



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

XXII CICLO

**Effetti degli amminoacidi a catena ramificata (BCAA)
sull'eccitabilità di neuroni corticali in coltura primaria e
confronto con il modello murino di Sclerosi Laterale
Amiotrofica, G93A.**

Livia Curcio

A.A. 2009/2010

Docente Prof. Cristina Zona

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

Indice

INDICE	2
INTRODUZIONE	4
1 LA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA	4
1.1 Ipotesi patogenetiche di SLA	7
1.1.1 SOD1 (Cu/Zn-Superossido dismutasi)	8
1.1.2 Alterazioni mitocondriali, vacuolizzazione e stress ossidativo	12
1.1.3 Anormalità citoscheletriche e aggregazione proteica	13
1.1.4 Meccanismi intercellulari nella patogenesi della SLA	14
1.1.5 Danno eccitossico	15
1.1.6 I canali ionici nella SLA	18
1.1.7 Fattori di rischio ambientali	22
1.2 Attività fisica e insorgenza di SLA	25
1.3 Ipotesi di SLA nei calciatori in Italia	27
1.4 Integrazione alimentare durante l'attività sportiva	30
1.5 Amminoacidi a catena ramificata	30
1.6 Metabolismo e fabbisogno umano di BCAA	32
1.7 Gli amminoacidi a catena ramificata nel SNC ed effetto sui meccanismi di fatica centrale	35
1.8 Possibile implicazione dei BCAA nella SLA	39
2 IL COMPLESSO MTOR (MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN)	42
3 I CANALI IONICI VOLTAGGIO-DIPENDENTI E LA TRASMISSIONE SINAPTICA	50
3.1 Genesi ionica dei potenziali d'azione	51
3.2 I canali ionici del sodio voltaggio dipendenti	51
3.3 I canali ionici del calcio Voltaggio dipendenti	56
SCOPO DELLO STUDIO	60

4	MATERIALI E METODI	63
4.1	Colture cellulari	63
4.2	Trattamento delle cellule corticali	67
4.3	Registrazione elettrofisiologiche	68
4.3.1	La tecnica del Patch-Clamp	68
4.3.2	Configurazioni	70
4.3.3	Current-clamp e Voltage-clamp	71
4.3.4	Le proprietà elettriche della membrana cellulare	73
4.3.5	Elettrodi e soluzioni	74
4.3.6	Apparato sperimentale	78
4.4	Analisi dei dati	79
5	RISULTATI	81
5.1	Effetto dei BCAA sulle proprietà passive e attive di neuroni corticali	81
5.2	Specificità dell'effetto di BCAA	84
5.3	Effetto della Rapamicina	87
5.4	Confronto con il modello G93A	90
5.5	Effetto dell'esposizione di BCAA sulla funzionalità dei canali ionici voltaggio-dipendenti	92
5.5.1	Studio dei canali ionici voltaggio-dipendenti del Sodio: corrente transiente e persistente	92
5.5.2	Caratterizzazione farmacologica dei canali ionici del calcio voltaggio dipendenti	96
6	DISCUSSIONE	100
7	BIBLIOGRAFIA	106

Introduzione

1 La Sclerosi Laterale Amiotrofica

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia progressiva che colpisce i motoneuroni, cioè le cellule nervose sia a livello corticale (I° motoneurone) che del midollo spinale (II° motoneurone) che comandano il movimento dei muscoli. La morte dei motoneuroni altera la funzionalità del muscolo scheletrico, causando paralisi e atrofia muscolare. I disturbi variano a seconda della parte del corpo colpita. Spesso la mancanza di forza è il primo sintomo che può manifestarsi con affaticamento, debolezza di una mano, di una gamba (“ipostenia”) o come debolezza dei muscoli che permettono di parlare (“disartria”) o di deglutire (“disfagia”).

L’esistenza di una sindrome caratterizzata da un deficit motorio progressivo degli arti associato ad atrofia muscolare fu confermata nella comunità medica nella metà del diciannovesimo secolo. Il Dr. François Aran pubblicò la descrizione della sindrome nel 1848 e ipotizzò che avesse radici neurologiche. Dopo di lui parecchi medici continuarono lo studio della malattia conosciuta ormai come “atrofia muscolare progressiva”. Il Dr. Jean Martin Charcot nel 1874 evidenziò delle differenze rispetto alla malattia studiata da Aran, sia per la precoce compromissione bulbare che per la presenza di spasticità.

Tale quadro clinico venne denominato “Sclerosi Laterale Amiotrofica” (SLA). La SLA è anche conosciuta con il nome di “malattia di Lou Gehrig”. Questo personaggio fu un grande campione di baseball dei New York Yankees che si ammalò di questa malattia nel 1939 (Brown, 1997).

Il termine di sclerosi laterale si riferisce alla consistenza dura del midollo spinale che si riscontra all’esame autoptico dei pazienti e che è dovuta alla proliferazione di astrociti ed alla presenza di cicatrici fibrose nelle colonne laterali del midollo spinale. Queste fibrosità sono l’espressione

dell'alterazione dei tratti cortico-spinali in cui decorrono gli assoni dei motoneuroni superiori che provengono dalla corteccia motoria e dal tronco dell'encefalo e che terminano nelle corna anteriori del midollo spinale, a ridosso dei motoneuroni inferiori. Il termine *amiotrofica* è sinonimo di atrofia muscolare neurogenica, a sottolineare l'origine neurologica della paralisi che caratterizza la malattia (Fig. 1).

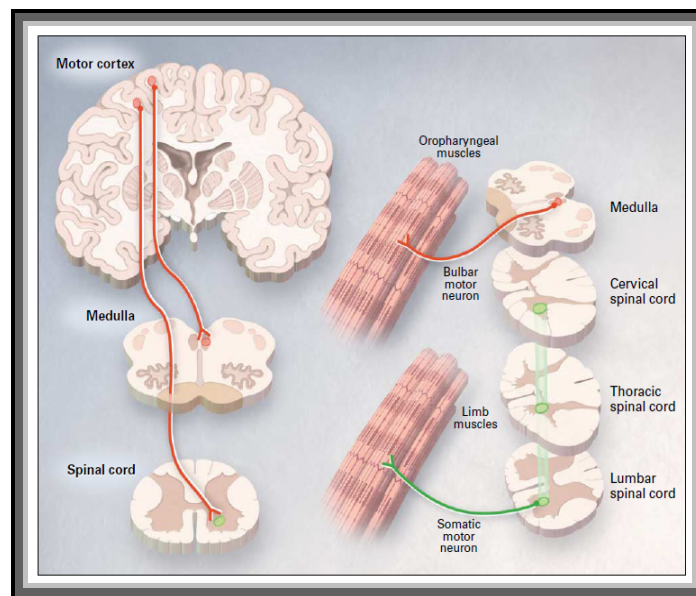


Fig.1 Vie nervose che risultano danneggiate nella SLA (da Rowland, 2001)

Sebbene la degenerazione dei motoneuroni (Fig. 2) sia progressiva dalla corteccia, al tronco encefalico ed alle corna anteriori, alcuni motoneuroni restano indenni, in particolare quelli dei muscoli oculari e quelli deputati al controllo volontario degli sfinteri vescicali (Kandel et al., 1991).

