tra queste, l'ippocampo appare particolarmente suscettibile all'insulto ischemico in quanto è possibile osservare fenomeni selettivi di degenerazione cellulare a livello dell'area ippocampica CA1.

Sul piano comportamentale, l'ischemia produce alterazioni sensorimotorie particolarmente ben descritte nei roditori, quali un aumento della locomozione e una diminuzione dell'alternanza spontanea, mentre riduce le loro prestazioni in compiti di memoria ed apprendimento ippocampo-dipendenti. Per quanto riguarda il danno mitocondriale, studi condotti su ratti esposti alla tossina mitocondriale 3-NP, un inibitore del complesso mitocondriale II, indicano che, oltre all'ippocampo, anche lo striato appare come una delle strutture maggiormente colpite. Di conseguenza, questi animali mostrano alterazioni sensorimotorie associate a deficit cognitivi generalmente raggruppati sotto il termine di "rigidità comportamentale", termine che si riferisce alla incapacità di modificare un programma di comportamento in atto anche se reso necessario da cambiamenti intervenuti nell'ambiente circostante.

Primo anno: Durante la prima fase della presente ricerca questa U.O. analizzerà se la combinazione di più fattori neuroprotettivi (LAC e antagonisti dei recettori NMDA - con particolare riferimento all'antagonista selettivo del recettore mGluR5 MPEP) sia in grado di ridurre o prevenire il danno comportamentale e/o istologico provocato da ischemia focale, utilizzando il modello *in vivo* di occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAO) del ratto. Trattamenti neuroprotettivi verranno somministrati anche in concomitanza al periodo di riperfusione (rimozione dell'occlusione) nel modello di ischemia focale.

Secondo anno: Inoltre, nel corso del secondo anno di ricerca si studierà l'effetto neuroprotettivo del LAC e dell'MPEP, nel modello *in vivo* di tossicità mitocondriale mediante l'infusione cronica di 3-NP attraverso minipumps inserite sotto cute nel ratto. Successivamente, verranno valutati sia lo "score" neurologico degli animali mediante quantificazione delle capacità motorie che le loro capacità cognitive utilizzando prove comportamentali ippocampo-dipendenti più sofisticate (labirinto radiale, condizionamento aversivo al contesto).

U.O. 5 (Università di Genova)

La morfologia delle terminazioni nervose presinaptiche *in situ* include la presenza di mitocondri. Osservazioni al microscopio elettronico indicano che la presenza di questi mitocondri sopravvive alla preparazione di terminali isolati dal sistema nervoso centrale (sinaptosomi). Le terminazioni nervose rappresentano una sede subcellulare ad elevatissima attività; è pertanto probabile che una deprivazione energetica anche limitata possa causare notevoli modificazioni nelle molteplici funzioni presinaptiche.

Allo scopo di studiare gli effetti della deprivazione energetica sulle funzioni presinaptiche, nonché i meccanismi di agenti neuroprotettivi, riteniamo che i sinaptosomi rappresentino un sistema sperimentale

particolarmente adatto. Essi dovrebbero permettere di valutare se e come un malfunzionamento dei mitocondri intraterminali modifichi alcuni dei più importanti processi presinaptici, come ad esempio il “release” dei neurotrasmettitori.

Primo anno: Nella prima fase del progetto di ricerca, si studierà l'effetto delle tossine rotenone e 3-NP sulla liberazione spontanea di glutammato e di dopamina da terminali nervosi isolati (sinaptosomi) ippocampali e striatali di ratto in superfusione. Se si osserverà una liberazione dei due trasmettitori, studieremo le modalità di liberazione, valutando la Ca^{2+} -dipendenza del fenomeno, l'azione di bloccanti specifici del trasportatore e di sostanze in grado di prevenire la liberazione di Ca^{2+} dai depositi interni quali xestospongina C, oligomicina, RU360, CGP17347. Parallelamente valuteremo con tecnica fluorimetrica e colorimetrica se l'esposizione a rotenone e 3-NP determini nei sinaptosomi una mobilitazione di ioni Ca^{2+} , una modificazione del potenziale di membrana e la liberazione di componenti della catena apoptotica quali citocromo c, AIF, etc.

Secondo anno: Nella seconda fase del progetto i sinaptosomi verranno preparati da ippocampi e striati di ratti maschi adulti trattati con dosi crescenti di LAC o con veicolo. Si valuterà se il trattamento con LAC sia in grado di prevenire e/o contenere la liberazione di [3H]D-ASP e di [3H]dopamina causata da esposizione a rotenone e 3-NP. Parallelamente si valuteranno i parametri di funzionalità mitocondriale, di depolarizzazione di membrana e di mobilitazione di Ca^{2+} citosolico sopra enumerati.

OUTPUT DEL PROGRAMMA

Nel corso dell'avanzamento del programma saranno previste 4 relazioni semestrali ed una relazione finale per garantire il conseguimento degli obiettivi intermedi e dell'obiettivo finale raggiunto nel corso del progetto. Alla fine del progetto si prevede la realizzazione di un simposio nel quale i risultati ottenuti saranno presentati dai vari responsabili delle unità operative agli esperti del settore che saranno invitati al suddetto simposio. In tale occasione, si tenterà di coinvolgere anche operatori del SSN nel settore specifico delle patologie ischemiche al fine di ottenere una ricaduta pratica e non solo conoscitiva dei risultati. I dati ottenuti nel corso del progetto verranno anche comunicati alla comunità scientifica mediante la partecipazione a congressi nazionali ed internazionali e la pubblicazione su riviste di alto impatto scientifico.

OBIETTIVI INTERMEDI PREVISTI

Nel primo anno della ricerca per ogni gruppo vi sarà la validazione e la messa a punto dei modelli di danno di eccitotossicità neuronale sperimentale utilizzati con il conseguimento dei primi risultati.

Nel secondo anno della ricerca vi sarà la conferma e l'analisi dei risultati ottenuti con le nuove metodiche messe a punto e del possibile effetto neuroprotettivo dei farmaci utilizzati.

UNITÀ OPERATIVE COINVOLTE

U.O. 1 – Laboratorio di Neurofisiologia (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma) - *Responsabile: Prof. Paolo Calabresi*

U.O. 2 – Laboratorio di Neurofisiologia (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma) - *Responsabile: Dr. Antonio Pisani*

U.O. 3 – Laboratorio di Neurochimica (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma) - *Responsabile: Prof.ssa Maria Teresa Carrì*

U.O. 4 – Laboratorio di Neuroscienze e Psicofarmacologia (Consiglio Nazionale delle Ricerche) - *Responsabile: Dr.ssa Martine Ammassari-Teule*

U.O. 5 – Sezione di Farmacologia DIMES (Università di Genova) - *Responsabile: Prof. Maurizio Raiteri*

Si allega il programma dettagliato delle Unità Operative 1, 2, 3 facenti capo alla Fondazione Santa Lucia IRCCS.

U.O. 1 – Laboratorio di Neurofisiologia

Paolo Calabresi

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGRAMMA

L'elevato rilascio dai terminali corticostriatali glutammatergici di amminoacidi eccitatori gioca un ruolo cruciale nello scatenare quella serie di eventi intracellulari che porta alla morte neuronale in seguito ad ischemia cerebrale nel nucleo striatale. Lo studio verrà condotto utilizzando metodiche di registrazione intracellulare ed extracellulare in tessuto cerebrale di ratto *in vitro*.

Un transitorio episodio ischemico *in vitro* altera le proprietà dei potenziali di campo (field potentials, FPs) registrati. Se tale insulto ischemico si prolunga oltre i 10 minuti tale alterazione diventa irreversibile.

