

# **C – NEUROSCIENZE SPERIMENTALI**

GIORGIO BERNARDI

*Università di Roma Tor Vergata – Fondazione Santa Lucia*

**C.1 – PLASTICITÀ DELLE CONNESSIONI NEURONALI IN RAPPORTO ALL'APPRENDIMENTO E ALLA MEMORIA IN CONDIZIONI FISIOPATOLOGICHE**

- C.1.1 – Analisi delle modificazioni metaboliche e neuronali in seguito a deplezione colinergica nel ratto (*Laura Mandolesi*)
- C.1.2 – Effetti comportamentali della deplezione colinergica del proencefalo basale effettuata in età neonatale o adulta nel ratto (*Laura Petrosini*)
- C.1.3 – Implicazione della trasmissione catecolaminergica mesolimbica e mesocorticale nei disturbi cognitivi di origine genetica ed ambientale (*Stefano Puglisi-Allegra*)

**C.2 – STUDIO MULTIDISCIPLINARE DEI MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI ALLA BASE DI PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE**

- C.2.1 – Analisi della degenerazione sinaptica e sua modulazione farmacologica in modelli murini del morbo di Alzheimer (*Francesco Cecconi*)
- C.2.2 – Analisi *in vitro* delle interazioni anatomo-funzionali tra amigdala laterale e corteccia rinale (*Nicola Berretta*)
- C.2.3 – Deplezione dopaminergica acuta da blocco del medial forebrain bundle in confronto a modello standard da 6-OHDA: identificazione dei parametri fisiopatogenetici del “wearing-off” (*Alessandro Stefani*)
- C.2.4 – Fattori epigenetici responsabili del danno mitocondriale in modelli sperimentali della malattia di Parkinson (*Ezia Guatteo*)
- C.2.5 – Modulazione sinaptica da parte di sostanze ad attività trasmettitoriale sui neuroni dopaminergici mesencefalici: implicazioni nel controllo del movimento e nell'attenzione (*Nicola Biagio Mercuri*)
- C.2.6 – Neuroprotezione e danno remoto del SNC: valutazione morfologica, comportamentale e farmacologica di approcci terapeutici (*Marco Molinari*)
- C.2.7 – Paraplegia spastica ereditaria: ricerca per nuovi geni-malattia e correlazione genotipo-fenotipo (*Antonio Orlacchio*)
- C.2.8 – Ruolo degli endocannabinoidi nell'interazione tra recettori A2A e D2 nello striato (*Paolo Calabresi*)
- C.2.9 – Ruolo della chinasi Mutata nell'Atassia Telangiectasica (ATM) nella modulazione della stabilità proteica ubiquitina-proteosoma dipendente e nella risposta apoptotica indotta da stimolo dei recettori di morte (*Daniela Barilà*)
- C.2.10 – Ruolo della proteina di legame agli RNA Sam68 nella atrofia muscolare spinale (SMA) (*Claudio Sette*)
- C.2.11 – Ruolo del pathway molecolare cGMP/PKG e delle PDEs nelle alterazioni della plasticità sinaptica corticostriatale in un modello sperimentale di discinesie da L-DOPA (*Paolo Calabresi*)
- C.2.12 – Studio di nuove strategie per l'intercettazione del danno mitocondriale indotto dalle sod1 mutanti associate alla sclerosi laterale amiotrofica di tipo familiare (*Maria Teresa Carri*)

C.2.13 – Studio molecolare e funzionale dei recettori purinergici P2 nel sistema nervoso e patologie neurodegenerative/neuroinfiammatorie  
(*Cinzia Volonté*)

**C.3 – STUDIO MULTIDISCIPLINARE DELL'IMMUNOPATOGENESI  
DELLA SCLEROSI MULTIPLA**

C.3.1 – Modulazione del rapporto tra cellule T regolatorie/Thelper17 da parte di Cellule Presentanti l'Antigene nella sclerosi multipla  
(*Luca Battistini*)

C.3.2 – Ruolo dei mediatori dell'infiammazione nelle alterazioni sinaptiche della sclerosi multipla e della sclerosi multipla sperimentale  
(*Diego Centonze*)

**C.1 – PLASTICITÀ DELLE CONNESSIONI NEURONALI IN RAPPORTO  
ALL'APPRENDIMENTO E ALLA MEMORIA IN CONDIZIONI  
FISIOPATOLOGICHE**

**C.1.1 – Analisi delle modificazioni metaboliche e neuronali in seguito  
a deplezione colinergica nel ratto (Laura Mandolesi)**

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Deplezione colinergica, ratto, attività neuronale.

**Altri Enti coinvolti:** Università di Roma La Sapienza; Università di Napoli Parthenope.

**Descrizione**

Diverse evidenze cliniche e sperimentali indicano che la degenerazione del sistema colinergico del proencefalo basale rappresenta un importante fattore sottostante il progressivo declino cognitivo che caratterizza alcune forme di demenza tra cui la malattia di Alzheimer (AD).

Il presente progetto di ricerca ha lo scopo di investigare l'attività metabolica di alcune aree corticali e sottocorticali in presenza di deplezione colinergica. Al fine di valutare gli effetti della perdita dell'input colinergico sull'attività metabolica cerebrale, ratti adulti riceveranno lesioni unilaterali nel nucleo basale magnocellulare (NBM) del proencefalo basale attraverso iniezione stereotassica dell'immunotossina 192 IgG-Saporin, che è in grado di bloccare la sintesi proteica nei neuroni colinergici. Diverse ricerche sperimentali hanno dimostrato che le iniezioni nel NMB della tossina provocano lesioni del sistema proencefalico basale, rendendo pertanto questo modello particolarmente adatto per lo studio degli effetti dell'assenza della proiezione colinergica alla neocortex.

Come indice dell'attività neuronale verrà analizzato il livello di citocromo ossidasi (CO), un enzima mitocondriale coinvolto nel metabolismo aerobico e criticamente connesso alla produzione di ATP. Inoltre, tutti i cervelli saranno sottoposti ad analisi immuno- ed isto- chimiche del sistema colinergico, per verificare la presenza e la consistenza del danno colinergico proencefalico.

Successivamente, ci si propone di valutare l'attività metabolica e neuronale in animali lesi nelle prime fasi di sviluppo al fine di analizzare i fenomeni di plasticità del Sistema Nervoso Centrale e di paragonare gli effetti del danno colinergico a differenti età.

**Attività previste**

Il presente progetto di ricerca ha lo scopo di investigare l'attività metabolica di alcune aree corticali e sottocorticali in presenza di deplezione colinergica. A tal fine verrà utilizzato il modello sperimentale di deplezione colinergica nel ratto adulto Wistar, consistente nella lesione unilaterale del nucleo

basale magnocellulare (NBM) del proencefalo basale attraverso l'iniezione stereotassica dell'immunotossina 192 IgG-Saporin.

Verranno utilizzati due gruppi di animali adulti: un gruppo sperimentale (circa 40 ratti con lesione unilaterale) e un gruppo di controllo (circa 40 ratti shame). Tutti gli animali saranno sacrificati a differenti time-points dalla lesione al fine di valutare le diverse differenze significative nel metabolismo neuronale. In particolare, gli animali dapprima anestetizzati saranno sacrificati mediante perfusione transcardiaca di una soluzione di fissaggio a 3, 7, 15 e 30 giorni dalla lesione. Come indice dell'attività neuronale verrà analizzata il livello di citocromo ossidasi (CO), un enzima mitocondriale coinvolto nel metabolismo aerobico e criticamente connesso alla produzione di ATP. Le aree corticali analizzate attraverso una valutazione densitometrica al microscopio elettronico saranno la corteccia frontale, parietale e temporale. Inoltre verrà valutato il metabolismo neuronale anche nell'amigdala e nell'ippocampo.

### **C.1.2 – Effetti comportamentali della deplezione colinergica del proencefalo basale effettuata in età neonatale o adulta nel ratto** *(Laura Petrosini)*

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Deplezione colinergica, test comportamentali, ratto.

**Altri Enti coinvolti:** Università di Roma La Sapienza.

#### **Descrizione**

La deplezione colinergica provoca alterazioni delle funzioni mnesiche ed attentive sia nell'invecchiamento normale che patologico quale quello in presenza di Mild Cognitive Impairment (MCI) o malattia di Alzheimer (AD). La progressiva perdita dei neuroni colinergici e il declino dei livelli di ACh correlano con il grado di declino cognitivo nella demenza (ipotesi colinergica dell'AD). Vari paradigmi di lesioni colinergiche sono stati usati per studiare il ruolo del sistema colinergico del proencefalo basale nelle funzioni cognitive e le sue implicazioni nei deficit cognitivi presenti nell'MCI e nei primi stadi dell'AD come conseguenza della deafferentazione corticale e ippocampale. Differenti modelli animali sono stati proposti per lo studio delle disfunzioni colinergiche, in particolare, attraverso l'uso della immunotossina colinergica 192 IgG-saporina (192 IgG-sap).

La somministrazione intracerebroventricolare (i.c.v.) della 192 IgG-Sap induce una quasi totale e selettiva perdita delle afferenze colinergiche neocorticali e ippocampali. Da una prospettiva comportamentale, la somministrazione della 192 IgG-Sap provoca limitate alterazioni delle funzioni spaziali di base e mnesiche. Deficit più evidenti sono presenti nelle funzioni spaziali complesse o in funzioni discriminative. Anche lesioni neonatali con 192 IgG-Sap inducono una marcata e duratura perdita selettiva dei neuroni colinergici

in corteccia ed ippocampo. Lesioni neonatali del proencefalo basale con 192 IgG-Sap inducono deficit di apprendimento e cambiamenti nelle risposte emozionali già nella seconda settimana post-natale, a due mesi di età sono evidenti i deficit di discriminazione spaziale. Poiché la deplezione colinergica è proposta come modello di MCI che può evolvere in demenza, sembra interessante analizzare se la deplezione colinergica eseguita in precoci stadi di sviluppo possa provocare comportamenti più gravi di quando le medesime lesioni sono effettuate in età adulta.

Ci si propone di mettere a confronto nell'animale adulto gli effetti comportamentali di lesioni adulte o neonatali del proencefalo basale effettuate con la 192 IgG-Sap per verificare se la gravità dei sintomi possa essere differente in funzione dell'età in cui viene indotta la deplezione colinergica. Saranno indagate le prestazioni in differenti test comportamentali che analizzeranno funzioni spaziali, discriminative, mnesiche, associative.

Precedenti dati morfologici hanno dimostrato che i neuroni piramidali della corteccia parietale rispondono alla deplezione colinergica del proencefalo basale con un aumento del numero e della densità delle spine dendritiche. Sembra quindi importante analizzare la risposta strutturale alle lesioni neonatali o adulte di neuroni corticali (parietali e frontali). Tali neuroni, permettendo una cruciale integrazione delle informazioni orizzontali ma anche top-down, sono profondamente coinvolti nella regolazione del comportamento.

### **Attività previste**

Nel presente progetto di ricerca ci si propone di analizzare gli effetti comportamentali della deplezione colinergica del proencefalo basale effettuata in età neonatale o adulta. La batteria di test effettuati dopo il recupero post-operatorio permetterà di valutare diversi aspetti dei processi mnesici a breve e a lungo termine.