I primi sintomi variano da un individuo all'altro ma in genere consistono in alterazioni motorie, affaticamento delle braccia e delle gambe, difficoltà nel parlare, crampi muscolari. Le mani sono colpite per prime rendendo così difficili le normali attività quotidiane e, soprattutto, l'esecuzione dei movimenti fini come scrivere a macchina, afferrare una palla, contare monete. Con il progredire della malattia si ha paralisi completa degli arti e diventa

difficile deglutire, masticare e parlare. La paralisi dei muscoli respiratori rende infine necessaria la ventilazione assistita ed è una causa frequente di morte. La notevole selettività della morte neuronale fa in modo che vengano risparmiate le componenti sensitive e cerebrali necessarie alle funzioni cognitive.

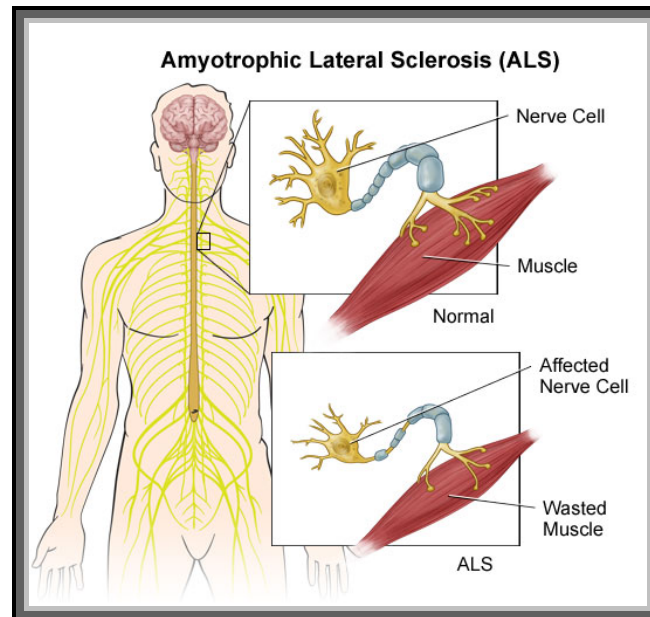


Fig. 2 Differenza tra il muscolo e il neurone spinale in condizioni normali e durante la patologia. Progressivamente la fibra nervosa degenera e il tono muscolare diminuisce.

Questo comporta che il malato assista in piena lucidità alla perdita progressiva delle proprie capacità motorie (Harrison et al., 1995). E' stata tuttavia riscontrata demenza frontotemporale, in circa il 2-3% dei pazienti, caratterizzata da profondi cambi della personalità. Questo fenomeno è più comune tra quelli con una storia familiare di demenza e sembra essere più comune di quanto pensato in precedenza (Brown, 1997).

La SLA è una patologia che colpisce più frequentemente gli individui di sesso maschile e che insorge abitualmente tra i 50 e i 60 anni. L'incidenza annuale è di 1,7 casi per 100.000 abitanti (Worms, 2001). L'esito della SLA è sempre fatale, in un periodo medio di 2-3 anni. Il 90% dei casi appartengono alla

forma sporadica della malattia (sSLA). Il restante 10% dei casi appartengono alla forma familiare (fSLA) che si trasmette con modalità autosomica dominante ad alta penetranza o con penetranza ed espressività variabili. Clinicamente la fSLA è simile alla forma sporadica ma il debutto agli arti inferiori è più frequente e il deterioramento mentale è presente nel 15% dei casi (Fazio e Loeb, 1999). Esiste anche una rara forma giovanile che si trasmette con modalità autosomica recessiva. L'esordio della malattia si manifesta in età infantile (età media 3-5 anni) e sembra essere provocata dalla mutazione del gene ALS2 che codifica per una proteina importante nella formazione del citoscheletro. La sopravvivenza è di circa 15 anni (Rabin et al., 1999).

1.1 Ipotesi patogenetiche di SLA

L'eziologia e la patogenesi della SLA sono attualmente in gran parte sconosciute. Essa viene considerata una malattia degenerativa multifattoriale, nella quale la morte cellulare è conseguente alla complessa interazione di diverse componenti, la cui importanza può variare nei differenti sottogruppi di pazienti (Shaw and Eggett, 2000). Gli attuali studi molecolari sulla SLA, infatti, focalizzano l'importanza dei fattori genetici (Majoor-Krakauer et al., 2003), in associazione con fattori ambientali (traumi, attività fisica intensa, agenti chimici, shock elettrici, metalli pesanti, agenti infettivi etc.) nell'attivazione del processo patologico (Cozzolino et al., 2008).

In particolare tra i fattori genetici, sono state identificate circa 135 mutazioni del gene che codifica per l'enzima *rame/zinco superossido dismutasi* (SOD1), (Soriani and Desnuelle, 2009), le quali potrebbero innescare diversi fenomeni osservati nella patologia come: stress ossidativo, tossicità da glutammato, autoimmunità, aggregati proteici (inclusioni), disorganizzazione dei filamenti

intermedi, modificazioni del sistema di trasporto assonale anterogrado e retrogrado, attivazione della microglia e interazione con le cellule neuronali, infiammazione e de-regolazione dei fattori di crescita. Infine sono stati riscontrati aumenti del calcio intracellulare e attivazione delle vie apoptotiche come ulteriori meccanismi coinvolti nella neurodegenerazione osservata nei pazienti SLA .