Farmaci che riducono il rilascio di glutammato dai terminali corticostriatali hanno un'azione neuroprotettiva sui potenziali di campo esposti ad una prolungata applicazione ischemica. Anche farmaci utilizzati generalmente in clinica come neuroprotettivi riducono il danno ischemico sui potenziali di campo registrati con tecnica extracellulare.

Nonostante l'azione presinaptica inibitoria sul rilascio di glutammato di questi farmaci, non tutti mostrano una efficace azione neuroprotettiva. Evidentemente l'azione neuroprotettiva del danno ischemico è legata, oltre che al ridotto rilascio di amminoacidi eccitatori, ad una azione dei farmaci sui recettori ionotropici del glutammato (NMDA ed AMPA).

Nella *prima fase* della ricerca analizzeremo se i farmaci antagonisti dei recettori NMDA ed AMPA possano interferire con le alterazioni elettrofisiologiche indotte dalla transitoria ischemia *in vitro* o con le alterazioni elettrofisiologiche e morfologiche indotte dalla ischemia focale *in vivo*.

Nella *seconda fase* della ricerca caratterizzeremo gli effetti della somministrazione di L-acetilcarnitina e di altri composti che agiscono interferendo con il metabolismo energetico mitocondriale (LAC) sul danno elettrofisiologico indotto dalla applicazione di bloccanti del complesso I (rotenone) e II (3-nitropropionico) della catena respiratoria. Tali inibitori mitocondriali verranno applicati nel bagno di perfusione delle fettine corticostriatali durante la registrazione elettrofisiologica di FPs extracellulari corticostriatali.

Analizzeremo dapprima l'entità del danno elettrofisiologico indotto da concentrazioni note di rotenone e 3-nitropropionico applicati per un certo periodo di tempo ed in seguito valuteremo se il pretrattamento con LAC è in grado di interferire significativamente con il danno indotto da tali agenti a carico dei neuroni corticostriatali. Il meccanismo molecolare responsabile dell'eventuale neuroprotezione da LAC verrà indagato mediante l'uso di specifici agenti farmacologici.

METODOLOGIA

Per lo studio verranno utilizzati ratti Wistar maschi di un mese e mezzo circa (tra i 150-250 gr). Le fettine corticostriatali (200-250 μm), ottenute mediante taglio al vibratomo, verranno mantenute prima e durante la registrazione elettrofisiologica in una soluzione ossigenata a temperatura costante. Una singola fettina corticostriatale verrà trasferita nella camera di registrazione e sommersa con soluzione fisiologica, ossigenata costantemente, così composta: (in mM) 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 2.4 CaCl₂, 11 glucosio e 25 NaHCO₃.

Per studiare l'effetto dell'ischemia *in vitro* le fettine verranno deprivate di ossigeno e glucosio. A tale fine il glucosio verrà omissso dalla soluzione fisiologica. Per ottenere la deprivazione di ossigeno la soluzione di perfusione conterrà 95% di azoto e 5% di CO₂. La soluzione ischemica verrà applicata nella camera di registrazione mediante un sistema di rubinetti a tre vie che permetterà la perfusione dell'ischemia alla fettina e il contemporaneo blocco della soluzione fisiologica. L'ischemia *in vitro* verrà applicata, a seconda delle esigenze sperimentali per 5 o 10 min per indurre una riduzione dei FPs reversibile o irreversibile.

Per le registrazioni extracellulari ci avvarremo di elettrodi bipolari riempiti con 2M NaCl e con una resistenza tra i 15-20 MW. L'elettrodo bipolare verrà posto sulle fibre tra corteccia e striato per evocare i potenziali di campo extracellulari (FPs). Verranno studiati diversi parametri di tale evento: ampiezza, area, rise- e decay-time, durata. Le tossine mitocondriali verranno applicate con lo stesso sistema a tre vie utilizzato per l'applicazione dell'ischemia, e verranno somministrate prima o contemporaneamente alla applicazione dei farmaci ad azione neuroprotettiva.

U.O. 2 – Laboratorio di Neurofisiologia

Antonio Pisani

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGRAMMA

La corteccia cerebrale e lo striato sono strutture cerebrali particolarmente vulnerabili all'ischemia. Si riscontra però una vulnerabilità selettiva tra diverse sottopopolazioni neuronali. Infatti, mentre i neuroni spinosi di proiezione dello striato degenerano selettivamente dopo l'insulto ischemico, gli interneuroni colinergici striatali sono resistenti a tale danno.

Utilizzando un modello *in vitro* di ischemia cerebrale indotto da deprivazione combinata di ossigeno e di glucosio (OGD) in fettine corticostriatali di ratto, attraverso un approccio combinato di registrazioni elettrofisiologiche e microfluorimetriche delle variazioni di calcio e sodio, abbiamo caratterizzato le modificazioni dell'attività di singoli neuroni in seguito a deprivazione energetica. Brevi periodi di OGD erano in grado di determinare una depolarizzazione di membrana nei neuroni spinosi ed una iperpolarizzazione di membrana negli interneuroni colinergici; a tali modificazione del potenziale di membrana corrispondeva un'alterazione dell'omeostasi ionica. Inoltre, l'OGD induceva selettivamente nei neuroni spinosi un potenziamento a lungo termine delle risposte sinaptiche all'attivazione dei recettori glutammatergici. Questo processo richiedeva la simultanea attivazione dei recettori glutammatergici metabotropici e ionotropici di tipo NMDA e l'attivazione, attraverso la proteina chinasi C, della via di trasduzione del segnale delle MAP chinasi (mitogen-activated protein kinasi), che porta a nuova sintesi proteica.

Per valutare gli eventuali effetti neuroprotettivi della L-acetilcarnitina (LAC) sulle risposte neuronali all'ischemia, verranno effettuate registrazioni elettrofisiologiche intracellulari da singoli neuroni. Sarà studiato l'effetto della somministrazione acuta di concentrazioni note di LAC nella soluzione di perfusione, valutando gli eventuali cambiamenti delle proprietà di membrana dei neuroni registrati (potenziale di riposo, potenziale d'azione, resistenza d'ingresso). Quindi verranno analizzate le modificazioni elettrofisiologiche (potenziale di membrana e ampiezza del potenziale sinaptico) indotte da OGD in presenza di concentrazioni note di LAC. L'eventuale efficacia di LAC nel prevenire le alterazioni indotte da deprivazione di ossigeno e glucosio verrà studiata con agenti farmacologici in grado di rivelare il meccanismo ionico e /o recettoriale alla base dell'effetto di LAC.

METODOLOGIA

Vengono utilizzati ratti maschi del ceppo Wistar. Dopo il sacrificio, da blocchi di tessuto cerebrale vengono tagliate con un vibratomo le fette coronali corticostriatali (200-300 μ m). Una fetta viene trasferita alla camera di registrazione, dove è immersa in una soluzione di Krebs (2-3 ml/min)

gassata con una miscela 95% O₂ - 5% CO₂ e mantenuta a temperatura costante (32-33°C). La composizione della soluzione di Krebs è (mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 Na₂HPO₄, 2.4 CaCl₂, 10 glucosio, 22 NaHCO₃. La soluzione ischemica è ottenuta sostituendo il glucosio con 3.42 g/l saccarosio e gassandola con una miscela 95% N₂ - 5% CO₂.

Per le registrazioni elettrofisiologiche intracellulari in modalità di current-clamp vengono utilizzati microelettrodi sharp riempiti con 2M KCl (40-60 MΩ) e un amplificatore Axoclamp-2A.