### *Metodologia*

Saranno usati ratti Wistar che o a 7 giorni di vita post-natale o a 3 mesi di età riceveranno iniezioni i.c.v. bilaterali di tossina coniugata 192 IgC-saporina. Un uguale numero di animali subirà le stesse iniezioni i.c.v. di salina che non conterrà l'immuntossina. Tali animali "sham" rappresenteranno gli animali di controllo. In questo modo si otterranno quattro gruppi sperimentali, due lesionati a diverse età e due di controllo.

Nel caso delle lesioni neonatali, gli animali subiranno iniezioni i.c.v. bilaterali di soluzioni saline contenenti (o meno) 192 IgC-Sap. I ratti svezzati al 21° giorno di vita e mantenuti in condizioni di allevamento standard saranno testati a 3.5 mesi di età.

Nel caso delle lesioni adulte, gli animali di 3 mesi di età subiranno iniezioni i.c.v. bilaterali di soluzioni saline contenenti (o meno) 192 IgC-Sap. Dopo 21 giorni di recupero post-operatorio, gli animali saranno sottoposti alla batteria di test comportamentali.

I test comportamentali cui saranno sottoposti tutti gli animali sia lesi

che di controllo permetteranno di evidenziare la comparsa di deficit mnesici spaziali precoci. Fra i test scelti, il labirinto ad acqua di Morris (che permetterà di studiare sia gli aspetti procedurali che quelli localizzatori della funzione spaziale, analizzandone le componenti a lungo termine) e l'open field (che permetterà di analizzare la costruzione della mappa spaziale). Alla fine della testatura comportamentale, gli animali saranno sacrificati. I cervelli saranno sottoposti ad analisi immuno- ed isto- chimiche del sistema colinergico, per verificare la presenza e la consistenza del danno colinergico proencefalico.

### **C.1.3 – Implicazione della trasmissione catecolaminergica mesolimbica e mesocorticale nei disturbi cognitivi di origine genetica ed ambientale** (Stefano Puglisi-Allegra)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Sistema mesocorticolimbico, genotipo, neuroplasticità.

**Altri Enti coinvolti:** Università di Roma La Sapienza (Dipartimento di Psicologia e Centro "Daniel Bovet").

#### **Descrizione**

Obiettivo della nostra attività di ricerca precedente è stato quello di indagare il ruolo della trasmissione noradrenergica prefrontale nell'acquisizione di una preferenza spaziale condizionata (Conditioned Place Preference, CPP) e di una avversione spaziale condizionata (Conditioned Place Aversion, CPA) indotte da stimoli naturali gratificanti o avversivi di diversa salienza. Secondo l'ipotesi sottoposta a verifica sperimentale la trasmissione noradrenergica prefrontale è necessaria per l'attribuzione di salienza motivazionale a stimoli condizionati associati ad eventi primari (appetitivi o avversivi) solo in condizioni di alta salienza dello stimolo incondizionato. La salienza degli stimoli incondizionati è stata modulata modificando le caratteristiche intrinseche degli stimoli o lo stato motivazionale dell'organismo (stress cronico), aumentando nell'ultimo caso la "salienza percepita". I risultati di questi esperimenti hanno dimostrato che la trasmissione noradrenergica prefrontale determina l'attribuzione di salienza motivazionale agli stimoli condizionati solo in condizioni caratterizzate da alta salienza dello stimolo incondizionato. Questi studi sono rivolti alla comprensione del ruolo della corteccia prefrontale mediale (mpFC) nella motivazione incentivante ed avversiva acquisita.

Abbiamo anche dimostrato che l'azione della trasmissione noradrenergica in corteccia prefrontale sulla attribuzione di salienza motivazionale in condizioni caratterizzate da alta salienza dello stimolo incondizionato coinvolge la trasmissione dopaminergica nel nucleus accumbens (NAc). Infatti, stimoli di alta salienza inducono un'attivazione della liberazione di dopamina (DA) nel NAc maggiore di quanto facciano stimoli di bassa salienza, parallelamente con quanto osservato per la noradrenalina (NE) in mpFC.

Abbiamo anche osservato che la NE regola l'espressione di cFos nel NAc in modo diverso nella regione della "shell" rispetto a quella del "core" in funzione della salienza dello stimolo e dello stato motivazionale dell'organismo.

### **Attività previste**

Saranno studiati gli effetti di lunga durata dell'esposizione a stimoli farmacologici (cocaina) e naturali (cibo gustoso) misurabili con un test di "relapse", per mezzo della CPP, e con un test di compulsione per valutare le condizioni che determinano l'assunzione di cibo secondo le modalità della tossicodipendenza. Questi studi saranno basati su ceppi inincrociati di topo allo scopo di valutare sia il ruolo dei fattori genetici nella suscettibilità agli effetti incentivanti di stimoli gratificanti che il ruolo dei fattori ambientali (come l'esposizione allo stress, alla restrizione calorica o alla somministrazione ripetuta di cocaina) sulla salienza motivazionale e sugli effetti di dipendenza prodotti da tali stimoli. Ci attendiamo di osservare un'interazione genotipo-ambiente che potrà portarci a fenotipi neuro-comportamentali sulla base dei quali indagare il ruolo dei fattori di neuroplasticità nel sistema mesocorticolimbico catecolaminergico. In particolare studieremo gli effetti dell'incubazione (aumento progressivo della salienza motivazionale nei confronti di stimoli associati alla droga o al cibo, che determina il rischio di "relapse") su trasmissione catecolaminergica nel sistema mesocorticolimbico.

Questo studio, realizzato attraverso la microdialisi intracerebrale in topi liberi di muoversi, si propone di verificare se l'incubazione produce uno squilibrio tra noradrenalina (NE) e dopamina (DA) nella corteccia prefrontale mediale (mpFC) in risposta agli stimoli gratificanti usati, e le conseguenze sulla risposta dopaminergica nel nucleus accumbens (NAc).

Ci aspettiamo di rilevare un aumento della liberazione di NE e una diminuzione di DA nella mpFC e un corrispondente aumento di DA nel NAc negli animali pre-esposti alla droga o al cibo con un effetto maggiore negli animali testati anche in presenza di stimoli associati alla sostanza. L'aumento della liberazione di DA nel NAc indicherebbe la sensibilizzazione della risposta agli effetti gratificanti ed un effetto additivo della sostanza e degli stimoli condizionali.

Successivamente, valuteremo l'espressione del c-Fos e del delta-FosB, del pERK e del pCREB nel sistema mesocorticolimbico per identificare processi neuroplastici associati all'espressione dell'aumentata suscettibilità alla ricaduta ("relapse").

Da questi esperimenti ci aspettiamo di riscontrare cambiamenti significativi in specifiche aree corticali e sottocorticali di topi che esprimono incubazione nella CPP in maniera sovrapponibile in seguito all'esposizione alla droga, allo stimolo naturale, e agli stimoli ambientali ad essi associati.

## **C.2 – STUDIO MULTIDISCIPLINARE DEI MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI ALLA BASE DI PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE**

### **C.2.1 – Analisi della degenerazione sinaptica e sua modulazione farmacologica in modelli murini del morbo di Alzheimer** (Francesco Cecconi)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Alzheimer, caspasi, sinapsi.

#### **Descrizione**

Questo progetto di ricerca è caratterizzato da 2 specifici scopi:

1) *Identificazioni delle alterazioni ippocampali caspasi-dipendenti nelle fasi precoci della malattia di Alzheimer (AD), usando un modello murino di foma familiare di AD.* In questa prima parte del progetto focalizzeremo l'attività sulla identificazione delle alterazioni caspasi-indotte nella trasmissione e nella composizione delle sinapsi ippocampali glutammatergiche. Abbiamo significativi dati preliminari (D'Amelio et al. submitted) che confermano come l'attività della caspasi-3 sia potenziata nelle sinapsi ippocampali durante le prime fasi della malattia (topi transgenici a 3 mesi di età). In aggiunta, l'aumento di attività della caspasi-3 correla con (a) l'esordio di disfunzioni sinaptiche, (b) diminuzione delle spine dendritiche nei dendriti apicali della regione CA1 dell'ippocampo, (c) riduzione delle *performance* cognitive.

Poiché le alterazioni sopra elencate non sono obiettivabili in animali più giovani, i dati ottenuti confermano che si tratta delle prime alterazioni responsabili della malattia. Dunque proponiamo di completare l'analisi di tali alterazioni sinaptiche focalizzandoci sui recettori NMDA e sullo studio dell'LTD (long term depression).

In parallelo, verrà condotto un dettagliato studio biochimico sui mitocondri del compartimento sinaptico al fine di evidenziare le alterazioni che portano all'attivazione della caspasi-3 ed alla comprensione dei meccanismi attraverso cui l'accumulo di beta-amiloide conduce ad un aumento dell'attività della stessa caspasi-3.

2) *Studio di nuove strategie terapeutiche in vivo finalizzate a prevenire le disfunzioni sinaptiche dipendenti dall'attività della caspasi-3.* In questa seconda parte del progetto esploreremo l'utilizzo di un inibitore della caspasi-3 nel trattamento preventivo e terapeutico delle alterazioni sinaptiche sopra descritte.

Nel dettaglio, somministreremo l'inibitore di caspasi-3 (z-DEVD-fmk) attraverso iniezioni intra-cerebro-ventricolari tra 2 e 3 mesi di età. L'endpoint primario di questa sperimentazione sarà la riduzione di attività della caspasi-3 in ippocampo di animali transgenici. Le misure di outcomes saranno: preven-

zione e/o riduzione delle alterazioni sinaptiche (attraverso uno studio biochimico ed elettrofisiologico); prevenzione e/o miglioramento delle performance cognitive che saranno obiettivate mediante test neuropsicologici (Contextual Fear Conditioning).

### **Attività previste**

- Analisi delle subunità del recettore ionotropico del glutammato, NMDAR, in post-synaptic density (PSD) di topi transgenici prima e dopo l'esordio dei primi deficit cognitivi.
- Analisi di NMDAR in sezioni ippocampali di animali transgenici dopo incubazione con inibitore della caspasi-3.
- Studio morfologico ultrastrutturale di spine dendritiche di sezioni ippocampali di animali con deficit cognitivi dopo inibizione di caspasi-3.
- Studio elettrofisiologico dell'LTD in animali con deficit cognitivi.

### **C.2.2 – Analisi *in vitro* delle interazioni anatomo-funzionali tra amigdala laterale e corteccia rinale (Nicola Berretta)**

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Reti neuronali corticali, plasticità sinaptica, malattia di Alzheimer.

### **Descrizione**

La corteccia peririnale (PRh), grazie anche alla sua posizione intermedia tra la corteccia visiva e l'area limbica ippocampale, è coinvolta in una forma di memoria che prevede il riconoscimento visivo. Questa memoria risulta tanto più apprezzata proprio in quelle patologie che comportano una sua deficienza, come ad esempio nella malattia di Alzheimer. Non è un caso infatti che proprio la corteccia rinale, sia ento- che peri- rinale, sia proprio la zona corticale che presenta i primi segnali di neurodegenerazione associata allo sviluppo di questa neuropatologia.

Una caratteristica peculiare della memoria visiva è il fatto che esperienze emotivamente coinvolgenti sono ricordate meglio di quelle meno significative sotto l'aspetto emozionale. Sotto questo aspetto, è noto che l'amigdala svolge un ruolo determinante nel consolidamento di forme di memoria che prevedono aspetti di tipo emotivo. Numerosi infatti sono gli studi che dimostrano un coinvolgimento dell'amigdala nel condizionamento da paura, tuttavia, il suo ruolo in forme di memoria dichiarativa è meno descritto e investigato sperimentalmente.