1.1.1 SOD1 (Cu/Zn-Superossido dismutasi)

Gli studi sull'etiologia della SLA hanno portato negli anni novanta all'identificazione di una mutazione genetica a carico dell'enzima *rame/zinco* superossido dismutasi, riscontrata nel 20% dei pazienti affetti da fSLA (Rosen et al., 1993) e occasionalmente da pazienti sSLA (Orrell, 2000). La *rame/zinco* superossido dismutasi, prodotto del gene *sod1*, è il principale enzima antiossidante localizzato prevalentemente nel citosol, nel nucleo, nella membrana mitocondriale degli eucarioti e nello spazio periplasmatico dei procarioti. Negli eucarioti esiste anche un'altra superossido dismutasi, caratterizzata da un atomo di manganese, localizzata nei mitocondri e prodotta dal gene *sod2*.

Il gene *sod1* è localizzato sul cromosoma 21, consiste di 5 esoni e codifica per una catena peptidica di 153 amminoacidi (16 KDa). L'enzima eucariotico è un omodimero di 32 kDa, con una sequenza altamente conservata e caratterizzato da siti di legame per rame e zinco e da ponti disolfuro in ognuna delle due subunità (Valentine and Hart, 2003) (Fig. 3).



Fig. 3 Struttura cristallina del legame dimerico di SOD1 umano. Gli ioni di rame e zinco sono mostrati rispettivamente come sfere blu e arancione. Il loop di zinco è colorato in arancione. Il loop elettrostatico in verde (da Valentine S. et al, 2005)

Questo enzima catalizza la dismutazione del superossido (O_2^-), prodotto principalmente per errori durante la fosforilazione ossidativa mitocondriale, e produce perossido d'idrogeno (H_2O_2) e acqua (H_2O) riducendo i livelli di superossido e limitando, quindi, lo stress ossidativo. La reazione è catalizzata in due passaggi asimmetrici tramite un atomo di rame che è alternativamente ridotto e ossidato dal superossido.

La SOD1 è largamente espressa nel sistema nervoso centrale dei mammiferi e rappresenta circa l'1% di tutte le proteine del cervello. E' difficile ricondurre l'espressione ubiquitaria di questo enzima alla degenerazione selettiva dei motoneuroni. Questi ultimi, normalmente, presentano un contenuto notevolmente elevato di proteina SOD1 rispetto a tutte le altre cellule del sistema nervoso (Shaw and Eggett, 2000). La localizzazione immunoistochimica della SOD1 nei motoneuroni rivela la sua presenza nel corpo cellulare e nei processi assonali che si estendono verso la giunzione neuromuscolare (Pardo et al., 1995). Le prime ricerche effettuate sul sangue dei pazienti SLA suggerivano una riduzione dell'attività di questo enzima e si riteneva quindi che questa fosse la causa della malattia (Rosen et al., 1993).

Successivi studi hanno però smentito questa ipotesi. Le mutazioni a carico della SOD1 determinerebbero l'acquisizione di una o più funzioni tossiche (*gain-of function*) a carico dell'enzima, piuttosto che una semplice diminuzione della capacità di "scavenging" dello ione superossido (Cudkowicz et al., 1997). Infatti, tutt'ora il modello sperimentale di SLA più simile alla forma umana familiare e più utilizzato è il topo transgenico G93A (Fig. 4), in cui l'enzima SOD1 presenta una mutazione puntiforme Glicina⁹³→ Alanina pur mantenendo elevati i livelli di attività enzimatica (Gurney et al., 1994). In questo modello si riscontra un aumento della funzione perossidasi con un conseguente aumento della formazione di radicali liberi rapidamente rispetto alla proteina *wild-type*.

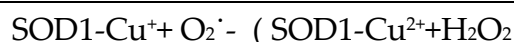
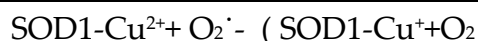


Fig. 4 Fenotipo del modello animale di fSLA, G93A (destra) alla fine della malattia (circa 4 mesi e mezzo), rispetto al topo non transgenico *wild-type* (sinistra). Si osservano evidenti segni alle zampe posteriori (freccia rossa) e perdita del tono muscolare (freccia bianca).

Questo dato è stato confermato anche da altri studi condotti su topi transgenici che sviluppavano la SLA. Questi topi esprimevano altre differenti mutazioni del gene *sod1* le quali causavano un'attività enzimatica SOD1 uguale o superiore alla condizione *wild-type* (Wong et al., 1995) o non producevano alcuna attività enzimatica (Bruijn et al., 1997). Infine è stato dimostrato che topi privi dell'enzima SOD1 non presentavano la degenerazione dei motoneuroni (Reaume et al., 1996). Da questi diversi lavori risulta quindi che diverse mutazioni a carico dell'enzima SOD1 determinano l'acquisizione da parte di questo enzima di proprietà tossiche, responsabili

dell'insorgenza della SLA, indipendenti dal livello di attività dell'enzima stesso (Fig. 5) (Cleveland, 1999). Le mutazioni a carico di questo gene sono principalmente sostituzioni di amminoacidi. Inizialmente si era ipotizzato che tutte le mutazioni fossero localizzate sull'asse principale del dimero della SOD1 ma gli studi successivi hanno evidenziato una distribuzione casuale delle mutazioni nella struttura primaria e terziaria dell'enzima. Tre mutazioni alterano uno dei quattro residui che coordinano il rame, e almeno sette causano modificazioni dello schema di lettura degli esoni (splicing), determinando il taglio degli ultimi venti o trenta amminoacidi (Cleveland and Rothstein, 2001). La relazione tra le mutazioni del gene SOD1 e la SLA non sono ancora chiare.

Normal Activity of Superoxide Dismutase 1



Generation of Hydroxyl Radicals



Nitration of Tyrosine

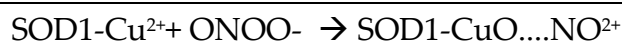


Fig. 5 Reazioni ossidative mediate dalla superossido dismutase (SOD1) .

La SOD1 normalmente catalizza la conversione di anioni superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) tossici per la cellula in perossido d'idrogeno H_2O_2 (in alto). Le mutazioni a carico del gene che codifica la SOD1 possono revertire questa reazione portando alla formazione del radicale tossico idrossile OH^{\cdot} (al centro) o utilizzare altri substrati reattivi come il perossinitrito ONOO^- , causando così la nitratura anomala dei residui di tirosina nelle proteine (in basso).

Diverse sono le ipotesi che possono causare la SLA, alcune di queste saranno di seguito analizzate.