I dati vengono acquisiti e memorizzati tramite il software pClamp9 per la successiva analisi, e analizzati statisticamente con il test del t di Student.

U.O. 3 – Laboratorio di Neurochimica

Maria Teresa Carri

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGRAMMA

L'effetto deleterio della formazione di ROS nel mitocondrio viene evitato, in larga parte da un complesso sistema antiossidante, che vede come attori principali enzimi come la Cu,Zn superossido dismutasi (SOD1) localizzata nel citoplasma e nello spazio intermembrane mitocondriali, la MnSOD (SOD2) presente nella matrice mitocondriale ed una serie di isoforme di glutatione per ossidasi citoplasmatiche e mitocondriali.

In un recente lavoro è stata dimostrata la capacità della SOD1 di interagire con Bcl-2 (Pasinelli P. et al. (2004) *Neuron* 43: 19-30), proteina chiave nella regolazione dei processi apoptotici, ed il ruolo protettivo della SOD1 nei confronti di danni apoptotici è stato ampiamente dimostrato in diversi modelli di ratto e murini di ischemia (Fujimura M. et al. (2000) *J Neurosci* 20: 2817-2824; Sugawara T. et al. (2002) *J Neurosci* 22: 209-217).

Obiettivo di questa U.O. è di studiare la funzionalità mitocondriale in sistemi cellulari (neuroblastoma e glioblastomi umani; motoneuroni murini; culture primarie di midollo spinale murino) in cui sia modulato il contenuto di enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, catalasi) e di molecole antiossidanti a basso peso molecolare (ad es. glutatione).

Valuteremo in particolare il contributo della SOD1 nel proteggere il metabolismo mitocondriale da insulti ossidativi e non ossidativi di diverso genere (ad es. ossido nitrico, interleuchine infiammatorie tipo TNF-alfa, IL-1beta, IFN-gamma) inducendo l'espressione della SOD1 in tutta la cellula, nello spazio intermembrana del mitocondrio o nella matrice mitocondriale. In tale ambito i parametri mitocondriali esaminati saranno: il potenziale di membrana, la produzione di ATP, marker di stress ossidativo come la produzione di proteine carbonilate e disequilibri del rapporto glutatione ridotto/ossidato (GSH/GSSG). Nei diversi paradigmi sperimentali sopra citati verrà quantificata l'espressione e l'attività della SOD2 mitocondriale, enzima inducibile da stimoli redox, la cui regolazione trascrizionale dipende da NF-kappaB. Tale fattore di trascrizione, il cui ruolo nelle neurodegenerazioni è discusso (Casciati A. et al. (2002) *J Neurochem* 83: 1019-1029), risponde a sua volta a stimoli redox e viene attivato specificamente da diverse interleuchine infiammatorie.

Inoltre, alla luce delle relazioni che intercorrono tra SOD1 e la proteina antiapoptica Bcl-2, sarà esaminato nei sistemi cellulari a disposizione sottoposti a diversi stimoli, il rilascio del citocromo c da parte del mitocondrio e le relazioni tra l'attivazione di questo segnale apoptotico e la capacità protettiva della SOD. Parallelamente alla SOD1 wild type utilizzeremo SOD1 mutate correlate con una forma familiare di sclerosi laterale amiotrofica (fALS) come modello di stimolo tossico. Tali mutanti presentano, infatti, caratteristiche pro-apoptotiche e pro-ossidanti, e si accumulano nello spazio intermembrana del mitocondrio nel midollo spinale di modelli murini di fALS ed in pazienti (Liu J. et al. (2004) *Neuron* 43: 5-17).

Infine saranno utilizzati composti antiossidanti a tropismo mitocondriale, tentando di intercettare i danni ossidativi a carico del mitocondrio indotti dagli stimoli sopra menzionati, allo scopo di validare l'uso di tali composti in patologie da insulto ossidativo. Particolare attenzione sarà rivolta all'utilizzo dell'l-acetilcarnitina (che possiede attività di scavenger dei ROS ed è in grado di modulare l'attività dei complessi della catena di trasporto degli elettroni (Calvani M. et al. (1992) *Ann NY Acad Sci* 663: 483-486; Tagliatela G. et al. (1994) *Exp Gerontol* 2955-2966).

METODOLOGIA

Campioni biologici e sistemi di espressione eucariotica - Sistemi cellulari (neuroblastoma SH-SY5Y e glioblastomi umani U373; motoneuroni murini NSC34). Le cellule verranno trasfettate in modo transiente e stabile con plasmidi derivati da pRC/CMV e codificanti la SOD1. Inoltre verrà utilizzato un sistema di espressione inducibile delle SOD1, in cui la trascrizione dell'enzima è regolata da un promotore inducibile del tipo TET-on. Infine le SOD1 wild-type e fALS verranno veicolate nello spazio intermembrana del mitocondrio mettendo in fusione il cDNA codificante la proteina con la sequenza consenso per lo spazio intermembrana mitocondriale propria del citocromo c. Le SOD1 inserite in tali plasmidi saranno provviste di opportuni tags tipo myc e GFP per agevolare la citolocalizzazione e facilitare eventuali esperimenti di immunoprecipitazione.

Colture primarie di midollo spinale da embrioni murini (E-14), wild-type e transgenici per la SOD1, verranno utilizzati per validare i modelli neurotossici cellulari.

Parametri di tossicità mitocondriale - Verranno utilizzati probes fluorescenti come la diidrotidina in grado di rilevare la presenza di superossido a livello mitocondriale in cellule intere, nelle stesse utilizzeremo il composto fluorescente TMRE in grado di quantizzare lo stato di polarizzazione della membrana mitocondriale. La misura del rapporto GSH/GSSG e lo stato di ossidazione proteica verranno effettuate su mitocondri purificati in gradiente di saccarosio dopo rottura delle cellule per omogenizzazione e frazionamento per centrifugazione. Le concentrazioni di glutatione saranno valutate tramite tecniche di HPLC, dopo aver derivatizzato i campioni con reattivo di Sanger (dinitrofluorobenzene). Lo stato di carbonilazione delle proteine mitocondriali verrà valutato quantitativamente derivatizzando i campioni con 2,4 dinitrofenilidrazina (DNPH) e rilevando la presenza del DNP covalentemente legato ai gruppi carbonile delle proteine tramite western blot ed anticorpo specifico.

Dosaggi enzimatici - Le attività delle SOD1 e SOD2 verranno misurate tramite tecniche spettrofotometriche. Specificamente l'attività della SOD2 verrà misurata dopo aver trattato il campione con KCN con lo scopo di inibire direttamente il rame catalitico della SOD1.

Microscopia confocale - Il rilascio del citocromo c verrà visualizzato tramite tecniche di immunolocalizzazione in fluorescenza utilizzando anticorpi primari specifici.

**MALATTIE NEURODEGENERATIVE LEGATE
ALL'INVECCHIAMENTO: DALLA PATOGENESI
ALLE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE
PER UN PROGETTO TRASLAZIONALE**

NICOLA BIAGIO MERCURI
Università di Roma Tor Vergata – IRCCS S. Lucia

OBIETTIVO PRINCIPALE DEL PROGETTO

Identificazione dei meccanismi di funzionamento cellulare del farmaco memantina e valutazione degli effetti della memantina su parametri neuropsicologici e morfofunzionali cerebrali in soggetti affetti da demenza susseguente a malattie neurodegenerative.

Sintesi delle conoscenze disponibili sull'argomento

Le malattie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer e di Huntington sono caratterizzate da una morte progressiva cellulare che porta ad uno spopolamento neuronale ed ad una riduzione delle connessioni sinaptiche infraneuronali. Queste alterazioni sono responsabili di devastanti sintomi neuropsicologici e neurologici.