Un coinvolgimento dell'amigdala nella modulazione della memoria da riconoscimento visivo non è certamente un risultato inatteso. Esiste infatti una chiara evidenza anatomica di connessioni sinaptiche reciproche tra l'amigdala e la corteccia rinale. Inoltre, è stato dimostrato che durante le fasi di acquisizione di compiti che prevedono un riconoscimento visivo, si assiste ad

un elevato grado di crosscorrelazione tra la scarica autorigenerativa in amigdala e in corteccia rinale.

Lo studio *in vitro* della PRh ha evidenziato che le sinapsi glutammatergiche afferenti agli strati superficiali di quest'area sono soggette a modificazioni a lungo termine nella loro efficacia, sviluppando dunque potenziamento o depressione a lungo termine (LTP o LTD). L'LTD in particolare sembra essere la forma di plasticità che presiede all'acquisizione di memoria da riconoscimento visivo, infatti tale forma di memoria è associata a riduzione nell'attività di scarica dei neuroni superficiali della PRh, inoltre, manipolazioni sperimentali che prevengono l'LTD impediscono parallelamente l'acquisizione di un riconoscimento visivo.

Sulla base di queste premesse ci proponiamo di esaminare l'interazione funzionale tra amigdala e corteccia rinale, studiando la trasmissione e la plasticità sinaptica negli strati superficiali della PRh, in un preparato *in vitro* comprendente sia la PRh che l'amigdala.

### Obiettivi

Il progetto si propone di raggiungere nei prossimi tre anni i seguenti obiettivi:

1. sviluppare un preparato *slice* comprendente sia la PRh che l'amigdala, in cui siano presenti proiezioni funzionali dall'amigdala alla PRh;
2. ottenere una correlazione anatomo-funzionale tra risposte sinaptiche evocate in corteccia, dopo stimolazione in amigdala, e marcatura di fibre afferenti sullo stesso preparato *slice*;
3. caratterizzare funzionalmente e farmacologicamente la proiezione sinaptica dall'amigdala alla PRh, comparandola con le proprietà di altre afferenze intracorticali convergenti sulla stessa popolazione neuronale della PRh;
4. valutare possibili interazioni funzionali nella normale trasmissione sinaptica intracorticale, a seguito di stimolazione in amigdala;
5. valutare un possibile ruolo della proiezione dall'amigdala alla PRh in modelli di plasticità sinaptica precedentemente descritti in PRh;
6. comparare i risultati ottenuti in animali di controllo e in modelli animali di malattia di Alzheimer.

### Attività previste

Nel corso del primo anno ci proponiamo di raggiungere due obiettivi:

- Ottenere un preparato sperimentale *in vitro* comprendente sia la PRh che l'amigdala, connessi tra loro funzionalmente. A tale scopo prepareremo *slice* di ratto con tecniche standard, tagliate secondo un angolo opportuno, comprendenti sia la PRh che l'amigdala. Per verificare la loro connessione funzionale, le *slice* saranno registrate con un sistema multielettrodo MED64, che prevede la registrazione extracellulare mediante *array* di 8x8 elettrodi planari, posizionati sotto il controllo visivo sia in amigdala che in corteccia. Questa tecnica consentirà di stimolare selettivamente aree discrete in amigdala, e

osservare in parallelo le risposte sinaptiche di campo (fEPSP), evocate in corrispondenza di strati visivamente identificati della PRh. La presenza di risposte evocate nei vari strati corticali permetterà di individuare dipoli elettrici, indice di sinapsi locali, per verificare l'effettiva insorgenza di risposte sinaptiche negli strati esaminati, piuttosto che la diffusione di segnali da aree limitrofe.

- Eseguire una caratterizzazione elettrofisiologica delle risposte sinaptiche evocate in corteccia, dopo stimolazione in amigdala, e correlarle all'identificazione anatomica di fibre provenienti dall'amigdala sulla stessa *slice*. A tale scopo, al termine delle registrazioni elettrofisiologiche sopra descritte, dei cristalli di rodamina verranno posti sulla *slice*, sotto controllo visivo, in corrispondenza del punto esatto di stimolazione in amigdala. Le *slice* verranno poi lasciate per 24h in soluzione fisiologica ossigenata, allo scopo di permettere ai cristalli di essere catturati da fibre e neuroni locali, ed essere dunque trasportati in senso anterogrado verso la PRh. In questo modo sarà possibile ottenere marcature fluorescenti delle fibre afferenti alla PRh, provenienti dal sito di stimolazione elettrica in amigdala, e correlare la loro distribuzione anatomica alle risposte elettrofisiologiche precedentemente ottenute.

### **C.2.3 – Deplezione dopaminergica acuta da blocco del medial forebrain bundle in confronto a modello standard da 6-OHDA: identificazione dei parametri fisiopatogenetici del “wearing-off” (Alessandro Stefani)**

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Denervazione dopaminergica, Parkinson, oscillazioni.

#### **Descrizione**

Nel modello di parkinsonismo “tossico” (ottenuto dopo iniezione della tossina 6-idrossidopamina nella sostanza nera o nel medial forebrain bundle di ratto) vengono descritte caratteristiche modificazioni del pattern di scarica neuronale in molte delle strutture chiave dei gangli della base (globo pallido – GP –, sostanza nera reticulata – SNr –, sottotalamo – STN –). Si presume che tali modificazioni (sotto forma di scarica a burst) intervengano non acutamente bensì dopo 3-15 giorni dalla lesione e siano testimonianza sia di processi apoptotici (morte neuronale dei neuroni della nigra compacta) sia adattativi (complesse alterazioni a livello dello striato e perdita della normale plasticità sinaptica). Contributi recenti avrebbero anche posto in luce che tali oscillazioni anomale sincronizzano con la corteccia obbedendo ad un ritmo definito come “beta-veloce”, compreso cioè tra i 15-18 e i 30 Hz circa.

Siamo però ben lontani dal disporre di un panorama chiaro; non sappiamo se la prominenza della c.d. beta-band sia soprattutto correlativa (e non patogenetica dei segni clinici); se invece attestati meccanismi di compenso o se,

per converso, sia correlabile con lo stato di danno (ergo una sorta di marcatore dell'avanzamento della morte neuronale nel modello e della malattia nel paziente). Sappiamo peraltro che nel roditore sussiste un ampio novero di ritmi patologici, tra i quali una frequenza "theta-like" notoriamente smascherata da antagonisti della dopamina (aloperidolo in cronico) sia una decisamente lenta, intorno a 1-2 Hz, di fatto sincronizzata con la corteccia (le c.d. "slow waves corticali") allorché l'animale da esperimento sia stato sottoposto ad anestesia con uretano.

Ora, con la presente ricerca ci promettiamo di fornire una rinnovata comprensione di tali oscillazioni patologiche e specialmente nutriamo l'ambizione di capire in che misura ciascun ritmo reciti un ruolo preciso e fisiopatogenetico rispetto a sindromi cliniche documentabili.

Risultati preliminari ci suggeriscono che la compromissione – pur reversibile – del release di dopamina previa iniezione di tetrodotossina o riluzolo nel medial forebrain bundle causano sia una acinesia controlaterale (reversata dopo 3-4 ore) sia alterazioni dell'intero circuito con sincronizzazioni ad 1 Hz tra corteccia e GP come tra corteccia e SNr. Ciò sembrerebbe riattualizzare le basse frequenze come protagoniste dei segni ipocinetici del Parkinson; altresì, ciò vorrebbe dire che alterazioni pur reversibili delle proprietà di fibra (anche in assenza di morte cellulare) sono sufficienti ad indurre stati OFF severi.

### *Obiettivi*

1. Mettere in luce punti di contatto e per converso di differenza tra modello cronico da 6-OHDA e modello acuto da TTX.

2. Chiarire in che misura la sincronizzazione da TTX richieda precise alterazioni nella elettrofisiologia dello striato o non piuttosto si realizzi grazie ad anomalie squisitamente presenti nella via "superdiretta" (corteccia-sottotalamo-GP).

3. Dimostrare la reversibilità dei parametri elettrofisiologici alterati previa somministrazione sistemica o locale (intra-STN, intra-GP) di agonisti dopaminergici o dopamina stessa per iontoforesi.

I risultati attesi promettono di avere ricadute traslazionali molto importanti, tali da incidere sulla nostra comprensione delle transizioni cliniche acute (sia OFF-ON che ON-OFF, vedasi acinesia improvvisa e freezing-ON e freezing-OFF). Inoltre, forniremo nuove interpretazioni in merito ai meccanismi di azione della deep brains stimulation; non è escluso infine che i nostri risultati possano contribuire a modificarne i criteri di inclusione o il processo decisionale che porta alla decisione chirurgica.

### **Attività previste**

Nell'anno continueremo a sviluppare il modello descritto ed arriveremo, confidiamo, ad illuminarne la farmacologia. In particolare, andremo a verificare in che misura, come atteso, la somministrazione di agenti dopaminomimetici moduli le anomalie oscillatorie ripristinando le caratteristiche del firing tonico pre-TTX. Tale linea di indagini richiederà approcci sperimentali

diversi; da un lato la somministrazione locale (intra-GP) di agonisti dopaminergici e/o della stessa dopamina, dall'altro la somministrazione sistemica (apomorfina s.c.).

Altro ordine di attività previste riguarda i correlati biochimici. Continueremo ad esaminare in che misura il modello di inattivazione funzionale in gioco modifichi non solo DA/HVA in striato ma anche nelle aree target (in pratica, microdialisi standard in GP e STN). Ciò potrebbe avere riflessi importanti in merito alla innervazione endogena (axon collaterals) della via nigrostriatale e implica stringente collaborazione con gli anatomici ed immunostochimici coinvolti nel progetto. La convalida biochimica si fonderà anche sull'utilizzo di un nuovo macchinario recentemente acquisito dal dipartimento. Si tratta di un HPLC/amperometro della ditta Antec (software Clarity) che si promette di titolare le amine biogene (con sensibilità fino a femtomoli) da preparati biologici. In altri termini, quindi, una delle applicazioni del progetto sarà tecnologica e multidisciplinare.

Attività non secondarie del progetto sono infine quelle relative alla presentazione dei dati ed alle pubblicazioni scientifiche. Il progetto è per sua natura traslazionale ed i risultati raggiunti avranno ampio risalto in congressi nazionali ed internazionali.

#### **C.2.4 – Fattori epigenetici responsabili del danno mitocondriale in modelli sperimentali della malattia di Parkinson** (Ezia Guatteo)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata:** 36 mesi

**Parole chiave:** Mitocondrio, cellule dopaminergiche, rotenone, 6-OHDA, gangli della base, neurodegenerazione.

#### **Descrizione**

La malattia di Parkinson è caratterizzata dalla degenerazione selettiva e progressiva dei neuroni dopaminergici della sostanza nera *pars compacta* che innervano lo striato dorsale, con la conseguente riduzione del rilascio di dopamina nei gangli della base. Infatti, la maggior parte dei sintomi motori presenti nei pazienti parkinsoniani (bradichinesia, tremore a riposo, rigidità e instabilità posturale) sono mitigati dalla somministrazione di agonisti dopaminergici e/o del precursore della dopamina, L-DOPA, convertita in dopamina dall'enzima dopa-decarbossilasi presente nei rimanenti neuroni. Notoriamente, i neuroni dopaminergici situati nell'area ventrale tegmentale (VTA) adiacente alla *pars compacta* rimangono inalterati nella malattia di Parkinson [Damier et al. 1999], suggerendo che esiste una vulnerabilità selettiva dei neuroni della *pars compacta* a qualche fattore neurotossico.