1.1.2 Alterazioni mitocondriali, vacuolizzazione e stress ossidativo

Studi recenti hanno evidenziato che i mitocondri, che sono la centrale energetica della cellula, siano fra i bersagli precoci del danno ai motoneuroni. Nei pazienti e nei modelli sperimentali di SLA, la disfunzione mitocondriale si osserva precocemente e potrebbe essere la causa della degenerazione dei motoneuroni, e quindi della paralisi dei pazienti (Beal, 2005). I mitocondri alterati e i vacuoli sono stati per lo più osservati nei dendriti di diverso calibro, nei corpi cellulari e in alcuni assoni dei neuroni delle corna anteriori (Bendotti et al., 2001). I mitocondri potrebbero essere i primi siti danneggiati nei topi G93A. L'alterata capacità *metal-binding* porta all'accumulo nello spazio intermembrana di ioni rame (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2002), oppure provoca la catalisi di reazioni con la produzione di molecole reattive che danneggiano i mitocondri. Alternativamente, le alterazioni mitocondriali potrebbero essere il risultato di cambiamenti nella permeabilità mitocondriale, risultanti da uno scorretto funzionamento di un canale voltaggio-dipendente permeabile ai cationi, il MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore). Il malfunzionamento di questo canale potrebbe essere indotto da un eccessivo aumento intracellulare di calcio o di agenti ossidanti come i ROS (Reactive Oxygen Species) (Carri et al., 1997, Liu et al., 1999) e di glutammato. La SOD1 mutata infatti, agendo come perossidasi e convertendo il perossido d'idrogeno in radicali tossici diverrebbe una fonte di radicali liberi. Il danno ossidativo potrebbe essere l'ultima via comune che determina la morte del motoneurone come conseguenza di diversi meccanismi eziopatogenetici.

1.1.3 Anormalità citoscheletriche e aggregazione proteica

I neurofilamenti sono proteine composte da tre monomeri: la subunità leggera (NFL), la subunità media (NFM) e quella pesante (NFH) (Julien, 1999). Nei topi G93A i neurofilamenti fosforilati si localizzano nei corpi cellulari e negli assoni prossimali dei motoneuroni (Tortarolo et al., 2003) e quando diventano iperfosforilati, il loro trasporto può non essere funzionale, e ciò porta al loro accumulo (Shibata et al., 2001). Si ritiene che questo accumulo possa essere originato dall'alterata fosforilazione proteica prodotta dalle chinasi. Nel midollo spinale di topi G93A, infatti, è stato rilevato un progressivo accumulo di p38-MAPK (un componente della famiglia serin-treonin chinasi MAPK), che procede parallelamente alla degenerazione dei motoneuroni. p38-MAPK è attivato sia da un aumento del livello di glutammato extracellulare, sia dalla presenza di citochine pro infiammatorie (Tortarolo et al., 2003).

Nella fase di malattia conclamata, i motoneuroni delle corna anteriori del midollo appaiono atrofici e ridotti di numero (Wood et al., 2003). Le inclusioni citoplasmatiche ubiquitinate risultano essere positive all'immunoistochimica per gli anticorpi anti-SOD1, localizzate nel corpo cellulare e negli assoni, che appaiono rigonfi. Studi ultrastrutturali mostrano la presenza in esse di neurofilamenti associati a fibrille di maggior spessore e appaiono molto simili ai corpi di Lewy, ritrovati in pazienti SLA. La tossicità associata all'accumulo di aggregati proteici intracellulari sta emergendo come una delle maggiori ipotesi patogenetiche nelle malattie dei motoneuroni e più in generale nella neurodegenerazione (Cleveland and Rothstein, 2001).

1.1.4 Meccanismi intercellulari nella patogenesi della SLA

Crescenti evidenze indicano che la morte dei neuroni non è un processo che coinvolge esclusivamente queste cellule, ma è con tutta probabilità il risultato di una complessa interazione con le cellule ad essi adiacenti, per lo più astrociti e microglia. A sostegno di quest'ipotesi è il fatto che i topi transgenici che esprimono la SOD1 mutata esclusivamente nei motoneuroni, o solo negli astrociti, non sono in grado di innescare un processo patologico come quello osservato quando l'enzima mutato è espresso in modo ubiquitario (Boillee et al., 2006, Raibon et al., 2008).

Gli astrociti e la microglia, anche se non morfologicamente alterati nella fase precoce della malattia, sembrano esser in grado di liberare nel microambiente intorno ai motoneuroni una serie di fattori neurotossici che comprendono le citochine, il glutammato e l'ossido nitrico (Raibon et al., 2008). In particolare, l'espressione di TNF α , una citochina principalmente secreta da astrociti e microglia nel sistema nervoso centrale (SNC), e del suo recettore, risultano notevolmente aumentati nel midollo spinale di topi G93A prima della perdita dei motoneuroni e della reattività gliale (Boillee et al., 2006).

Il TNF α ha nel SNC diversi effetti, quali l'alterazione dei livelli di fattori di crescita e di altre citochine, del glutammato, dei recettori AMPA, della periferina e di un'ampia gamma di secondi messaggeri intracellulari quali la p38-MAPK e l'Ossido nitrico (NO). Il TNF α contribuisce inoltre al controllo delle risposte immunitarie e recentemente è stato riportato che l'immunità indotta da ripetute iniezioni di liposaccaride sia la causa di una significativa anticipazione della malattia nei topi G93A (Nguyen et al., 2004). L'NO, il glutammato e i ROS rappresentano dei fattori inter-cellulari fisiologici importanti nel cross-talk tra cellule gliali e neuroni, ma in certe condizioni possono diventare dannosi per le cellule più vulnerabili, ad esempio i motoneuroni. Essi, inoltre, possono contribuire alla propagazione del danno

neuronal. Un sostegno a quest'ipotesi deriva da studi effettuati su culture miste di motoneuroni e astrociti che dimostrano che i ROS prodotti nei motoneuroni, in risposta ad un insulto di tipo eccitotossico, inducono un danno ossidativo del trasportatore del glutammato negli astrociti adiacenti (Rao and Weiss, 2004). Questo amplificherebbe lo stress eccitotossico dei motoneuroni risultando in un circolo vizioso, determinante per la progressione della malattia. L'ipotesi di un cross-talk tra cellule gliali e motoneuroni (Van Den Bosch and Robberecht, 2008) emerge anche da uno studio recente su topi transgenici chimerici tra SOD1 mutata e SOD1 wild type, nei quali è stato dimostrato che la SOD1 mutata in cellule non-neuronali co-coltivate con motoneuroni privi della proteina mutata, è in grado di indurre in questi ultimi un continuo accumulo intracellulare di proteine aberranti ubiquitinate sino a portare alla formazione delle inclusioni filamentose e sferoidali tipiche della SLA (Clement et al., 2003, Jaarsma et al., 2008)

1.1.5 Danno eccitotossico

L'eccitossicità dovuto ad accumulo di L-glutammato e di altre sostanze simili, è un processo patogenetico in seguito al quale la cellula nervosa risulta fortemente danneggiata (Struzynska, 2009). Negli ultimi anni è stato proposto che la SLA non sia una patologia isolata dei motoneuroni ma che sia conseguente ad alterazioni delle interazioni tra i motoneuroni e le circostanti cellule gliali. Un meccanismo ritenuto importante per la SLA sembra essere l'eccitotossicità causata da una eccessiva attivazione dei recettori per il glutammato (Corona et al., 2007).