La memoria e le capacità di giudizio sono distrutte. I pazienti hanno disturbi nel ricordare, nel vestirsi, nel mangiare, in tutte le attività della vita di relazione e necessitano di continua assistenza.

Indubbiamente, prima che occorran i disturbi conclamati della malattia neurodegenerativa, e prima che si stabiliscano alterazioni strutturali, alcune precoci disfunzioni delle funzioni plastiche sinaptiche e del contenuto ionico intracellulare possono sostenere i sintomi precoci della malattia ed il proseguimento dei fenomeni neurodegenerativi. Pertanto, gli approcci terapeutici devono essere indirizzati alla correzione dei disturbi funzionali ed all'attivazione di meccanismi di compenso.

Tutt'oggi, le terapie disponibili nel trattare il morbo di Alzheimer ed il morbo di Huntington sono di preferenza sintomatiche. I deficit mnesici e cognitivi sono attenuati da un trattamento con anticolinesterasici, mentre le allucinazioni, l'agitazione e le ipercinesie motorie dell'Huntington sono attenuati da antagonisti dopaminergici. Un trattamento, che oltre a curare i sintomi, possa ridurre la progressione della malattia neurodegenerativa non è ancora disponibile. Si è recentemente ipotizzato che la memantina possa, oltre a diminuire i sintomi, svolgere un ruolo positivo nel rallentare la progressione della malattia neurodegenerativa. Tale sostanza sembra ottimizzare le funzioni del recettore per il glutammato di tipo NMDA, la cui eccessiva funzione potrebbe causare problemi nei meccanismi cellulari alla base della memoria e nell'innescare di degenerazione cellulare.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre?

Il nostro progetto si propone di capire meglio i processi neurodegenerativi e di stabilire i meccanismi cellulari alla base dell'efficacia della memantina nel trattare la malattia neurodegenerativa. Si propone inoltre, di identificare alcuni parametri di efficacia clinica del farmaco (azione sui sintomi psicologici e comportamentali, selezione genetica dei pazienti sensibili al trattamento, valutazione morfo-funzionale di efficacia).

Obiettivi, criteri di valutazione e risultati intermedi

Il programma si prefigge in una prima fase di mettere a punto le metodologie e di normalizzarle in relazione al susseguente studio da svolgere per valutare poi l'azione del farmaco (memantina).

METODOLOGIA

L'approccio integrato biologico e clinico allo studio del problema ci permette l'utilizzo di differenti metodologie che vengono così descritte in relazione al lavoro delle differenti unità.

L'U.O. 1 (prof. Mercuri) condurrà esperimenti elettrofisiologici su preparati slice di corteccia e di ippocampo mantenute in soluzione fisiologica. Eseguirà registrazioni elettrofisiologiche con la tecnica del patch clamp, in configurazione whole cell associate a microfluorimetria. Le misurazioni di $[Na^+]$ e $[Ca^{2+}]$ intracellulare verranno ottenute dializzando la cellula registrata rispettivamente con SBFI o Fura-2.

L'U.O. 2 (prof. Calabresi) condurrà esperimenti elettrofisiologici su preparati slice corticostriatali su cui eseguirà registrazioni elettrofisiologiche extracellulari associate a stimolazioni sinaptiche della via corticostriatale. La caratterizzazione elettrofisiologica sarà associata all'identificazione morfologica dei due sottotipi neuronali striatali attraverso l'uso della tecnica della microscopia ad infrarosso.

L'U.O. 3 (Dr. Popoli) eseguirà studi comportamentali valutando la coordinazione motoria tramite Rota-rod, l'attività locomotoria tramite activity meters, e le risposte emozionali tramite il test dell'open field. L'apprendimento spaziale sarà misurato tramite labirinto ad acqua di Morris. L'esplorazione e la capacità di discriminazione di nuovi oggetti saranno valutate tramite il test dell'object recognition. Eseguirà anche studi di microdialisi con sonde appropriate poste nell'area cerebrale di interesse e successiva analisi in HPLC. Inoltre eseguirà studi elettrofisiologici da fettine corticostriatali, misurando le risposte sinaptiche con tecniche extracellulari.

L'U.O. 4 (Dr. Spalletta) recluterà 40 soggetti con diagnosi di malattia di Alzheimer (AD), correlando il decadimento cognitivo e l'espressione comportamentale e funzionale durante il decorso di malattia. Parallelamente, verrà valutata *in vitro*, mediante approcci diversi, la capacità di risposta apoptotica da parte di cellule prelevate dai pazienti all'esordio della malattia e nel follow-up in seguito a trattamento con memantina.

L'U.O. 5 (Dr. Orlacchio) studierà e caratterizzerà geneticamente forme sporadiche e familiari di AD acquisendo nuovi campioni di sangue o prelievi bioptici cutanei da rendere disponibili per analisi genetiche. I campioni di sangue permetteranno l'estrazione di DNA e RNA, mentre i prelievi bioptici permetteranno lo stabilimento di colture di cellule fibroblastiche dai suddetti soggetti. Verrà poi eseguita una analisi di variazioni nucleotidiche nei geni

delle preseniline. Proseguirà poi con una analisi mutazionale del gene APP e del genotipo dell'APOE. Infine procederà con studi di associazione, mediante amplificazione di DNA genomico con PCR utilizzando primers specifici. Il prodotto PCR verrà poi analizzato mediante analisi RFLP. Tali studi verranno effettuati su due polimorfismi genetici previamente identificati nel gene GR1N1 per vedere se siano associati o meno ad una risposta terapeutica di pazienti con AD trattati con memantina.

L'U.O. 6 (Dr. Frisoni) effettuerà un esame di RM su pazienti comprendendo sequenze 3D pesate in T1 (per valutare l'atrofia regionale), sequenze pesate in T2 e sequenze FLAIR (per valutare la sofferenza vascolare), sequenze DTI e MTI (per studiare le modificazioni della sostanza bianca), e un esame di risonanza magnetica funzionale (per valutare l'eventuale effetto farmacologico sulla funzione cerebrale). Sulle immagini RM acquisite al baseline e al follow-up, verranno effettuate misurazioni di volumetria globale e lobare, di volumetria delle strutture temporali-mesiali (ippocampo e amigdala), verrà giudicato il grado di atrofia globale e temporale mesiale, verrà valutato il carico vascolare e sarà calcolato il coefficiente di diffusione e del rapporto di trasferimento di magnetizzazione su immagini DTI e MTI.

TRASFERIBILITÀ DEI RISULTATI E DEI PRODOTTI

Le informazioni derivanti dalle tematiche svolte dal nostro progetto saranno oggetto d'interesse da parte della comunità scientifica nazionale ed internazionale e di istituti dove si svolge prevalentemente ricerca clinica. Attraverso l'utilizzo di convegni, scambi scientifici e pubblicazioni saranno informati i centri di ricerca sui meccanismi d'azione della memantina. In particolare si otterranno dei dati sulla capacità del farmaco d'influenzare i contenuti ionici di calcio e sodio intraneuronali, la plasticità della trasmissione sinaptica e in un modello animale di Huntington alcuni aspetti della neurodegenerazione. Le informazioni cliniche sulla efficacia sui sintomi basate sull'analisi, neuropsicologica, morfofunzionale e genetica saranno comunicate alla comunità scientifica e potranno essere utilizzate nel contesto di studi e protocolli terapeutici. Lo sviluppo di terapie efficaci nella neurodegenerazione potrebbe aiutare una notevole fetta della popolazione, rivestendo quindi importanza oltre che nell'ambito sanitario anche in quello sociale.

Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

Il nostro progetto per definizione è un progetto traslazionale. Dunque, esso si basa sull'aggregazione di gruppi leaders nei rispettivi settori, per esaminare, con metodiche ed approcci differenti, l'azione della memantina in processi cellulari e neurodegenerativi.

Questo progetto è basato sull'idea che l'unione di ricercatori di base

(orientati clinicamente) e ricercatori clinici possa avere un valore aggiunto nell'analisi dell'azione di sostanze e di farmaci. Un'attenta disamina degli effetti cellulari della memantina potrebbe aiutare ad ottenere un migliore utilizzo clinico del farmaco e suggerire ulteriori impieghi terapeutici che possano limitare il progressivo andamento della malattia neurodegenerativa. Inoltre, se si esamina l'attività del farmaco nei diversi modelli cellulari, è possibile ipotizzare e programmare modalità di trattamento sinergico dei sintomi della demenza anche con altri farmaci dati in associazione.

ARTICOLAZIONE DEL PROGRAMMA

Il nostro progetto è articolato con contributi originali di ricerca sia di base che clinica. Solamente da un'integrata interazione delle informazioni provenienti da unità di ricerca pura e di ricerca clinica si può sperare di raggiungere traguardi innovativi sulla fisiopatologia e terapia dei disturbi cognitivi conseguenti a neurodegenerazione. Nei laboratori di ricerca di base ci si propone di esaminare l'attività del farmaco memantina a livello di singole cellule del sistema nervoso ed in modelli animali di malattie degenerative (topi transgenici R6/2). Nelle unità cliniche ci si propone di valutare l'efficacia del composto memantina su items che valutano i sintomi psicologici e comportamentali (BPSD) e le attività funzionali della vita quotidiana in pazienti affetti da disturbi cognitivi. L'attività del farmaco sarà inoltre valutata su popolazioni di pazienti selezionati geneticamente e utilizzando parametri morfo-funzionali cerebrali (risonanza magnetica funzionale, RMN). In particolare:

U.O. 1 (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma)

L'unità si propone di determinare la dinamica dei flussi ionici intracellulari dopo stimolazione recettoriale glutammatergica e le loro variazioni imposte dalla memantina ed altri farmaci glutammato antagonisti.

U.O. 2 (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma)

L'unità utilizzerà fenomeni di memoria sinaptica (LTD-LTD cortico striatale) per valutare la plasticità NMDA dipendente ed il ruolo della memantina ed altri farmaci NMDA antagonisti.

U.O. 3 (Istituto Superiore di Sanità, Roma)

L'unità esaminerà i possibili effetti neuroprotettivi della memantina in modelli sperimentali *in vivo* di Corea di Huntington (Huntington Disease, HD). L'analisi del possibile meccanismo d'azione della memantina (inibizione dell'eccessiva attivazione del recettore NMDA) lascia prevedere che questo farmaco possa costituire un valido approccio neuroprotettivo all'HD. Queste informazioni precliniche avranno valore nella comprensione ed integrazioni di fenomeni plastici sinaptici e nella comprensione di susseguenti fenomeni neurodegenerativi.

U.O. 4 (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma)

L'unità esaminerà l'efficacia dell'antagonista dei recettori NMDA memantina nel trattamento della Malattia di Alzheimer, in termini di valutazione dei sintomi psicologici e comportamentali (BPSD) e delle attività funzionali della vita quotidiana e della loro relazione con il deficit cognitivo, in associazione allo studio dei meccanismi apoptotici coinvolti nella morte neuronale e della loro relazione con l'accumulo di beta-amiloide.

U.O. 5 (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma)

L'unità valuterà se due polimorfismi genetici previamente identificati nel gene GRIN1 siano associati o meno ad una risposta terapeutica di pazienti con AD trattati con memantina. Valuterà inoltre come variazioni genetiche possano influenzare l'andamento clinico della malattia neurodegenerativa.

U.O. 6 (IRCCS Centro S. Giovanni di Dio - FBF, Brescia)

L'unità utilizzerà la risonanza magnetica (RM) cerebrale per studiare la sofferenza vascolare con sequenze FLAIR, T2 e DP e l'atrofia regionale con sequenze volumetriche pesate in T1. Queste variabili rappresentano potenziali predittori della risposta al trattamento farmacologico.

OUTPUT DEL PROGRAMMA

La terapia corrente dei disturbi cognitivi si basa sul potenziamento della trasmissione colinergica nel sistema nervoso centrale. Nella malattia di Alzheimer i livelli del trasmettitore sono diminuiti ed un aumento di acetilcolina dopo trattamento farmacologico sicuramente aiuta la memoria e la coscienza. Il disturbo cognitivo della malattia di Huntington non è curabile.

Basandoci su queste promesse ci auguriamo che il nostro studio ci fornisca nuove idee per controllare e prevenire i deficit cognitivi della malattia di Alzheimer e Huntington. Inoltre, esso valuterà, in maniera più controllata, l'efficacia clinica della memantina su pazienti Alzheimer selezionati geneticamente ed esaminando parametri neuropsicologici e morfo-funzionali.

OBIETTIVI INTERMEDI PREVISTI

Il programma si prefigge in una prima fase di mettere a punto le metodologie e di normalizzarle in relazione al susseguente studio da svolgere per valutare poi l'azione del farmaco (memantine).

UNITÀ OPERATIVE COINVOLTE

U.O. 1 – Laboratorio di Neurologia Sperimentale (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma) - *Responsabile: Dr. Nicola Biagio Mercuri*

U.O. 2 – Laboratorio di Neurofisiologia (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma) - *Responsabile: Prof. Paolo Calabresi*

U.O. 3 – Dipartimento del Farmaco (Istituto Superiore di Sanità, Roma) - *Responsabile: Dr.ssa Patrizia Popoli*

U.O. 4 – Laboratorio di Neuropsichiatria (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma) - *Responsabile: Dr. Gianfranco Spalletta*

U.O. 5 – Laboratorio di Neurogenetica (Fondazione Santa Lucia IRCCS, Roma) - *Responsabile: Dr. Antonio Orlacchio*

U.O. 6 – Laboratorio di Epidemiologia, neuroimaging e telemedicina (IRCCS Centro S. Giovanni di Dio - FBF, Brescia) - *Responsabile: Dr. Giovanni Frisoni*

Si allega il programma dettagliato delle Unità Operative 1, 2, 4, 5 facenti capo alla Fondazione Santa Lucia IRCCS.

U.O. 1 – Laboratorio di Neurologia sperimentale Nicola Biagio Mercuri

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGRAMMA

La memantina è un farmaco usato in ambito clinico soprattutto per il trattamento farmacologico di pazienti affetti da decadimento cognitivo lieve (mild cognitive impairment) e Malattia di Alzheimer (AD), da sola o in combinazione con farmaci anticolinesterasici. Il suo meccanismo di azione è strettamente correlato al ruolo fisiologico e patologico della trasmissione glutamatergica, in quanto il suo sito d'azione risiede a livello del recettore glutamatergico di tipo NMDA, determinandone un blocco di tipo non-competitivo. È noto come il recettore NMDA giochi un ruolo chiave nell'inscasso di modificazioni a lungo termine nell'efficacia delle sinapsi glutammatergiche, che si ritiene siano alla base di fenomeni di apprendimento e memoria tipici delle funzioni superiori del Sistema Nervoso Centrale. Queste modificazioni plastiche, identificate col termine di "potenziamento a lungo termine" (LTP), sono innescate a seguito di depolarizzazioni rapide della membrana postsinaptica, concomitanti ad attività presinaptica ad alta frequenza ed hanno come meccanismo d'inscasso fondamentale l'ingresso di ioni calcio attraverso il recettore NMDA durante queste ampie e transienti depolarizzazioni. Si ipotizza che una modifica del contenuto ionico intracellulare di calcio possa innescare fenomeni enzimatici e induzioni geniche regolanti l'efficacia della trasmissione sinaptica. Riveste quindi un ruolo importante la comprensione delle dinamiche dei cambiamenti omeostatici del sodio e del calcio intracellulare durante la stimolazione postsinaptica dei recettori glutammatergici.