Sono stati proposti diversi meccanismi responsabili della morte neuronale tra cui una disfunzione mitocondriale, stress ossidativo e deficit nel funzionamento proteasomale nel processamento di proteine [Dauer, Przedborski 2003; Shapira 2001]. Lo studio di tali meccanismi è di fondamentale impor-

tanza sia per la prevenzione che per lo sviluppo di nuovi agenti farmacologici che potrebbero diminuire la progressione neurodegenerativa. A tale riguardo esistono numerosi modelli animali in cui si è prodotta una degenerazione dopaminergica e che presentano alcune caratteristiche comportamentali della malattia di Parkinson umana. Tra questi, roditori e primati trattati con neurotossine come 6-OHDA, MPTP e rotenone sono stati largamente utilizzati per testare l'efficacia di potenziali farmaci anti-parkinsoniani. Tali tossine agiscono inibendo la catena respiratoria mitocondriale dei neuroni dopaminergici, ma i meccanismi cellulari attraverso cui esse causino la morte neuronale sono ancora largamente sconosciuti.

Lo scopo del presente progetto è quello di studiare gli effetti di alcune di queste tossine, in particolare rotenone e 6-OHDA, a livello di singolo neurone dopaminergico, in fettine acute di mesencefalo ventrale di ratto. Mediante la tecnica elettrofisiologica del patch-clamp e la microfluorimetria possiamo misurare l'attività elettrica, le correnti di membrana, le variazioni intracellulari di calcio/sodio e le variazioni del potenziale mitocondriale in risposta all'applicazione acuta di rotenone e 6-OHDA. È noto che sia rotenone che 6-OHDA causano l'attivazione dei canali di potassio ATP-dipendenti nei neuroni dopaminergici [Liss et al. 2001; Berretta et al. 2005] provocando una iperpolarizzazione del potenziale di membrana e quindi cessazione dell'attività di scarica spontanea. Noi andremo ad indagare quali siano i meccanismi di attivazione di tali canali (ATP, ROS,  $H_2O_2$ ), le modificazioni di concentrazione di calcio e sodio associate e gli effetti delle tossine sul potenziale di membrana mitocondriale.

### *Obiettivi*

Ci proponiamo di eseguire uno studio elettrofisiologico, microfluorometrico e morfologico delle cellule dopaminergiche di roditore della sostanza nera parte compatta allo scopo di definirne le proprietà quando esposte a tossine in quantità note e per tempi definiti. Le tossine oggetto dello studio saranno la 6-idrossidopamina (6-OHDA) e il rotenone. Esposizione del tessuto cerebrale a condizioni ipossiche.

### **Attività previste**

- Durante il primo anno andremo a valutare gli effetti precoci del rotenone applicato ai neuroni dopaminergici in fettine acute di mesencefalo di ratto. In particolare, valuteremo gli effetti sul potenziale mitocondriale e sulle concentrazioni di calcio citosoliche in risposta a tali stimoli tossici. Valuteremo inoltre i meccanismi responsabili dell'accumulo di calcio, come il rilascio dagli store intracellulari e dai mitocondri, e l'attivazione di canali ionici di membrana, calcio-permeabili. Andremo inoltre a misurare la produzione di ROS durante trattamento con rotenone, mediante l'uso di "scavenger", cioè sostanze antiossidanti che eliminano le specie reattive dell'ossigeno dal citosol, come la vitamina E.

- Durante il secondo anno andremo a studiare il meccanismo di azione di un'altra tossina, la 6-OHDA che, analogamente al rotenone produce la

degenerazione dei neuroni dopaminergici. In particolare, andremo a valutare, per mezzo di sostanze fluorescenti che si localizzano all'interno dei mitocondri, la variazione di calcio mitocondriale, durante applicazione di 6-OHDA.

- Durante il terzo anno, sulla base dei risultati ottenuti, studieremo il coinvolgimento dei mitocondri in altri modelli di deprivazione energetica come l'ipossia, che, analogamente alle suddette tossine, va ad interferire con la corretta funzionalità mitocondriale.

#### *Tecniche utilizzate*

1) *Elettrofisiologia*. Utilizzeremo le procedure standard già descritte [Guatteo et al. 2000; Guatteo et al. 2005] per la preparazione delle fettine acute del mesencefalo di ratto. Le registrazioni di patch-clamp sono effettuate su neuroni visualizzati mediante un sistema di contrasto differenziale interferenziale a infrarossi (IR-DIC), per mezzo di un obiettivo a immersione 40X e una telecamera (Hamamatsu, Japan).

2) *Microfluorimetria*. Le misurazioni di  $[Ca^{2+}]$  intracellulare verranno ottenute da neuroni caricati rispettivamente con Fura-2 (0.25 mM, Molecular Probes) aggiunti alla soluzione di riempimento dell'elettrodo di registrazione. La sua eccitazione si realizzerà attraverso luce UV emessa da un monocromatore (Till Photonics) a 340 e 380 nm. La luce emessa sarà monitorata con un filtro a 500 nm e captata da una camera CCD. La misurazione del potenziale mitocondriale sarà effettuata per mezzo della rodamina 123 e quella del calcio mitocondriale per mezzo di Rhod-2.

3) *Immunoistochimica* per misurare la quantità di rilascio di citocromo c.

- Berretta N, Freestone PS, Guatteo E, de Castro D, Geracitano R, Bernardi G, Mercuri NB, Lipski J (2005) *Neurotoxicology* 26(5): 869-881.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) *Brain* 122: 1421-1436.
- Dauer W, Przedborski S (2003) *Neuron* 39(6): 889-909. *Review*.
- Guatteo E, Chung KK, Bowala TK, Bernardi G, Mercuri NB, Lipski J (2005) *J Neurophysiol* 94(5): 3069-3080.
- Guatteo E, Fusco FR, Giacomini P, Bernardi G, Mercuri NB (2000) *J Neurosci* 20(16): 6013-6020.
- Liss B, Roeper J (2001) *News Physiol Sci* 16: 214-217. *Review*.
- Schapira AH (1999) *Biochim Biophys Acta* 1410(2): 159-170. *Review*.

### **C.2.5 – Modulazione sinaptica da parte di sostanze ad attività trasmettitoriale sui neuroni dopaminergici mesencefalici: implicazioni nel controllo del movimento e nell'attenzione** (Nicola Biagio Mercuri)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata:** 36 mesi

**Parole chiave:** Dopamina, trace amine, endocannabinoidi, modafinil, gangli della base.

## Descrizione

I neuroni dopaminergici mesencefalici sono implicati nel controllo del movimento, nella regolazione di funzioni cognitive e nel controllo di comportamenti associati alle dipendenze e pertanto rappresentano un sito d'azione cruciale di importanti categorie di farmaci neuropsichiatrici quali agenti antipsicotici, farmaci anti-Parkinson e sostanze d'abuso. L'attività dei neuroni compresi nella sostanza nera (SN) e nell'area tegmentale ventrale (VTA) è finemente regolata dalle proprietà intrinseche di membrana, rappresentate dalle particolari conduttanze alla base dell'attività di pace-maker propria di questi neuroni, e dagli inputs sinaptici. Le afferenze sinaptiche che confluiscono sui neuroni dopaminergici mesencefalici sono di diversa natura: glutammatergiche, GABAergiche, serotoninergiche, colinergiche e noradrenergiche e contribuiscono in diverso modo alla modulazione dell'attività neuronale. Gli input sinaptici modulano le proprietà di scarica dei neuroni e pertanto determinano le modalità e l'entità di dopamina rilasciata nelle aree di proiezione, come lo striato e il nucleus accumbens, aree cerebrali implicate nel controllo del movimento e di funzioni cognitive e comportamentali. Pertanto lo studio dei meccanismi che modulano la trasmissione sinaptica sui neuroni dopaminergici può avere importanti implicazioni in patologie caratterizzate da deficit motori e dell'attenzione.

Lo scopo del presente progetto è quello di studiare gli effetti sulla modulazione della trasmissione sinaptica che afferisce sui neuroni dopaminergici compresi nella SN e VTA da parte di sostanze endogene quali le amine in traccia ( $\beta$ -fenilettilamina, tiramina) e gli endocannabinoidi. Saranno inoltre studiati gli effetti del Modafinil, agente utilizzato per il trattamento di disturbi dell'attenzione e della sonnolenza associata alla narcolessia, al fine di identificare il possibile meccanismo d'azione che è al momento sconosciuto.

### Obiettivi

Ci proponiamo di effettuare uno studio elettrofisiologico degli effetti esercitati da sostanze endogene, quali le amine in traccia e gli endocannabinoidi, e da sostanze psicostimolanti, quali il modafinil, sulla trasmissione sinaptica che modula l'attività dei neuroni dopaminergici mesencefalici.

### Attività previste

- Durante il primo anno studieremo gli effetti delle amine in traccia ( $\beta$ -fenilettilamina e tiramina) sulla trasmissione sinaptica che afferisce sui neuroni dopaminergici utilizzando fettine acute di mesencefalo di ratto. In particolare saranno analizzati i potenziali postsinaptici eccitatori (EPSPs), mediati dall'attivazione dei recettori glutammatergici sensibili all'AMPA/kainato e all'NMDA, e quelli inibitori (IPSPs), mediati dall'attivazione dei recettori per il GABA, GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>, che possono essere isolati farmacologicamente utilizzando, a seconda della componente in esame, un cocktail di antagonisti specifici.

- Durante il secondo anno andremo a valutare gli effetti degli endocannabinoidi e di sostanze sintetiche che modulano l'attività dei recettori dei canna-

binoidi di tipo1 (CB1), le quali, in aree cerebrali diverse da quella da noi presa in esame, modulano il rilascio di neurotrasmettitori quali GABA e glutammato. Anche in questo caso saranno studiati gli effetti sui potenziali eccitatori e sui potenziali inibitori, compresa la componente rapida (GABA<sub>A</sub>-mediata) e la componente lenta (GABA<sub>B</sub>-mediata).

- Durante il terzo anno saranno studiati gli effetti prodotti dall'applicazione sulle fettine mesencefaliche del Modafinil. In particolare saranno inizialmente valutati gli effetti sul potenziale e sulle correnti di membrana dei neuroni dopaminergici e successivamente sarà esaminata un eventuale modulazione della trasmissione sinaptica glutammatergica e GABAergica.

#### *Tecniche utilizzate*

1) *Elettrofisiologia*. Utilizzeremo le procedure standard già descritte [Mercuri et al. (1995) *Eur J Neurosci* 7: 462-469] per la preparazione delle fettine acute del mesencefalo di ratto. Le registrazioni elettrofisiologiche saranno effettuate utilizzando la tecnica di registrazione intracellulare con microelettrodo su neuroni visualizzati mediante un sistema di contrasto differenziale interferenziale a infrarossi (IR-DIC), per mezzo di un obiettivo a immersione 40X e una telecamera (Hamamatsu, Japan). I potenziali post-sinaptici saranno evocati utilizzando un elettrodo stimolante posizionato in prossimità dei neuroni da registrare.

### **C.2.6 – Neuroprotezione e danno remoto del SNC: valutazione morfologica, comportamentale e farmacologica di approcci terapeutici (Marco Molinari)**

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Degenerazione remota, neuroprotezione, endocannabinoidi.