Il concetto di eccitossicità è stato introdotto da John Olney il quale la definì come "un fenomeno in cui l'azione eccitatoria del glutammato viene trasformata in un processo neuropatologico che può rapidamente uccidere i

neuroni del SNC" (Olney, 1978). Il fenomeno viene di solito attribuito al glutammato ma può essere indotto da molti altri amminoacidi endogeni quali l'acido aspartico, l'acido omocisteico e l'acido quisqualico (Lodge, 1988). Le cause principali di una eccessiva attivazione dei recettori postsinaptici glutamatergici possono derivare sia da una eccessiva produzione del glutammato, sia da un suo ridotto assorbimento ma non possono essere esclusi altri fattori quali la localizzazione e le proprietà molecolari dei recettori, l'attività di altri recettori canali e meccanismi intracellulari a valle dell'attivazione recettoriale.

Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale dei vertebrati. Agisce su recettori metabotropici, accoppiati a sistemi di secondi messaggeri attraverso proteine G, e su recettori ionotropici, canali ionici attivati dall'interazione con il glutammato o con i suoi agonisti quali l'AMPA (acido α -amino-3idrossi-5metil-4-isoxazolepropionico), il kainato e l'NMDA (N-metil-D-aspartato).

I livelli extracellulari di glutammato sono finemente regolati da proteine transmembrana che hanno la funzione di trasportatore del glutammato. Ci sono diverse classi di trasportatori sia sui neuroni, sia sugli astrociti ma la maggior parte del riassorbimento del glutammato sembra essere mediato dagli astrociti (Anderson and Swanson, 2000) (Fig. 6).

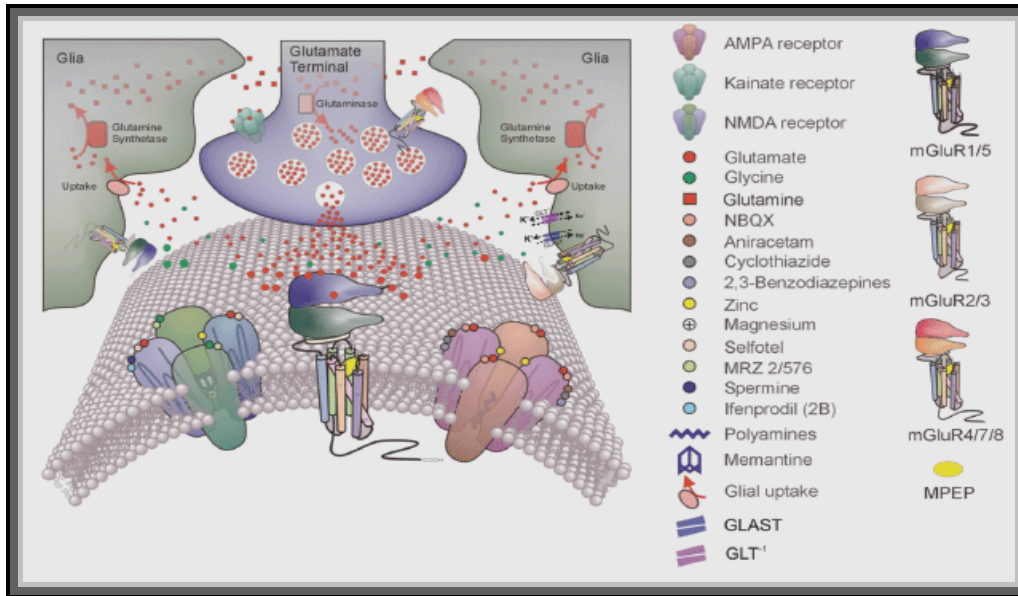


Fig. 6 Neurotrasmissione glutammatergica e cascata apoptotica. L'arrivo di un potenziale d'azione induce un influsso di Calcio che causa la fusione delle vescicole rilascianti glutammato nella fessura sinaptica. Sulla membrana della cellula post-sinaptica si attivano i recettori AMPA che inducono un influsso di sodio e la depolarizzazione della membrana. Il blocco fisiologico dei recettori NMDA da parte dello ione Magnesio viene rimosso e di conseguenza si ha un'entrata di Calcio all'interno della cellula post-sinaptica. Il glutammato in eccesso che normalmente viene rimosso da specifiche proteine localizzate sia negli astrociti (GLT-1 e GLAST) che nei neuroni (EAAC1), viene metabolizzato a glutammmina nelle cellule gliali per azione della glutammmina sintetasi (GS) e ricaptato dai neuroni. Un'alterazione del turn-over del glutammato induce un accumulo di questo neurotrasmettitore e conseguentemente un'eccitotossicità e probabile morte cellulare. Il calcio intracellulare in eccesso induce l'attivazione di diversi enzimi e la produzione di ROS con danno al mitocondrio, ossidazione di lipidi, proteine e DNA.