In questo progetto ci proponiamo di effettuare esperimenti di registrazione in modo patch-clamp da neuroni piramidali della corteccia cerebrale e ippocampale. Valuteremo, con tecniche microfluorimetriche associate alle registrazioni elettrofisiologiche il contenuto degli ioni calcio e sodio in condizioni basali e dopo stimolazione dei recettori glutammatergici di tipo NMDA e metabotropico. Allo stesso tempo studieremo i cambiamenti di potenziale e/o le correnti indotte dagli agonisti del glutammato (NMDA e mGluR). Valuteremo poi le modifiche intracellulari di calcio e sodio dopo stimolazione sinaptica.

In una seconda fase studieremo se le dinamiche degli ioni intracellulari in neuroni corticali ed ippocampali vengano modificate dall'esposizione con memantina. Valuteremo poi come questa sostanza modifichi la cinetica del calcio e sodio intracellulare dopo stimolazione dei recettori glutammatergici ottenuta con agonisti selettivi e/o con stimolazione delle fibre glutammatergiche afferenti. I dati ottenuti con la memantina verranno comparati con l'eventuale effetto sul contenuto di calcio e sodio da parte di sostanze antagoniste di subunità specifiche dei recettori NMDA (ifenprodil, Ro 25-6981).

Se dal nostro studio emergerà un chiaro effetto regolatorio della memantina sul contenuto di calcio e sodio intracellulare neuronale potrebbe

anche essere ulteriormente avvalorato il suo utilizzo clinico come farmaco neuroprotettivo nella malattia di Alzheimer caratterizzata da un progressivo spopolamento neuronale e sinaptico a livello della corteccia cerebrale.

METODOLOGIA

Gli esperimenti saranno condotti su preparati slice di corteccia e di ippocampo. Gli animali saranno anestetizzati con alotano e sacrificati per decapitazione, dopodiché il cervello verrà rimosso dal cranio al fine di ottenere fettine (slice) dello spessore di 0.25-0.30 mm, mediante un vibratomo. Le slice verranno mantenute in soluzione fisiologica (ACSF) a 33.5°C, contenente (in mM): NaCl 126; KCl 2.5; MgCl₂ 1.2; CaCl₂ 2.4; NaH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 19; glucosio 10; saturata con soluzione carbogen (95% O₂ - 5% CO₂).

Registrazioni in patch clamp - Le fettine verranno successivamente messe in una cameretta di perfusione posta sopra ad un microscopio ottico, provvisto di sistema di visualizzazione dei neuroni all'infrarosso e videocamera per microfluorimetria. Le registrazioni elettrofisiologiche verranno condotte con la tecnica del patch clamp, in configurazione whole cell, mediante elettrodi di vetro riempiti con (in mM): K-Gluconato 150; MgCl₂ 2; CaCl₂ 0.1; EGTA 0.75; Fura-2 (o SBFI) 0.25; HEPES 10; ATP 2; GTP 0.3 (pH 7.3, con KOH). Le correnti verranno acquisite mediante un amplificatore Axopatch 1D (Axon Instruments), filtrate a 1 kHz, digitalizzate (10 kHz) e analizzate al computer utilizzando il software pClamp (Axon Instruments).

Microfluorimetria - Le misurazioni di [Na⁺] e [Ca²⁺] intracellulare verranno ottenute dializzando la cellula registrata rispettivamente con SBFI o Fura-2 (Molecular Probes). Questi marcanti fluorescenti saranno dissolti ad una concentrazione finale di 0.25 mM nella soluzione di riempimento dell'elettrodo registrante sopra descritta. La loro eccitazione si realizzerà attraverso luce UV emessa da una lampada Xenon 75 W, filtrata a 340 e 380 nm. La luce emessa sarà monitorata con un filtro a 500 nm e detettata mediante una camera CCD. Ogni valore di fluorescenza verrà da una regione di interesse comprendente il corpo cellulare del neurone registrato e rapportando le immagini ottenute alle due lunghezze d'onda e corrette per la fluorescenza di background, rilevata da regioni prive di marcante fluorescente. I valori ottenuti potranno essere trasformati in valori di concentrazione effettiva utilizzando il metodo di Grynkiewicz. I parametri di calibrazione R_{min} e R_{max} relativi ai valori ottenuti con SFBI o Fura-2 saranno ottenuti perfondendo cellule perforate in soluzioni prive di sodio o di calcio (per R_{min}) o in soluzioni 140 mM di Na⁺ o 1 mM di Ca²⁺ (per R_{max}). I valori apparenti di K_d per Fura-2 potranno essere stimati misurando i rapporti di fluorescenza ottenuti in soluzioni con Fura-2 e concentrazioni crescenti di Ca²⁺. Similmente, la stima del K_d dell'SBFI verrà ottenuta con una soluzione di calibrazione contenente 1 mM EGTA, 0.1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 0-145 mM NaCl e 145-0 mM K-gluconato ([Na⁺] + [K⁺] = 145 mM, pH 7.4).

U.O. 2 – Laboratorio di Neurofisiologia

Paolo Calabresi

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGRAMMA

Evidenze cliniche e sperimentali mostrano un importante coinvolgimento dello striato dorsale e ventrale nei processi cognitivi che portano all'apprendimento e alla memoria (Isacson et al., 2002). Le alterazioni della funzionalità sinaptica neuronale portano all'alterazione a lungo termine della trasmissione sinaptica, (plasticità sinaptica) che rappresenta la base dell'apprendimento e della memoria a livello cellulare.

Lo scopo di questa U.O. sarà lo studio della plasticità sinaptica dei neuroni spinosi GABAergici di proiezione e dei grandi interneuroni colinergici attraverso l'uso di registrazioni elettrofisiologiche intra ed extracellulari.

In particolare, nella prima parte della ricerca studieremo le possibili modificazioni indotte dalla memantina, antagonista dei recettori NMDA, sull'induzione ed il mantenimento del potenziamento a lungo termine (LTP) nei due differenti sottotipi neuronali striatali. Studieremo, in modo particolare, se la memantina sia in grado di modificare l'ampiezza della depolarizzazione di membrana indotta durante la stimolazione tetanica ad alta frequenza (HFS) delle vie corticostriatali. Questo studio ci permetterà di analizzare il possibile effetto di questo farmaco sui recettori NMDA sinaptici attivati durante il rilascio endogeno di glutammato causato dalla stimolazione sinaptica ripetuta.

Nella seconda fase della ricerca, per meglio comprendere la funzione di specifiche subunità del recettore NMDA nel danno eccitotossico, confronteremo l'effetto sulla plasticità sinaptica della memantina con quello dell'ifenprodil, uno specifico inibitore della subunità NR2B del recettore NMDA.

Infine, l'Unità Operativa studierà l'effetto dei due farmaci sulla depolarizzazione indotta dall'applicazione di glutammato ed NMDA esogeni, in entrambi i sottotipi neuronali, per misurare le possibili modificazioni indotte da questi due differenti antagonisti sui recettori NMDA localizzati a livello extrasinaptico.