#### **Descrizione**

Il danno neuronale a distanza rappresenta un evento peculiare nella determinazione dello status funzionale e, in particolare, del recupero funzionale in seguito a danno 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 che sono legati ad una serie di cambiamenti cellulari, funzionali e molecolari, correlati tra loro sia temporalmente che spazialmente. Inoltre, i fenomeni infiammatori svolgono un ruolo chiave nel controllare attivamente il complesso meccanismo di morte cellulare anche in aree lontane dall'area primaria di lesione.

Nonostante 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 poco esplorato. 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 e 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. Dati recenti pubblicati da questo laboratorio hanno dimostrato che l'attivazione del sistema degli endocannabinoidi, in seguito a danno cerebellare, gioca un ruolo chiave nei meccanismi di neuroprotezione attivando la via di trasduzione del segnale di PI3K/Akt. Questi dati suggeriscono, dunque, l'importante ruolo che alcuni agonisti selettivi per i recettori degli endocannabinoidi potrebbero assumere nell'approccio terapeutico in varie patologie di danno del SNC.

Considerando l'importanza della degenerazione remota, principalmente la specificità temporale e regionale, l'obiettivo è quello di definire il ruolo dell'attivazione dei recettori degli endocannabinoidi in sistemi neuronali differenti. I dati presentati sinora sono stati ottenuti nei circuiti olivo-cerebellare e ponto-cerebellare. L'unità si concentrerà sullo studio delle possibili analogie o differenze nella degenerazione remota in seguito ad assotomia, analizzando nello specifico le proiezioni corticospinali, rubrospinali e nigrostriatali, circuiti importanti coinvolti in alcune patologie neurodegenerative.

Inoltre, data l'efficacia dei composti anti-infiammatori nel modulare la morte cellulare a distanza dopo danno del SNC, analizzeremo l'interazione dei due diversi trattamenti terapeutici e la loro efficacia dal punto di vista terapeutico.

### **Attività previste**

Nella prima parte del progetto studieremo la progressione temporale ed i meccanismi di neurodegenerazione nelle aree remote alla sede primaria di lesione in seguito a emisezione del midollo spinale e ad assotomia parziale delle connessioni del circuito nigrostriatale. Inoltre, analizzeremo l'espressione a livello cellulare dei recettori degli endocannabinoidi in condizioni fisiologiche e dopo i diversi danni del SNC.

Nella seconda parte del progetto, agendo farmacologicamente sui recettori cannabinici (CB1 e CB2), investigheremo le potenzialità terapeutiche della manipolazione farmacologica del sistema degli endocannabinoidi nella progressione della morte cellulare a distanza. In particolare, testeremo l'effettiva azione dei trattamenti con i vari agonisti e antagonisti selettivi per il CB1 e CB2 sul quadro clinico e funzionale degli animali sottoposti a emisezione del midollo spinale o ad assotomia parziale del circuito nigrostriatale. Attenzione verrà rivolta allo studio delle vie di trasduzione del segnale attivate dai recettori degli endocannabinoidi nel mediare sia la sopravvivenza neuronale sia il recupero funzionale in seguito a questi due diversi tipi di danno del SNC.

### **C.2.7 – Paraplegia spastica ereditaria: ricerca per nuovi geni-malattia e correlazione genotipo-fenotipo** (*Antonio Orlacchio*)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Neurologia, neurogenetica, paraplegia spastica ereditaria.

**Altri Enti coinvolti:** Università di Roma Tor Vergata (Dipartimento di Neuroscienze); Hyogo Brain and Heart Center, Himeji City (Japan) (Department of Neurology); University of Toronto (Canada) (Centre for Research in Neurodegenerative Diseases).

#### **Descrizione**

Gli obiettivi principali di questo progetto sono l'identificazione dei geni responsabili di due forme complicate di HSP (SPG29 ed SPG38) e la scoperta di nuovi loci HSP mediante analisi di linkage.

Un ulteriore scopo è stabilire con quanta frequenza le mutazioni dell'atlastina, NIPA1, KIAA0196, KIF5A, HSPD1, REEP1, ZFYVE27 e SLC33A1, osservate solo in un singolo o in un numero esiguo di pedigree, siano responsabili dell'ADHSP e se ci sia un fenotipo clinico riconoscibile per l'HSP causato da queste mutazioni. L'identificazione dei geni SPG29 ed SPG38 sarà realizzata mediante un approccio posizionale al gene candidato. Per mappare nuovi loci HSP si analizzerà, attraverso un genome-wide search, un'ampia famiglia italiana con forma pura di HSP a trasmissione autosomica dominante (ADHSP) in cui gli studi di linkage preliminari sembrano escludere il coinvolgimento dei loci ADHSP finora identificati. Per concludere, si realizzerà una dettagliata analisi clinica delle famiglie ADSHP e si effettuerà uno screening genetico di 8 geni conosciuti ADHSP (atlastina, NIPA1, KIAA0196, KIF5A, HSPD1, REEP1, ZFYVE27 e SLC33A1) attraverso un'analisi di sequenza.

#### **Attività previste**

L'attività di ricerca sarà volta all'applicazione di approcci molecolari e genomici per identificare i geni coinvolti nell'HSP. Per raggiungere questo obiettivo verrà impiegata una varietà di metodi molecolari e statistici derivati dai campi della genetica, della biologia molecolare e della epidemiologia.

Le tecniche che verranno usate includono analisi di linkage, studi di associazione, mappatura genica, epidemiologia genetica, correlazioni genotipo/fenotipo, simulazione al computer e metodi per analisi dei dati.

Il database a disposizione, insieme con l'esperienza nell'effettuare studi di genetica molecolare, offrirà l'opportunità immediata di scoprire nuovi geni per l'HSP mediante la mappatura-fine di regioni candidate, di scoprire nuovi loci per l'HSP, di scoprire nuove mutazioni nei geni HSP conosciuti, di effettuare studi di correlazione genotipo-fenotipo e di studiare i meccanismi cellulari della malattia.

## C.2.8 – Ruolo degli endocannabinoidi nell'interazione tra recettori A2A e D2 nello striato (Paolo Calabresi)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36 mesi

**Parole chiave:** Plasticità sinaptica, parkinsonismo sperimentale, sistema dopaminergico/A2A.

### Descrizione

All'interno del nucleo striato, l'adenosina esercita una serie di effetti di modulazione pre- e post- sinaptica sull'attività fisiologica di diversi sottotipi neuronali. Come è noto, il nucleo striato esprime in abbondanza non solo recettori di tipo A1 dell'adenosina, ma anche recettori di tipo A2A. Il ruolo fisiologico dei recettori A2A, in base ad una serie di dati sperimentali, sembra essere di particolare interesse soprattutto in relazione ad una interazione funzionale con la trasmissione dopaminergica, e più precisamente con i recettori di tipo D2. Tra recettori A2A e recettori D2 esisterebbe un antagonismo funzionale, documentato a livello comportamentale e molecolare, che spiega il notevole interesse esistente per i composti in grado di inibire i recettori A2A come agenti utili nel trattamento di alcune malattie neurodegenerative. L'attivazione dei recettori A2A aumenterebbe i livelli di cAMP mentre quella dei recettori D2 ridurrebbe tali livelli.

Recentemente il nostro gruppo ha studiato gli effetti dell'ST1535, un antagonista dei recettori A2A dell'adenosina, sulle proprietà intrinseche dei neuroni principali dello striato e l'eventuale capacità di tale composto di interagire funzionalmente con i recettori D2 della dopamina nella modulazione della trasmissione glutammatergica corticostriatale [Tozzi et al. 2007].

Sono stati valutati con tecniche elettrofisiologiche *in vitro* gli effetti della applicazione dell'ST1535 sulla trasmissione sinaptica eccitatoria corticostriatale. Al dosaggio di 10 e 30 mM, ST1535 non induceva alcuna modificazione della frequenza e della ampiezza delle correnti postsinaptiche eccitatorie spontanee (sEPSCs). Tale agente, tuttavia, al dosaggio di 10 mM, era in grado di smascherare un effetto inibitorio del quinpirolo (10 mM), agonista dei recettori dopaminergici D2, che applicato da solo non modifica significativamente la trasmissione glutammatergica corticostriatale. Al contrario, quando il quinpirolo veniva applicato in presenza di ST1535, la frequenza degli sEPSCs si riduceva significativamente, mentre la ampiezza di tali eventi sinaptici restava costante. L'effetto di potenziamento dell'ST1535 sulla modulazione D2-mediata della trasmissione corticostriatale glutammatergica era anche evidente in esperimenti in cui venivano studiati i potenziali sinaptici eccitatori evocati da elettrodi di stimolazione posizionati in modo tale da attivare la via corticostriatale.

Lo studio dell'antagonismo funzionale fisiologico esistente tra recettori dell'adenosina A2A e della dopamina D2, documentato a livello comportamentale e molecolare, riveste un ruolo altrettanto interessante applicato a modelli sperimentali che mirano a riprodurre condizioni neuropatologiche.

Uno di tali modelli, impiegato nel corso del nostro progetto di ricerca, è quello che utilizza animali con denervazione dopaminergica nigro-striatale ottenuta mediante applicazione di 6-OHDA, molecola in grado di determinare la morte selettiva dei neuroni dopaminergici della sostanza nera.

È noto che sia il sistema dopaminergico [Calabresi et al. 2007] che il sistema degli endocannabinoidi [Di Filippo et al. 2008] influenzano in maniera cruciale in meccanismi molecolari e sinaptici che sembrano essere alla base dello sviluppo dei sintomi della Malattia di Parkinson. In tale contesto, lo studio dell'interazione funzionale nello striato tra dopamina, endocannabinoidi ed adenosina potrebbe condurre allo sviluppo di composti farmacologici capaci di modulare l'alterata attività striatale in corso di Malattia di Parkinson e quindi risultare in un beneficio terapeutico.

### **Risultati e prodotti conseguiti**

Esperimenti preliminari condotti in tale modello sperimentale di Malattia di Parkinson hanno dimostrato che gli agonisti del recettore D2 dopaminergico (quinpirolo e pramipexolo), che in condizioni di controllo non si dimostrano efficaci nel modulare la trasmissione corticostriatale, sono in grado di produrre una inibizione di tale trasmissione in maniera dose-dipendente. Gli antagonisti dei recettori A2A dell'adenosina (ST e ZM) sono in grado di potenziare tale effetto inibitorio. Il sistema degli endocannabinoidi sembra esercitare un ruolo centrale nella modulazione di tale interazione funzionale. Infatti, un antagonista dei recettori CB1 (AM251) si è dimostrato capace di inibire in modo significativo la depressione dell'attività eccitatoria corticostriatale indotta sia dall'isolata attivazione dei recettori D2 che dalla contemporanea inibizione dei recettori A2A associata all'attivazione D2.

- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M (2007) *Trends in Neurosciences* 30(5): 211-219.
- Di Filippo M, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Rossi A, Calabresi P (2008) *Curr Pharm Des* 14(23): 2337-2346.
- Tozzi A, Tschertter A, Belcastro V, Tantucci M, Costa C, Picconi B, Centonze D, Calabresi P, Borsini F (2007) *Neuropharmacology* 53: 783-789.