Il trasportatore gliale murino GLT-1 (rat glial glutamate transporter) e il suo equivalente umano EAAT-2 (excitatory amino acid transporter 2) sono stati ritenuti particolarmente interessanti riguardo la SLA (Rothstein, 1995). Il trasporto di glutammato può essere alterato, ad esempio, per una perdita delle proteine responsabili del trasporto. In pazienti con SLA allo stadio terminale, così come nei topi transgenici SOD1, si ha una riduzione del livello dei trasportatori (Bruijn et al., 1997). Studi di immunoblotting dimostrano, in pazienti affetti da SLA, una sostanziale perdita del trasportatore gliale EAAT-2 sia a livello corticale che midollare (Lin et al., 1998). Contemporaneamente però, altre indagini biomolecolari, quali ad esempio l'ibridazione in situ, pur

confermando la diminuzione di EAAT-2 a livello del midollo, non hanno riscontrato nessuna variazione a livello della corteccia motoria (Shaw and Eggett, 2000). È comunque chiaro che il trasporto del glutammato può svolgere un ruolo attivo nella morte neuronale, mediando fenomeni di eccitotossicità diretta. È stato anche dimostrato che la sovraespressione di EAAT-2 svolge un ruolo neuroprotettivo in un modello murino di SLA. Infatti topi doppi transgenici EAAT-2/G93A, ottenuti incrociando topi che sovraesprimono EAAT-2 con topi che sovraesprimono la SOD1 umana mutata (G93A), sono caratterizzati da un ritardo nell'inizio e nella progressione della malattia (Guo et al., 2003).

Altra possibile disfunzione del trasporto del glutammato può derivare da un'alterazione funzionale dei trasportatori come diretta conseguenza di un danno ossidativo, dal momento che i trasportatori sono sottoposti ad una regolazione da parte degli ossidanti (Trotti et al., 2001). Rao e Weiss suggeriscono poi che l'eccitotossicità provochi nei motoneuroni una produzione di ROS che potrebbe danneggiare i trasportatori di glutammato degli astrociti (Rao and Weiss, 2004). Questa ipotesi si basa, tra l'altro, sull'elevata concentrazione del trasportatore EAAT2, danneggiato nei pazienti SLA, che si trova nei processi degli astrociti a diretto contatto con i motoneuroni (Guo et al., 2003).

1.1.6 I canali ionici nella SLA

Le alterazioni dei trasportatori del glutammato portano ad un accumulo di questo neurotrasmettitore nello spazio extracellulare. Questo evento rappresenta una delle cause del fenomeno dell'eccitotossicità da glutammato (Heath and Shaw, 2002). Durante questo processo si assiste prima di tutto ad un ingresso di ioni sodio e cloro, accompagnati da acqua,

come risultato della depolarizzazione e quindi ad un rigonfiamento del neurone che può essere interrotto con la rimozione dell'agonista. Durante la seconda fase, si verifica un influsso di calcio nel neurone attraverso i canali voltaggio dipendenti (Choi, 1988), i dei recettori NMDA e i recettori AMPA (Heath and Shaw, 2002).

La tossicità può inoltre essere un evento secondario che si verifica dopo altri eventi patologici. La causa primaria può essere una compromissione del bilancio energetico del neurone. Si ha quindi una ridotta produzione di ATP e un malfunzionamento della pompa Na^+/K^+ -ATPasi con conseguente riduzione del potenziale di membrana. In seguito a questa riduzione si ha una iperattivazione dei recettori NMDA che normalmente sono bloccati dal magnesio. Le cellule risultano così depolarizzate anche a basse concentrazioni di glutammato (Ludolph et al., 2000).

I recettori AMPA sono dei complessi proteici costituiti da varie combinazioni di 4 subunità (GluR1-4), che vanno a costituire un canale permeabile ai cationi. La subunità GluR2 è legata alla permeabilità di questo recettore al Ca^{2+} . La mancanza di GluR2 determina infatti la formazione di recettori-canali AMPA con alta permeabilità al calcio. Queste proprietà della GluR2 sono attribuibili alla presenza di una arginina nel dominio della subunità coinvolto nella formazione del poro ionico, al posto di una glutammina, che è invece tipica delle altre subunità dell'AMPA (Hume et al., 1991). È stato proposto che la selettiva vulnerabilità dei motoneuroni potesse derivare dalla presenza di recettori altamente permeabili al calcio (Bar-Peled et al., 1999) e, quindi, dall'assenza o dalla diminuzione di espressione della subunità GluR2. A supporto di queste ipotesi è stata dimostrata la presenza di recettori permeabili al calcio in motoneuroni in coltura (Carriedo et al., 1996). Applicando tecniche di RT-PCR (Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction) alcuni lavori hanno invece riportato che non vi è alcuna alterazione

nell'espressione della subunità GluR2 in condizioni di controllo, SOD1 e G93A (Spalloni et al., 2004). Risulta invece significativa una variazione nella frequenza di espressione delle subunità GluR3 e GluR4. Queste sono infatti notevolmente superiori nella popolazione G93A rispetto ai due controlli, murino e transgenico (Spalloni et al., 2004).

In condizioni normali esiste una fine regolazione della concentrazione intracellulare di calcio libero, che mantiene i suoi livelli al di sotto di 0,1 μM (Casella e Taglietti, 1996). Come conseguenza di una eccessiva stimolazione dei recettori del glutammato, si verifica una destabilizzazione della omeostasi del calcio intracellulare, in seguito alla quale si determina l'attivazione di una cascata di eventi biochimici citotossici che vede coinvolti enzimi quali lipasi, fosfolipasi, endonucleasi, ossido nitrico sintetasi, proteina chinasi C e xantina ossidasi. Questi processi possono danneggiare il neurone sia direttamente che attraverso la formazione di radicali liberi (Rothstein, 1995).

Per comprendere meglio il ruolo dei recettori AMPA nella patogenesi della SLA sono stati condotti degli studi elettrofisiologici su motoneuroni spinali in coltura primaria, utilizzando un modello murino di fSLA. Questi studi hanno evidenziato nei motoneuroni G93A delle alterazioni della permeabilità ionica dei recettori AMPA (Pieri et al., 2003) che potrebbero essere in relazione con alcune differenze a livello biomolecolare delle subunità dei recettori AMPA (Spalloni et al., 2004). I topi transgenici G93A esprimono dei canali AMPA con una permeabilità al sodio e al potassio almeno tre volte superiore a quella dei SOD1 mentre la permeabilità al calcio non sembra essere modificata. L'eccitotossicità sembra quindi non essere correlabile ad un aumento della concentrazione del calcio direttamente mediata dai recettori AMPA/KA, ma potrebbe essere riferita ad una attivazione dei recettori voltaggio dipendenti del calcio, attivati a seguito della depolarizzazione mediata dai recettori non-NMDA (Pieri et al., 2003). L'aumento interno di calcio potrebbe anche essere