METODOLOGIA

Per lo studio verranno utilizzati ratti Wistar maschi di un mese e mezzo circa (tra i 150-250 gr). Le fettine corticostriatali (200-250 μm), ottenute mediante taglio al vibratomo, verranno mantenute prima e durante la registrazione elettrofisiologica in una soluzione fisiologica ossigenata a temperatura costante.

Per le *registrazioni extracellulari* ci avvarremo di elettrodi bipolari riempiti con 2M NaCl, mentre per quelle intracellulari gli elettrodi saranno riempiti con 2M KCl.

Per la *stimolazione sinaptica* delle fibre corticostriatali utilizzeremo elettrodi bipolari localizzati al limite tra corteccia e striato.

Per le *registrazioni elettrofisiologiche* ci avvarremo dell'uso di amplificatori Axon Axoclamp 2B, e le registrazioni verranno acquisite, registrate ed analizzate on line e off line mediante l'Axon pClamp 9.

Il magnesio verrà oMESSO dal mezzo di perfusione per meglio attivare la componente sinaptica NMDA-mediata. In queste condizioni sperimentali una stimolazione ad alta frequenza (HFS) delle fibre corticostriatali sarà in grado di indurre LTP (Calabresi et al., 1992). La caratterizzazione elettrofisiologica sarà associata all'identificazione morfologica dei due sottotipi neuronali striatali attraverso l'uso della tecnica della microscopia ad infrarosso.

U.O. 4 – Laboratorio di Neuropsichiatria

Gianfranco Spalletta

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGRAMMA

L'unità operativa si occuperà di valutare l'efficacia dell'antagonista dei recettori NMDA memantina nel trattamento della Malattia di Alzheimer (AD), in termini di valutazione dei sintomi psicologici e comportamentali (BPSD) e delle attività funzionali della vita quotidiana e della loro relazione con il deficit cognitivo, in associazione allo studio dei meccanismi apoptotici coinvolti nella morte neuronale e della loro relazione con l'accumulo di beta-amiloide. Nonostante venga riconosciuto universalmente che i BPSD siano manifestazioni cliniche quasi invariabilmente presenti nei pazienti con demenza, essi non vengono quasi del tutto presi in considerazione dai criteri diagnostici proposti dalle varie associazioni e dai vari manuali diagnostici e statistici. In particolare, l'unico BPSD che è considerato nella procedura di valutazione diagnostica di demenza è l'allucinazione visiva ma questo accade limitatamente alla demenza con corpi di Lewy. Attualmente, in base ai numerosi studi clinici e preclinici condotti su questo tema, si tende a considerare la patogenesi della AD, la cui espressione clinica è eterogenea, come un processo polifattoriale in cui diversi meccanismi possono contribuire alla morte neuronale e alla neurodegenerazione.

Le regioni cerebrali coinvolte nell'apprendimento e nella memoria sono quelle che mostrano il più alto grado di atrofia e di attivazione delle cellule gliali, e sono quelle che verosimilmente maggiormente subiscono l'accumulo di beta-amiloide e i processi di morte neuronale. Inoltre, alcune evidenze sperimentali indicano che un'eccessiva stimolazione dei recettori NMDA può portare a morte neuronale ed essere coinvolta nella neurodegenerazione. Questi risultati, congiuntamente con l'osservazione che la memantina, antagonista non-competitivo dei recettori NMDA, sia in grado di ridurre il deterioramento cognitivo nei pazienti con AD in quanto possiede un'attività neuroprotettiva anche verso la degenerazione neuronale indotta da amiloide-beta, fanno ipotizzare che possa esistere una connessione fra attività del farmaco e inibizione della morte neuronale. Benché la morte cellulare che avviene a livello cerebrale nei malati di AD sia riconducibile a fenomeni apoptotici e molteplici siano le conoscenze sui meccanismi che caratterizzano l'apoptosi stessa, rimane molto da chiarire circa le relazioni che esistono fra sintomatologia clinica e fenomeno biologico.

METODOLOGIA

Lo scopo della presente ricerca è quello di valutare l'efficacia della memantina sui BPSD e sulle attività funzionali della vita quotidiana, congiuntamente all'analisi di alcuni meccanismi biologici che portano a

morte cellulare per verificare l'esistenza di una correlazione fra questo tipo di sintomatologia e alterazioni del processo apoptotico. In questo progetto verranno reclutati 40 soggetti con diagnosi di AD.

La *misurazione della dimensione neuropsicologica* in associazione a quella comportamentale e funzionale potrà permettere la correlazione tra decadimento cognitivo ed espressione comportamentale e funzionale durante il decorso di malattia.

L'*osservazione naturalistica* dei trattamenti psicofarmacologici utilizzati (neurolettici, antidepressivi, ansiolitici, stabilizzanti dell'umore, ecc.) sarà indice di necessità da parte dei clinici di controllo dei BPSD.

Parallelamente, verrà valutata *in vitro*, mediante approcci diversi, la *capacità di risposta apoptotica* (potrà essere misurata l'attività caspatica e l'espressione di molecole anti-apoptotiche) da parte di cellule prelevate dai pazienti all'esordio della malattia e nel follow-up in seguito a trattamento con memantina.

In ultima analisi, questo protocollo consentirà anche di associare eventuali resistenze al farmaco ad anomalie del processo apoptotico, fornendo importanti informazioni sui meccanismi d'azione della memantina con implicazioni utili per approfondire la conoscenza dei meccanismi patogenetici nella AD.

I *criteri di inclusione* sono: diagnosi di AD probabile individuata con i criteri sia del NINCDS-ADRDA; soggetti all'esordio di malattia di Alzheimer mai trattati farmacologicamente; punteggio del MMSE < 26 e >16; valori di laboratorio nei limiti della norma o considerati come clinicamente insignificanti dal ricercatore. Una CT o MRI deve essere stata effettuata negli ultimi 12 mesi per escludere una componente vascolare significativa.

I *criteri di esclusione* sono: mancanza di un caregiver affidabile; malattie mediche maggiori; comorbidità di malattie psichiatriche primarie o altre malattie neurologiche; evidenze al CT o MRI di anomalie parenchimali; indice di Hachinski < 4.

I pazienti inclusi effettueranno una valutazione diagnostica di depressione nell'AD, psicosi nell'AD ed apatia nell'AD e psico-comportamentale con una batteria di test comprendente: Neuropsychiatric Inventory (NPI); Cornell Depression Scale; CERAD Disforia; Dementia Apathy Interview Rating (DAIR); Indice di Hachinski; Clinical Global Impression (CGI). Inoltre, il paziente verrà valutato con il Mini Mental State Examination (MMSE), con la batteria neuropsicologica Mental Deterioration Battery (MDB) e con i test per le ADL e IADL. Se la valutazione diagnostica e cognitiva avrà dato esito positivo il paziente verrà segnalato per il trattamento.

Il trattamento dei pazienti verrà effettuato con dosaggi di memantina flessibili e compresi tra i 10 ed i 20 mg/die. La valutazione cognitiva e psicométrica verrà effettuata al giorno 0 (inclusione nello studio) ed al 1° mese, 3° mese, 6° mese e ad 1 anno e 2 anni.

Per il secondo obiettivo dello studio che prevede l'analisi apoptotica delle

cellule prelevate dai soggetti inclusi nello studio, verranno effettuati dei prelievi da 20 cc ad ogni valutazione clinica, cioè al tempo 0, 6 mesi, 1 anno e 2 anni. Dopo separazione, le cellule mononucleate del sangue (PBMC) saranno sottoposte ad appropriata stimolazione (PHA, LPS, amiloide-beta) *in vitro*. La tendenza ad andare in apoptosi sarà valutata mediante saggi morfologici, colorimetrici o citofluorimetrici. Parallelamente sarà analizzata l'espressione o l'attivazione delle caspasi mediante western blotting e saggi enzimatici.