### **Attività previste**

Scopi del progetto di ricerca saranno:

- L'ulteriore caratterizzazione di tale interazione funzionale mediante tecniche elettrofisiologiche (registrazioni intracellulari in configurazione sharp e whole-cell patch-clamp) sia in condizioni fisiologiche che in modelli sperimentali Malattia di Parkinson.
- L'individuazione del sito in cui tale interazione ha luogo (pre- vs post-sinaptico).
- Lo studio dell'azione di composti farmacologici (in particolare agonisti D2, antagonisti A2A, agonisti/antagonisti CB1 ed inibitori del catabolismo degli endocannabinoidi) sull'anormale trasmissione glutammatergica corti-

costrittale che accompagna la degenerazione dopaminergica in corso di Malattia di Parkinson.

- Lo studio verrà condotto utilizzando misurazioni elettrofisiologiche su un modello sperimentale animale *in vitro* valutando le variazioni dei potenziali postsinaptici eccitatori e delle correnti glutammatergiche sia spontanee che evocate.

### **C.2.9 – Ruolo della chinasi Mutata nell'Atassia Telangiectasia (ATM) nella modulazione della stabilità proteica ubiquitina-proteosoma dipendente e nella risposta apoptotica indotta da stimolo dei recettori di morte (Daniela Barilà)**

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Atassia Telangiectasia, chinasi ATM, ubiquitinazione.

#### **Descrizione**

L'Atassia Telangiectasia (A-T) è una patologia caratterizzata da degenerazione delle cellule del Purkinje, che determina la progressiva atassia e da una forte compromissione della funzionalità del sistema immunitario che comprende anche un incremento significativo della probabilità di sviluppare tumori, soprattutto a livello del sistema immunitario (linfomi e leucemie). L'A-T è una malattia monogenica caratterizzata da mutazioni su entrambi gli alleli per il gene *atm* che causano l'assenza nei pazienti della proteina corrispondente ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). ATM è una serina-treonina-chinasi-PI-3-kinase-like centrale nella risposta al danno al DNA indotto da rotture a doppio filamento. Questo tipo di danno insorge spontaneamente durante lo sviluppo oppure può essere indotto da fattori ambientali come, le radiazioni ionizzanti. In ogni caso, l'attività chinasi di ATM viene indotta ed è necessaria per trasdurre la fosforilazione di diversi substrati di ATM, modulandone la funzione e contribuendo quindi all'arresto del ciclo cellulare e al riparo del danno oppure all'attivazione della risposta apoptotica. Lo scopo finale di questa risposta è prevenire la replicazione del DNA in presenza di danno e quindi la conseguente instabilità genomica.

Il nostro obiettivo è studiare i meccanismi molecolari con cui ATM previene l'instabilità genomica e partecipa alla risposta apoptotica in condizioni normali e patologiche, in diversi tipi cellulari, in modo da favorire la comprensione del complesso quadro clinico dei pazienti ed identificare nuove possibili strategie di intervento terapeutico. Recentemente abbiamo identificato una nuova funzione di ATM come modulatore dell'apoptosi indotta da stimolo dei recettori di morte tipo Fas e TRAIL. In tale contesto l'attività chinasi di ATM modula la stabilità proteica della proteina antiapoptotica FLIP, favorendone la degradazione ubiquitina-proteosoma dipendente. In tal modo l'attivazione di ATM promuove la morte cellulare indotta da stimolo dei recettori di morte, mentre al contrario la sua inibizione farmacologica o genetica

determina una forte resistenza cellulare all'apoptosi mediata da Fas e TRAIL. Questo meccanismo contribuisce a spiegare alcune manifestazioni fenotipiche associate a genotipo A-T. Ci proponiamo di:

- 1) Definire meglio i meccanismi molecolari con cui ATM modula l'apoptosi indotta da stimolo dei recettori di morte e valutarne il contributo in diversi sistemi tumorali.
- 2) Definire i meccanismi molecolari con cui ATM modula la stabilità proteica ubiquitina-proteosoma dipendente.
- 3) Identificare nuovi target della degradazione ubiquitina-proteosoma dipendente mediata dall'attività chinasi di ATM e valutarne l'espressione in alcuni modelli neuronali.

### **Attività previste**

Abbiamo recentemente identificato ATM come un nuovo modulatore dell'apoptosi mediata dai recettori di morte Fas e TRAIL. ATM modula i livelli della proteina antiapoptotica FLIP favorendone la degradazione attraverso la via dell'ubiquitina-proteosoma. Nel primo anno ci proponiamo di:

- Valutare il ruolo di questo meccanismo molecolare nello sviluppo di approcci terapeutici per diversi sistemi tumorali basati sulla combinazione di TRAIL e diversi agenti che inducono danno al DNA.
- Approfondire il meccanismo molecolare con cui ATM modula l'ubiquitinazione e la degradazione di FLIP, testando il possibile ruolo di alcune E3-ubiquitina ligasi.

### **C.2.10 – Ruolo della proteina di legame agli RNA Sam68 nella atrofia muscolare spinale (SMA) (Claudio Sette)**

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** SMA, Splicing alternativo, Sam68.

### **Descrizione**

#### *Razionale*

L'Atrofia Muscolare Spinale (Spinal Muscular Atrophy, SMA) è una malattia neurodegenerativa che rappresenta la più diffusa causa genetica di mortalità infantile. La malattia si manifesta con alterazioni a livello neuronale che causano una conseguente atrofia del muscolo scheletrico. 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]. 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'e-

scissione dal trascritto maturo. Questa singola sostituzione è alla base della differenza di espressione dei due geni SMN1 ed SMN2 [Monani et al. 1999].

Il trascritto predominante di SMN2 è infatti privo dell'esone 7 e codifica per una proteina tronca ed instabile [Lefebvre et al. 1997]. I pazienti affetti da SMA, di conseguenza, esprimono bassi livelli di proteina 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. Sono state identificate diverse proteine coinvolte nella inclusione o esclusione dell'esone 7 di SMN2. Tra esse, un ruolo principale è svolto dalla proteina Tra2 $\beta$  [Hofmann et al. 2000], che lega uno splicing exonic enhancer e stimola l'inclusione dell'esone, e dalla proteina hnRNP A1, un repressore dello splicing che si lega all'esone 7 di SMN2 e ne favorisce l'esclusione dal trascritto maturo [Kashima and Manley 2003].

Lo splicing alternativo è regolato da complessi multiproteici che legano sequenze limitrofe sui pre-mRNA. È quindi altamente probabile che altri fattori di splicing contribuiscano alla regolazione dello splicing di SMN2. Un possibile candidato è la proteina Sam68, una RNA-binding protein coinvolta in diversi aspetti del metabolismo degli mRNA quali lo splicing, l'esporto ed il rilascio citoplasmatico di mRNA [Lukong, Richard 2003]. Sam68 è in grado di interagire con hnRNP A1 e mediare lo splicing alternativo di alcuni pre-mRNA specifici [Paronetto et al. 2007]. Nella sequenza dell'esone 7 di SMN2 è presente un perfetto sito di legame per Sam68, suggerendo che questa proteina svolga un ruolo in questo evento di splicing. Il seguente progetto di ricerca si propone di studiare il possibile ruolo di Sam68 e della sua interazione con hnRNP A1 nello splicing alternativo di SMN2.

### Obiettivi

1. Verificare attraverso l'uso di minigeni di SMN2 e alleli wild type o mutati di Sam68 il ruolo di questa proteina di legame agli RNA nello splicing alternativo del gene SMN2.

2. Identificare mutazioni in Sam68 che agiscano da dominanti negativi della funzione di questa proteina e verificare la loro capacità di modulare lo splicing alternativo di SMN2.

3. Verificare attraverso l'uso di vettori virali se alterare la funzione di Sam68 *in vivo* abbia un effetto sullo splicing alternativo di SMN2 e sulla espressione della proteina SMN in cellule di pazienti affetti da SMA e in un modello murino della malattia.

Questi esperimenti serviranno a determinare il ruolo di Sam68 nello splicing alternativo di SMN2 e ad identificare un potenziale nuovo bersaglio terapeutico per la cura della SMA.

- Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9618-9623.
- Kashima T, Manley JL (2003) *Nat Genet* 34: 460-463.

- Lefebvre S et al. (1997) *Nat Genet* 16: 265-269.
- Lukong KE, Richard S (2003) *Biochim Biophys Acta* 1653: 73-86.
- Monani UR (2005) *Neuron* 48: 885-896.
- Monani UR et al. (1999) *Hum Mol Genet* 8: 1177-1183.
- Paronetto MP, Achsel T, Massiello A, Chalfant CE, Sette C (2007) *J Cell Biol* 176: 929-939.

### **Attività previste**

- Esperimenti di trasfezione transiente e stabile di alleli di Sam68 e di minigeni di SMN2.
- Esperimenti di co-immunoprecipitazione per verificare la formazione di complessi contenenti Sam68 e identificarne la natura.
- Costruzione di vettori per alleli mutati di Sam68 e SMN2.

### **C.2.11 – Ruolo del pathway molecolare cGMP/PKG e delle PDEs nelle alterazioni della plasticità sinaptica corticostriatale in un modello sperimentale di discinesie da L-DOPA** (Paolo Calabresi)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Plasticità sinaptica, parkinsonismo sperimentale, discinesie.

### **Descrizione**

La Malattia di Parkinson (MP) è un disordine neurologico causato dalla neurodegenerazione delle terminazioni dopaminergiche provenienti dalla Sostanza Nera pars compacta (SNc) che proiettano al nucleo striato. Nonostante che la levodopa (L-DOPA), precursore della dopamina (DA), sia attualmente il trattamento elettivo per la MP, molti pazienti dopo anni di terapia iniziano a sviluppare complicazioni motorie, note nel loro complesso come discinesie, che invalidano ancora di più la vita dei pazienti parkinsoniani. Molti fattori di rischio sono stati postulati per l'insorgenza delle complicazioni motorie da L-DOPA. Tra questi fattori, studi clinici hanno suggerito che il dosaggio giornaliero della L-DOPA può giocare un ruolo importante. La lesione delle fibre nigrostriatali attraverso iniezione di 6-idrossidopamina (6-OHDA) nella SN pars compacta riproduce alcuni aspetti di questa malattia, ma è di sempre maggiore rilevanza riuscire a trovare un giusto modello sperimentale che rappresenti proprio le fasi iniziali della patologia.

La trasmissione dopaminergica nel nucleo striato rappresenta un fattore essenziale per l'induzione della plasticità sinaptica striatale considerata il correlato cellulare dei fenomeni di apprendimento e memoria. Quindi, negli ultimi decenni ci si è concentrati sullo studio delle alterazioni dei fenomeni di plasticità a lungo termine in modelli sperimentali di MP e di discinesie mediante l'uso di registrazioni elettrofisiologiche in fettine cortico-

striatali. Abbiamo dimostrato che entrambe le due principali forme di plasticità sinaptica (potenziamento a lungo termine, LTP e depressione a lungo termine, LTD) del nucleo striato sono perse in seguito alla lesione dopaminergica con 6-OHDA. Mentre l'LTD è ripristinato con l'applicazione *in vitro* di agonisti D1 e D2, l'LTP richiede almeno 4 giorni di trattamento cronico con L-DOPA. Il trattamento cronico con L-DOPA ci dà la possibilità di distinguere due gruppi sperimentali: uno, in cui gli animali parkinsoniani manifestano un miglioramento motorio senza sviluppare movimenti involontari (ratti non discinetici) ed un altro in cui, in seguito a tale trattamento, appaiono movimenti discinetici involontari (ratti discinetici). Confrontando la plasticità sinaptica dei due gruppi abbiamo riscontrato che la stimolazione ad alta frequenza delle afferenze corticali induce un LTP delle sinapsi corticostriatali in entrambi i gruppi di animali. I ratti parkinsoniani non discinetici, così come i ratti di controllo, una volta indotto l'LTP mostrano un depotenziamento della sinapsi in risposta ad una successiva stimolazione a bassa frequenza, che non è stato possibile riscontrare negli animali discinetici. Il depotenziamento è una forma di plasticità sinaptica implicata nel meccanismo del "forgetting" fisiologico [Picconi B et al. (2003) *Nat Neurosci* 6: 501-506]. La mancanza di questa forma di plasticità può avere un ruolo chiave nello sviluppo delle discinesie dal momento che può essere la causa della memorizzazione di informazioni motorie non essenziali. Quindi, qualsiasi cambiamento bidirezionale della plasticità sinaptica (LTP, LTD e depotenziamento) può avere profonde implicazioni nella fisiopatologia dei circuiti dei gangli basali nella MP e nelle discinesie indotte dal trattamento con L-DOPA.