dovuto al maggiore ingresso di sodio che si verifica sempre attraverso questi recettori. La presenza di una maggior quantità di questo ione attiverebbe, infatti, uno scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ la cui azione determinerebbe un ingresso di ioni calcio all'interno del neurone. Questa ipotesi è anche avvalorata dall'azione di uno dei pochi farmaci utilizzati nella terapia della SLA, il riluzolo. Si è dimostrato infatti che questa sostanza è in grado di interagire, in colture primarie di corteccia di ratto, con le correnti ioniche di sodio, sia voltaggio dipendenti che mediate dall'attivazione dei recettori AMPA (Zona et al., 1998 , Zona et al., 2002). Gli stessi studi sono stati poi condotti su motoneuroni murini confermando che il riluzolo è in grado di bloccare le correnti indotte dal kainato (Albo et al., 2004). A conferma di quanto dimostrato *in vitro*, è stato osservato che anche *in vivo* l'eccitotossicità ha un ruolo cruciale nel danno neuronale indotto da eventi come l'ischemia (Martin et al., 1998), e si pensa che possa giocare un ruolo importante nella lenta degenerazione neuronale che si verifica nella SLA. Questa ipotesi è stata confermata dagli elevati livelli di glutammato registrati nel fluido cerebrospinale di pazienti SLA (Plaitakis and Carosco, 1987) e dal deficit delle capacità di trasporto riscontrata nel midollo spinale e nella corteccia motoria del 40% pazienti con sSLA (Rothstein, 1995).

Nei motoneuroni di topi G93A, attraverso esperimenti di patch clamp e calcium imaging, è stato riscontrata un'alterazione nell'omeostasi del calcio in seguito ad attivazione dei recettori AMPA rispetto ai controlli (Guatteo et al., 2007). È noto che l'ingresso del calcio e la sua localizzazione in microdomini intracellulari dia origine all'attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale che mediano risposte fisiologiche indipendenti. Diversi lavori hanno mostrato che tra queste risposte alcune possono indurre processi di neurotossicità mediati dal calcio (Ghosh and Greenberg, 1995). Il calcio entra nel neurone durante la neurotrasmissione non solo attraverso i recettori

ionotropici del glutammato ma anche tramite i canali ionici voltaggio dipendenti (Powers and Binder, 2001). L'eccitabilità neuronale potrebbe essere così uno dei maggiori contributi alla vulnerabilità eccitotossica. Le cellule che generano potenziali d'azione con frequenza maggiore risultano infatti maggiormente vulnerabili all'eccitotossicità. Inoltre un aumento dell'eccitabilità neuronale potrebbe contribuire a cambiamenti nello stress ossidativo (Hand and Rouleau, 2002) come anche a cambiamenti mitocondriali e del metabolismo energetico (Browne et al., 2006).

Recentemente è stato osservato che le alterazioni nelle proprietà di scarica sia di motoneuroni che di cellule corticali nel modello di SLA, G93A, fossero dovute all'alterazione di specifici canali ionici del sodio voltaggio-dipendenti (Pieri et al., 2003, Pieri et al., 2009). Queste potrebbero innescare l'ipereccitabilità dei neuroni G93A e quindi una maggiore vulnerabilità all'ingresso di calcio.

1.1.7 Fattori di rischio ambientali

Il rapporto con l'ambiente è fondamentale per determinare lo stato di salute della popolazione umana e la relazione tra l'individuo e i diversi fattori ambientali può avere risvolti diversi sull'equilibrio salute/malattia. È necessario studiare, conoscere e comprendere quali siano gli elementi da considerare, da un punto di vista epidemiologico, per valutare l'impatto dei diversi fattori sullo stato di salute (Migliore and Coppede, 2009).

All'insorgenza della SLA possono concorrere anche cause di tipo ambientale come l'esposizione ad agenti tossici, quali metalli pesanti, pesticidi, solventi chimici e intossicazioni croniche da piombo, selenio, mercurio e manganese (Johnson and Atchison, 2009). Tra gli agenti tossici, quelli maggiormente chiamati in causa sono i pesticidi e i fertilizzanti. In effetti, secondo uno studio epidemiologico condotto in Sardegna, la prevalenza della malattia tra gli

agricoltori è doppia rispetto alla popolazione generale (Giagheddu et al., 1983). Tali sostanze, utilizzate anche per la manutenzione del campo da gioco, potrebbero essere responsabili oltremodo dell'insorgenza della malattia tra i calciatori (Ferrazza and Sturchio, 2007). Tra i fattori ambientali correlati con l'eziologia della malattia nervosa sono stati identificati il "fallout" radioattivo legato alla sperimentazione di armi nucleari in Giappone negli anni '50-'60 (Neilson et al., 1995) e le concentrazioni "indoor" di radon in Inghilterra determinate negli anni '81-'89 (Ferrazza and Sturchio, 2007).

Tra gli studi epidemiologici sulla SLA, condotti su specifiche categorie di persone, i più noti sono quelli che riguardano gli atleti che praticano varie discipline sportive e i militari. Da questi dati è emerso che giocatori di calcio professionisti, maratoneti e veterani della Guerra del Golfo sono molto più esposti al rischio di sviluppare questa patologia rispetto alla popolazione generale (Horner et al., 2003).

Inoltre recentemente sono stati studiati gli effetti molto pericolosi della diffusione dei cianobatteri. Questi microrganismi sembrano essere associati alla produzione di neurotossine e citotossine come il BMAA (β -N-methylamino-L-alanine), l'anatossina, la saxitossina, la curacina, la microcistina e la cilindrospermopsina. Tutte queste molecole si legano a bersagli presenti nel sistema nervoso centrale e periferico e sono altamente diffuse in ambienti terrestri e marini. Recentemente è stata riscontrata la presenza di alcune di queste sostanze tossiche in integratori dietetici (Funari and Testai, 2008).

Una variante particolare della SLA è il cosiddetto "complesso SLA-Parkinson-Demenza" (SLA-PDC) di Guam, un'isola dell'Oceano Pacifico sotto giurisdizione USA. Questa malattia è stata messa in relazione con il consumo da parte dei nativi di due specie di pipistrello (le volpi volanti, *Pteropus tokudae* e *P. mariannus*) che si alimentano di semi e foglie di *Cycas circinalis* L,

contenenti un aminoacido neurotossico, la β -N-metilamino-L-alanina (BMAA). Quest'ultimo è un aminoacido del tutto particolare in quanto appartiene alla categoria delle fonti alimentari di azoto non proteico. È noto infatti che la L-BMAA, in analogia con un'altra tossina implicata nel neurolatirismo (la β -N-oxalilammino-L-alanina, L-BOAA) provoca eccitossicità mediata dall'attivazione dei recettori glutamatergici di tipo AMPA. I modelli sperimentali approntati per riprodurre la SLA mediante uso delle neurotossine non si sono rivelati efficaci. Ciò è da mettere in relazione alla necessità di altri fattori che condizionano pesantemente l'instaurarsi della patologia.