U.O. 5 – Laboratorio di Neurogenetica

Antonio Orlacchio

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGRAMMA

La Malattia di Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) - la principale causa di demenza - è caratterizzata dalla presenza di placche neuritiche che contengono la proteina beta-amiloide (A beta) e da un accumulo intraneuronale di una proteina associata ai microtubuli chiamata proteina tau (Orlacchio A. et al. (2000) *Rec Res Devel Neurochem* 3: 205-214).

La disfunzione genetica multifattoriale nell'AD comprende loci mutazionali (APP, PS1, PS2) e loci di suscettibilità con diverse funzioni (APOE, A2M, AACT, LRP1, IL1A, TNF, ACE, BACE, BCHE, CST3, MTHFR, GSK3B, NOS3, NMDA, etc.) distribuiti sull'intero genoma umano, i quali probabilmente convergono in un comune meccanismo patogenetico che porta ad una prematura morte neuronale (Orlacchio A. (1999) *J Deg Disease* 1:7).

I trattamenti terapeutici correntemente disponibili usati nell'AD sono basati sull'uso di inibitori dell'acetilcolinesterasi, dal momento che nel corso dell'AD c'è una sostanziale perdita di neuroni colinergici. Un altro farmaco correntemente usato nelle forme più severe di AD è la memantina, antagonista NMDA. Evidenze sperimentali mostrano che il recettore-mediato N-metil D-aspartato (NMDA) decrescendo in funzione può essere fattore causativo per l'AD. I recettori NMDA sono composti da un recettore comune per il glutammato, una subunità NMDA1 ionotropica (GR1N1) e da una di quattro subunità GR1N2 (GR1N2A-GR1N2D), combinate in proporzione non determinata per creare il complesso recettoriale (Hynd M.R. et al. (2004) *J Neurochem* 89: 240-247).

Prima fase

L'obiettivo primario dello studio per l'Unità Operativa è di provare a verificare se due polimorfismi genetici previamente identificati nel gene GR1N1 siano associati o meno ad una risposta terapeutica di pazienti con AD trattati con memantina. GR1N1/1 è una sostituzione G/C localizzata sulla 5' untranslated region; GR1N1/10 è invece una sostituzione A/G localizzata nell'esone 6 del gene GR1N1 (Martucci L. et al. (2003) *Am J Med Genet* 119B: 24-27).

Noi abbiamo pianificato di genotipizzare una serie di 456 pazienti (età: 67.51 ± 12.89 ; 276 femmine, 180 maschi) e più di 400 casi-controllo appaiati per sesso e per età. Entrambi i campioni sono stati collezionati in Italia. I pazienti arruolati nel pianificato studio sono stati valutati psicometricamente (MMSE, ADAS, Behave AD, GDS, FAST, BCRS, Hamilton-A/D) ad un periodo di base e ad 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 mesi durante il periodo di trattamento terapeutico con memantina.

La risposta terapeutica sarà valutata in accordo ai seguenti criteri: *a*) risposta associata all'APOE; *b*) risposta associata al PS1; *c*) risposta associata al PS2; *d*) risposta associata al GR1N1/1; *e*) risposta associata al GR1N1/10;

f) risposta associata all'assetto genomico APOE+PS1+PS2+GR1N1/1+GR1N1/10. Le analisi statistiche dei dati ottenuti saranno effettuate con i softwares SPSS e Sigma Plot (Student t-test punto-a-punto, ANOVA ed analisi lineare di regressione).

Seconda fase

L'obiettivo secondario dello studio è di estendere la nostra analisi di associazione ad ulteriori pazienti con AD (512, età: 68.36±11.79; 263 femmine, 249 maschi) e casi-controllo appaiati per età e sesso (400) dell'Ontario in Canada. I pazienti Canadesi con AD sono stati collezionati seguendo il "Canadian Dementia Protocol" per una valutazione diagnostica, includendo: a) Esame clinico, b) Test di laboratorio (sangue, urine), c) routine ECG e radiografie torace+collo, d) valutazione psicométrica (MMSE, ADAS, GDS, FAST, BCRS, Behave-AD, Hamilton-A/D, Hachinski scale), e) TAC cranio, f) mappatura cerebrale, g) doppler transcranico, h) screening genetico per i geni APOE, PS1 e PS2, come precedentemente descritto (Orlacchio A. (1999) *J Deg Disease* 1:7). Inoltre, in questa seconda fase noi esamineremo il gene NMDAR1 per cercare nuove variazioni di sequenza da essere studiate in più ampi studi di farmacogenomica.

METODOLOGIA

Reclutamento di campioni per analisi genetica: L'U.O. studierà e caratterizzerà geneticamente forme sporadiche e familiari di AD e relativi controlli sani appaiati per sesso, età e luogo di nascita già disponibili nella propria banca dati di DNA, RNA e cellule. L'U.O. procederà inoltre all'acquisizione di nuovi campioni di sangue o prelievi biotipici cutanei da rendere disponibili per tali analisi genetiche.

Estrazione DNA, RNA e colture cellulari: I campioni di sangue si pongono come fonte principale per l'estrazione di DNA e RNA, mentre i prelievi biotipici come fonte per lo stabilimento di colture di cellule fibroblastiche dai suddetti soggetti.

L'estrazione di DNA e RNA verrà effettuata da sangue periferico con KIT di laboratorio; i prelievi biotipici verranno mantenuti in coltura con specifici terreni biologici (terreno Ham's contenente 10% FCS a 37°C e con CO₂ al 5%).

Analisi mutazionale nei geni delle preseniline: L'analisi di variazioni nucleotidiche nei geni delle preseniline verrà effettuata direttamente su DNA genomico o su prodotti di RT-PCR (cDNA derivante da RNA estratto) mediante i sequenziatori automatici ABI310 e ABI3100Avant utilizzando marcatori fluorescenti. Per confermare la scoperta di nuove mutazioni e verificarne la frequenza nella popolazione sana di controllo o la segregazione in famiglie con MCI, si effettuerà un'analisi con RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms).

Analisi mutazionale del gene APP: L'analisi di variazioni nucleotidiche nel gene APP verrà effettuata direttamente su DNA genomico (precisamente a livello degli esoni 16 e 17 ove sono state identificate mutazioni) sempre

mediante i sequenziatori automatici citati a proposito delle Preseniline. Anche in questo caso per confermare la scoperta di nuove mutazioni e verificarne la frequenza nella popolazione sana di controllo o la segregazione in famiglie con MCI, si effettuerà un'analisi con RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms).

Analisi del genotipo dell'APOE: Per questo studio di associazione si userà una versione modificata del metodo Hixon e Vernier (*J Lipid Res*, 1990).

Studi di associazione: Per questi tipi di analisi si partirà da DNA genomico che verrà amplificato mediante PCR utilizzando primers specifici fiancheggianti la sequenza polimorfa. Il prodotto PCR verrà poi analizzato mediante analisi RFLP. Tali studi verranno effettuati su due polimorfismi genetici previamente identificati nel gene GRIN1 per vedere se siano associati o meno ad una risposta terapeutica di pazienti con AD trattati con memantina. GRIN1/1 è una sostituzione G/C localizzata sulla 5' untranslated region; GRIN1/10 è invece una sostituzione A/G localizzata nell'esone 6 del gene GRIN1 (Martucci L. et al. (2003) *Am J Med Genet* 119B: 24-27).