Mentre, è stato effettuato uno studio accurato delle alterazioni dell'LTP e del depotenziamento negli animali discinetici, ad oggi i meccanismi molecolari sottostanti le alterazioni dell'LTD nei ratti che sviluppano discinesie non sono stati chiariti e caratterizzati in maniera approfondita.

È noto che gli interneuroni NOs positivi striatali rappresentano, insieme ai neuroni di proiezione, il sottotipo neuronale che stimolato dal rilascio di dopamina attraverso i recettori D1 è coinvolto nell'induzione dell'LTD. Il tono striatale di ossido nitrico (NO) regola l'attività di base e la responsività dei neuroni dopaminergici agli inputs della corteccia e dello striato. Inoltre, il signaling dell'NO striatale può giocare un ruolo chiave nell'integrazione delle informazioni trasmesse ai centri output dei gangli della base attraverso la via corticostriatale e le afferenze striatali. La via molecolare GC/cGMP/PKG rappresenta una delle vie di secondi messaggeri che regolano l'induzione dell'LTD dei neuroni spinosi. Infatti, il NO rilasciato dagli interneuroni NOs positivi, diffondendo nella membrana cellulare dei neuroni spinosi aumenta i livelli intracellulari di cGMP attraverso l'attivazione della guanilato ciclasi solubile (sGC) risultando nell'attivazione della proteina chinasi G (PKG) che regola l'induzione dell'LTD. I neuroni spinosi striatali presentano alti livelli di sGC e fosfodiesterasi (PDEs) che metabolizzano il cGMP con alta efficacia.

L'applicazione *in vitro* dell'inibitore delle PDEs, zaprinast, induce nei neuroni spinosi registrati da fettine corticostriatali una depressione farmacologica a lungo termine della trasmissione sinaptica come conseguenza degli

aumentati livelli di cGMP. Infatti i livelli di questo nucleotide sono cruciali nell'attività della PKG e della proteina DARPP-32 che controlla infine i livelli di attivazione del recettore AMPA, il protagonista chiave nell'induzione dell'LTD dei neuroni spinosi.

### **Attività previste**

- Scopo della *I fase* della ricerca è il perfezionamento di un modello con 6-OHDA che ci permetta di indurre uno stadio precoce della malattia per poter studiare il progredire dei sintomi motori con le alterazioni di plasticità sinaptica.
- Nella *II e III fase* della ricerca studieremo l'andamento delle discinesie e delle alterazioni della plasticità sinaptica in ratti 6-OHDA trattati con regimi differenti di L-DOPA. Inoltre, studieremo l'LTD nei neuroni registrati dai ratti che sviluppano movimenti discinetici con particolare interesse al ruolo della via del cGMP e degli inibitori delle PDEs come possibili agenti terapeutici, visto il coinvolgimento di questa via nei meccanismi di induzione di questa forma di plasticità sinaptica.

### **C.2.12 – Studio di nuove strategie per l'intercettazione del danno mitocondriale indotto dalle sod1 mutanti associate alla Sclerosi Laterale Amiotrofica di tipo familiare** (*Maria Teresa Carri*)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** SOD1, SLA, mitocondri.

**Altri Enti coinvolti:** Università di Sassari.

### **Descrizione**

Recenti studi indicano che le superossido dismutasi mutanti (mutSOD1) tipiche di pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA) causano la comparsa del fenotipo di danno motoneuronale nei pazienti mediante aggregazione e/o alterazioni dello stato redox intra-mitocondriale<sup>[1]</sup>.

In particolare, abbiamo recentemente concluso uno studio dei segnali che sono in grado di indurre l'aggregazione ed un aumento di accumulo nel compartimento mitocondriale delle mutSOD1. Utilizzando un modello cellulare costituito dalla linea motoneuronale murina NSC34 trasfettata per l'espressione inducibile di diverse SOD1 mutanti, abbiamo dimostrato che la tendenza di queste proteine ad associarsi ai mitocondri, che si riflette in un deficit energetico che innesca processi di morte neuronale è strettamente dipendente dalle proprietà biochimiche della frazione di proteina mutata localizzata all'interno del mitocondrio<sup>[2-5]</sup>.

Questi dati sono in accordo con recenti pubblicazioni sulla esistenza di un danno primario mitocondriale, che presumibilmente determina l'esordio (anche sub-clinico) dei sintomi. Questo suggerisce che un approccio terapeutico

tico possibile debba rivolgersi all'intercettazione precoce della disfunzione mitocondriale.

### Obiettivo

Obiettivo del progetto è di indagare sulla possibilità di intercettare mediante manipolazioni genetiche il danno mitocondriale causato dalla espressione di mutSOD1. In particolare, studieremo l'effetto della iperespressione di Grx1 e Grx2 (glutaredoxina 1 e 2), due enzimi che regolano lo stato redox dei tioli intracellulari e della ablazione genetica di pShc66, una proteina che controlla i livelli di stress ossidativo e la funzionalità mitocondriale. Utilizzeremo sia modelli *in vitro* (cellule motoneuronali murine e neuronali umane, modificate per l'iperespressione di mutSOD1) che modelli *in vivo* (topi transgenici che iperesprimono mutSOD1). In questi modelli verranno valutati sia parametri di funzionalità mitocondriale (metabolismo energetico, metabolismo del calcio, polarizzazione di membrana, induzione di apoptosi mitocondrio-dipendente) che (nei topi) parametri motori, esordio dei sintomi e sopravvivenza.

1. Cozzolino M, Ferri A, Carrì MT (2008) *Antioxid Redox Signal* 10(3): 405-443.
2. Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Gralla EB, Rotilio G, Valentine JS, Carrì MT (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103(37): 13860-13865.
3. Ferri A, Nencini M, Cozzolino M, Carrara P, Moreno S, Carrì MT (2008) *Neurobiol Dis* 32(3): 454-460.
4. Cozzolino M, Amori I, Pesaresi MG, Ferri A, Nencini M, Carrì MT (2008) *J Biol Chem* 283(2): 866-874.
5. Cozzolino M, Pesaresi MG, Amori I, Crosio C, Ferri A, Nencini M, Carrì MT (2009) *Antioxid Redox Signal* Apr 3 [Epub ahead of print].

### Attività previste

- Messa a punto dei modelli *in vivo* ed *in vitro*.
- Test preliminari di caratterizzazione.

### C.2.13 – Studio molecolare e funzionale dei recettori purinergici P2 nel sistema nervoso e patologie neurodegenerative/neuroinfiammatorie (Cinzia Volonté)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Neuron, microglia, oligodendrociti, ATP extracellulare.

**Altri Enti coinvolti:** Consiglio Nazionale delle Ricerche.

### Descrizione

L'ATP extracellulare presente in modo ubiquitario in diversi tipi cellulari, organi e tessuti agisce come neurotrasmettitore, neuromodulatore o fattore sia trofico sia tossico, svolgendo importanti funzioni biologiche che

spaziano dal differenziamento allo sviluppo, dalla duplicazione alla morte cellulare.

È quindi coinvolto in svariate e diverse funzioni fisiologiche quali ad esempio spermatogenesi, neurogenesi, contrazione muscolare, secrezione epiteliale, aggregazione piastrinica. Di conseguenza, l'alterazione dei meccanismi purinergici innescati dall'ATP extracellulare contribuisce all'eziologia molecolare di diverse condizioni patologiche, fra le quali soprattutto tumori, traumi, ischemia, disordini neurodegenerativi, e disfunzioni di tipo infiammatorio mediate dal sistema immunitario.

I recettori purinergici P2 selettivi per l'ATP ed altri nucleotidi extracellulari sono notevolmente conservati a livello filogenetico e sono anch'essi ampiamente distribuiti in vari fenotipi cellulari appartenenti a vari organi e tessuti, compreso il sistema nervoso centrale e periferico. La famiglia dei recettori purinergici P2 si divide in due sottofamiglie: recettori ionotropici ad attivazione veloce, denominati P2X, dei quali sono stati fino ad ora identificate sette subunità diverse (P2X1-7), e recettori metabotropici accoppiati alle proteine G, denominati P2Y, dei quali sono state clonate otto subunità fra loro differenti (P2Y1-2, 4, 6, 11-14). Pur essendo distinti da caratteristiche farmacologiche ben definite, da diversa struttura primaria-terziaria, ulteriori eterogeneità fra tali recettori si manifestano anche a livello di struttura quaternaria.

Nel nostro laboratorio, abbiamo dimostrato che l'ATP extracellulare esplica una diretta azione tossica nel sistema nervoso centrale ed è in grado di aggravare il danno neuronale di tipo eccitotossico ed ipoglicemico/ipossico. Conseguentemente, in vari modelli cellulari di colture primarie ed organotipiche, abbiamo dimostrato che vari antagonisti dei recettori P2 sono neuroprotettivi sia verso elevate concentrazioni di glutammato, sia verso fenomeni apoptotici, sia verso ipoglicemia ed ipossia chimica.

Il presente progetto di ricerca si prefigge pertanto di analizzare ulteriormente alcuni dei meccanismi molecolari che coinvolgono i recettori P2 e contribuiscono alla neurodegenerazione in modelli *in vitro* ed *in vivo*.

### **Attività previste**

In studi precedenti abbiamo dimostrato che l'espressione eterologa della subunità recettoriale metabotropica di tipo P2Y4, in colture cellulari di neuroblastoma umano SH-SY5Y, a breve termine induce differenziamento neuronale, ma in seguito ad una prolungata attivazione del recettore stesso con l'agonista specifico UTP, causa morte cellulare. Inoltre, abbiamo dimostrato che il recettore P2Y4 è in grado di associarsi in complessi etero-oligomericici con vari recettori purinergici P2Y, ed in particolare con il recettore P2Y6, attivato da UTP. Infine, è noto che i nucleotidi extracellulari, compreso l'UTP, vengono rapidamente degradati ad opera delle numerose attività ectonucleotidasiche associate alla membrana plasmatica di svariati tipi cellulari, generando quindi ligandi di- e mono- fosfati.

Pertanto, durante il primo anno di svolgimento del presente progetto di ricerca, analizzeremo il ruolo del recettore metabotropico P2Y6 in colture cel-

lulari di neuroblastoma umano SH-SY5Y. In seguito ad espressione eterologa del recettore, ne verificheremo:

- la presenza, attraverso PCR ed immunofluorescenza;
- la funzionalità attraverso misurazioni fluorimetriche di Ca<sup>2+</sup> intracellulare.

Analizzeremo quindi gli effetti della stimolazione del recettore P2Y<sub>6</sub> con il ligando specifico UDP:

- sul ciclo cellulare, tramite incorporazione di propidio di ioduro ed analisi citofluorimetrica;
- sull'induzione di apoptosi/necrosi, tramite marcatura con annessina/propidio di ioduro;
- sulla frammentazione nucleare, tramite marcatura con Hoechst;
- sulla modulazione di parametri intracellulari quali attivazione di caspasi 3 e 7, rilascio di citocromo c dai mitocondri, attivazione dell'enzima MnSOD.

I risultati che conseguiremo durante il primo anno ci permetteranno quindi di comprendere come le dinamiche recettoriali di tipo purinergico P<sub>2</sub>, ed in particolare il coinvolgimento della subunità recettoriale P2Y<sub>6</sub>, possano modulare alcuni eventi di tipo fisiopatologico in cellule tumorali di neuroblastoma umano.

### **C.3 – STUDIO MULTIDISCIPLINARE DELL'IMMUNOPATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA**

#### **C.3.1 – Modulazione del rapporto tra cellule T regolatorie/Thelper17 da parte di cellule presentanti l'antigene nella sclerosi multipla** (Luca Battistini)

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Sclerosi Multipla, linfociti T, immunoregolazione.

#### **Descrizione**

La sclerosi multipla (MS) è una malattia autoimmune la cui patologia è mediata da cellule T infiammatorie mielina-specifiche. I meccanismi iniziali responsabili dell'infiammazione scatenata dalle cellule T non sono ancora noti. Poiché le cellule presentanti l'antigene (APC) giocano un ruolo cruciale nell'attivazione delle cellule T, si ipotizza un loro coinvolgimento nella induzione della risposta delle cellule T, che ha luogo nei pazienti MS. In malattie autoimmuni, la risposta immune mediata dalle cellule T helper (Th) 17 è patogena, mentre la presenza di cellule T regolatorie (Treg), che sopprimono le funzioni delle cellule T effettrici, potrebbe avere un ruolo protettivo. Il differenziamento di cellule T CD4 naive in Th17 infiammatorie o Treg soppressive è regolato da un delicato equilibrio di citochine. TGF- $\beta$  come singolo stimolo, stimola la polarizzazione verso un profilo Treg, mentre la copresenza di citochine infiammatorie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 determina un cambiamento verso il profilo Th17. Nei pazienti MS si osserva un incremento del rapporto tra cellule Th17/Treg che suggerisce un antagonismo funzionale, così come una dicotomia nella generazione tra cellule Treg e Th17.

Lo scopo di questo progetto è quello di studiare il ruolo delle cellule APC nella modulazione del rapporto Th17/Treg nel corso della patologia MS. Innanzitutto si studieranno le differenti popolazioni di APC (monociti, cellule B, dendritiche, dendritiche plasmacitoidi) nel sangue dei pazienti MS, seguendo l'espressione di specifici recettori di membrana. Quindi procederemo alla purificazione delle APC e stimolazione ex vivo con un agonista, come resiquimod R848, che lega i Toll like receptor (TLR) 7/8, presenti su tutte le APC. L'intero profilo trascrizionale permetterà di selezionare geni differenzialmente espressi nei pazienti MS rispetto ai donatori sani, che potrebbero essere coinvolti nell'attivazione delle cellule T naive durante la patologia dell'MS. Per chiarire il ruolo di tali molecole nella polarizzazione T, coltiveremo APC con cellule T naive, dopo aver neutralizzato in modo specifico le molecole selezionate dall'analisi trascrizionale. La polarizzazione Th sarà valutata analizzando l'espressione di molecole di superficie, citochine e fattori trascrizionali specifici per Th17 o Treg. Inoltre, poiché molecole delle APC importanti per la polarizzazione Th, sono spesso localizzate a livello della

sinapsi immunologica, studieremo la loro localizzazione all'interfaccia APC/cellula T durante la co-coltura. Infine, tali risultati ci permetteranno di identificare meccanismi molecolari usati dalle APC per indurre la risposta delle cellule T durante MS. L'identificazione di molecole chiave nel controllo del rapporto Th17/Treg potrebbe aprire prospettive per la modulazione farmacologica della risposta immune verso una direzione anti-infiammatoria, nella patologia MS.

### **Attività previste**

Caratterizzazione fenotipica e funzionale di cellule monocitarie e cellule dendritiche che svolgono la funzione di "Antigen presenting Cells" (APC) in individui sani e in pazienti affetti da Sclerosi Multipla.

### **C.3.2 – Ruolo dei mediatori dell'infiammazione nelle alterazioni sinaptiche della sclerosi multipla e della sclerosi multipla sperimentale (Diego Centonze)**

**Anno d'inizio:** 2009

**Durata in mesi:** 36

**Parole chiave:** Sclerosi multipla, citochine, trasmissione sinaptica.

### **Descrizione**

La classica distinzione tra disordini infiammatori e neurodegenerativi del sistema nervoso centrale (SNC) sta svanendo parallelamente alla migliorata comprensione dell'intima natura dei processi patologici che ne sono alla base. I processi infiammatori hanno un ruolo importante nella fisiopatologia dei disordini primariamente degenerativi, e la neurodegenerazione complica i disturbi primariamente infiammatori del cervello e del midollo spinale come la sclerosi multipla (SM). Una complessa interazione tra sistema immunitario e funzione/disfunzione neuronale sta emergendo. A questo proposito, il sistema endocannabinoide e specifiche citochine quali il tumor necros factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e la interleuchina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) sembrano avere un ruolo importante: possono infatti interagire con molteplici mediatori cellulari e molecolari della neuroinfiammazione, modulare l'attività della microglia, e la sensibilità neuronale alla attivazione di recettori di membrana per il glutammato o il GABA. Tuttavia nessuno studio si è occupato di chiarire il loro ruolo nelle alterazioni neuronali che hanno luogo in corso di SM e di SM sperimentale.

Il tentativo con questo progetto di ricerca è pertanto di colmare questa lacuna studiando gli effetti di perturbazioni sia genetiche che farmacologiche del sistema endocannabinoide e della attività delle citochine TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  nella fisiopatologia di una classica malattia neuroinfiammatoria, l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAS, modello murino di SM). I dati ottenuti sul modello animale di SM saranno affiancati a dati analoghi ottenuti dallo studio del ruolo del sistema endocannabinoide, del TNF $\alpha$  e della IL1 $\beta$  in pazienti con SM.

### Attività previste

Lo studio inizierà con la caratterizzazione del ruolo del sistema endocannabinoide nella SM e nella SM sperimentale.

- Indagine del coinvolgimento del sistema endocannabinoide nelle diverse fasi e nelle diverse varianti cliniche della SM. Abbiamo recentemente dimostrato [Centonze et al. 2007a,b] che durante la fase di attività clinica della SM, il sistema endocannabinoide si attiva all'interno del cervello e nelle cellule immunitarie, così da portare ad un notevole aumento della produzione di anandamide. Intendiamo proseguire tale studio validando sul liquor e sangue periferico di pazienti con SM l'utilità del dosaggio di tale endocannabinoide come indicatore delle diverse fasi e dei diversi sottogruppi di malattia (RR, SP e PP).

- Strettamente legato al punto precedente, intendiamo indagare il ruolo funzionale della anandamide prodotta in corso di SM. A tale scopo, indurremo la SM sperimentale in topi geneticamente modificati, in modo da esprimere livelli di anandamide fino a 15 volte superiori alla norma. In tali topi valuteremo se l'induzione della SM sperimentale causerà deficit neurologici ed alterazioni neurofisiologiche più gravi o meno gravi che nei topi di controllo. In tal modo, verificheremo se l'anandamide esercita un ruolo protettivo oppure tossico in corso di SM. Esperimenti simili verranno condotti in topi che presentano aumentati livelli di anandamide solo nel sistema immunitario ma non nel cervello, allo scopo di verificare se l'eventuale effetto protettivo di tale endocannabinoide sullo sviluppo della SM è dipendente o meno dalla sua azione immunomodulante oppure da quella puramente neuroprotettiva. Il ruolo dei recettori per i cannabinoidi nello sviluppo della SM verrà inoltre valutato attraverso l'induzione di SM sperimentale in topi transgenici che mancano di specifici recettori per gli endocannabinoidi (CB1, CB2), o che manchino dei recettori CB1 solo su specifiche popolazioni neuronali (neuroni glutammatergici o GABAergici).

- Valuteremo inoltre il ruolo della possibile interazione tra endocannabinoidi e neurotrofine in pazienti con SM. Esiste una notevole mole di dati scientifici a favore del coinvolgimento delle neurotrofine, e soprattutto del BDNF (brain-derived neurotrophic factor) nel danno neurodegenerativo [Hennigan et al. 2007]. Dati più recenti provenienti anche dal nostro gruppo, inoltre, hanno individuato nel recettore CB1 per gli endocannabinoidi un ulteriore importante determinante nel danno neurodegenerativo in corso di SM [Centonze et al. 2007a, b]. A tal proposito è interessante notare che l'azione neuroprotettiva del BDNF e dei recettori CB1 non sono slegate, poiché è stato dimostrato che la stimolazione dei recettori CB1 è in grado di aumentare notevolmente la produzione di BDNF nel cervello. Nella popolazione umana normale esistono alcune piccole differenze (polimorfismi), tanto nei geni che codificano per il BDNF quanto in quelli per il recettore CB1. Tali polimorfismi danno luogo a delle proteine con proprietà sensibilmente differenti. Per quanto riguarda il BDNF, esistono solide evidenze a sostegno dell'ipotesi che soggetti che esprimono alcune varianti di tali geni presentano una maggiore suscettibilità al danno neuronale, mentre non sono ancora disponibili dati

simili a proposito dei polimorfismi del recettore CB1. Che tali polimorfismi possano dare origine a recettori con proprietà differenti è tuttavia ampiamente documentato, così come l'associazione tra specifici polimorfismi del gene per il recettore CB1 e lo sviluppo di disturbi neuropsichiatrici quali la depressione, il disturbo post-traumatico da stress e il disordine da deficit di attenzione e iperattività.

Intendiamo, pertanto, verificare se esiste una associazione tra rischio di sviluppare la SM, gravità clinica e tipologia di malattia e specifici polimorfismi dei geni per il BDNF e di quelli per il recettore CB1, attraverso l'analisi genetica di diverse centinaia di soggetti con SM e di soggetti normali. Su tali soggetti effettueremo anche dosaggi ematici e liquorali dei livelli delle sostanze endocannabinoidi e correlereemo tali valori con diversi indici clinici e strumentali di gravità di malattia. In particolare, effettueremo le seguenti valutazioni cliniche, neurofisiologiche e di imaging, allo scopo di acquisire indicazioni sull'entità dell'attività infiammatoria e sull'entità del danno degenerativo, in relazione alle alterazioni centrali e periferiche del sistema endocannabinoide.

- Centonze D, Bari M, Rossi S, Prosperetti C, Furlan R, Fezza F, De Chiara V, Battistini L, Bernardi G, Bernardini S, Martino G, Maccarrone M (2007a) *Brain* 130(Pt 10): 2543-2553.
- Centonze D, Finazzi-Agrò A, Bernardi G, Maccarrone M (2007b) *Trends Pharmacol Sci* 28(4): 180-187.
- Hennigan A, O'Callaghan RM, Kelly AM (2007) *Biochem Soc Trans* 35(Pt 2): 424-427.