Cox et al., (Cox et al., 2003) hanno messo in evidenza come la BMAA sia prodotta da qualunque genere di cianobatterio simbiote delle radici coralloidi delle Cycas. Da qui la tossina è incorporata nei semi della pianta, e da qui alle volpi volanti, dove raggiunge concentrazioni 10.000 volte superiori a quelle nell'organismo produttore (*biomagnification*). Murch et al. (Murch et al., 2004) hanno riscontrato la BMAA in cervelli di pazienti affetti da SLA-PDC e da Alzheimer. Questo dato non è stato confermato in altri pazienti affetti dalle stesse patologie (sMontine et al., 2005). Sebbene il ruolo di BMAA nelle malattie neurodegenerative sia altamente in discussione, ci sono studi che dimostrano che questa sostanza sia in grado di mimare la tossicità da glutammato e per questo la sporadicità di alcuni casi di SLA. Il BMAA attraversa la barriera ematoencefalica attraverso il trasportatore ad alta affinità L1, ma non è attivo fino a che non si associa con il bicarbonato assumendo una struttura che mima quella del glutammato ed attiva i recettori glutamatergici inducendo la morte neuronale (Stipa et al., 2006).

1.2 Attività fisica e insorgenza di SLA

La SLA nel corso di questi ultimi anni è stata frequentemente associata sia a lavori fisici particolarmente pesanti che alla pratica di sport di resistenza, anche se ad oggi nessuna certezza scientifica è emersa, eccetto dati di ricerche epidemiologiche che rimangono controversi (Kirkinezos et al., 2003, Valenti et al., 2005, Veldink et al., 2005). Tra questi, i dati raccolti sono provenienti da *casi aneddotici e da studi caso controllo*.

Tra i *casi aneddotici*, spesso ampiamente ripresi dai mass media, che storicamente possono essere fatti risalire al caso del giocatore di baseball americano Lou Gehrig, che venne colpito dalla SLA nel 1939 all'età di 35 anni e decedette circa 2 anni dopo. Va inoltre ricordato il piccolo ma interessante *cluster* di 3 giocatori di football americano che avevano giocato contemporaneamente nella squadra dei *San Francisco 49ers* nel 1964 e che svilupparono la SLA quasi contemporaneamente negli anni '80. Questo *cluster* fu collegato a un fertilizzante diffusamente usato nei campi di allenamento della squadra, il milorganite. Caratteristica di questo fertilizzante è di essere costituito, in parte, da scarti di lavorazione delle fonderie e pertanto di essere estremamente ricco di residui metallici. Questa osservazione non è stata successivamente confermata.

Recentemente, i ricercatori del Dipartimento di Neurologia dell'University Medical Center di Utrecht, hanno valutato se l'attività fisica praticata nell'arco della vita, per lavoro e nel tempo libero, fosse associata ad un aumento del rischio di sviluppare la SLA e se ci fosse un'associazione tra attività fisica, la sua durata e l'età d'insorgenza della malattia (Veldink et al., 2005). Da questi dati è emerso che per i 219 pazienti ricoverati presso il Centro, tra il 2001 ed il 2002, con diagnosi certa, probabile o possibile di sclerosi laterale amiotrofica non era significativo lo svolgimento di un'attività sportiva rispetto ai 254

soggetti di controllo.

Gli studi *caso-controllo* sono basati sul confronto fra soggetti affetti dalla malattia e controlli sani, di solito appaiati per età e sesso, che permettono di ricercare retrospettivamente differenze di esposizione a presunti fattori patogenetici. I risultati sull'attività sportiva finora pubblicati non hanno fornito dati univoci, anche se alcuni di essi sembrano indicare l'esistenza di un rapporto fra SLA e attività sportiva intensa (Longstreth et al., 1998, Scarmeas et al., 2002). Uno dei maggiori problemi di questi studi è rappresentato dalle differenti definizioni operative di attività sportiva utilizzate e dall'uso di questionari retrospettivi, che spesso comportano risposte scarsamente accurate da parte dei casi e/o dei controlli. Finora, non si è chiarito in modo esaustivo l'esistenza di un rapporto fra SLA e attività sportiva o attività fisica intensa.

Sono state proposte diverse ipotesi sul possibile meccanismo patogenetico che metterebbe in correlazione SLA e attività sportiva, quali: (a) un'attività fisica intensa e prolungata potrebbe aumentare l'effetto dell'eccitotossicità a livello dei motoneuroni spinali; (b) l'attività fisica potrebbe aumentare il livello di stress ossidativo, forse attraverso l'aumento della formazione di radicali liberi; (c) i traumi correlati alla partecipazione all'attività sportiva potrebbero danneggiare la funzione dei motoneuroni inducendone la degenerazione. Anche i dati sull'attività fisica nei topi transgenici SOD1, modello genetico della SLA, non sono di aiuto, perché i lavori pubblicati hanno fornito risultati contraddittori, rilevando un effetto di tipo protettivo dell'attività fisica di resistenza o l'assenza di un effetto significativo (Kirkinezos et al., 2003).

1.3 Ipotesi di SLA nei calciatori in Italia

Il giornalista Tom Kington, in un articolo comparso il 25 Febbraio 2003 sul sito internet della Uefa, fa riferimento ad inchieste giornalistiche e giudiziarie italiane sull'abuso di farmaci nello sport e per la prima volta parla di "*Motor neurone Mystery*".

Recentemente, un aumento di incidenza di SLA fra calciatori professionisti italiani è stata riscontrata in studi epidemiologici. Questi studi hanno dimostrato un aumento di rischio di SLA di 6,5-10 volte fra i calciatori professionisti rispetto alla popolazione generale (Beretta et al., 2003, Piazza et al., 2004, Belli and Vanacore, 2005, Chio et al., 2005, Vanacore et al., 2006, Armon, 2007, Taioli, 2007b, Wicks et al., 2007, Chio et al., 2009) . Le cause di tale aumento sono ancora sconosciute ma fattori tossici, insieme a una predisposizione individuale, sembrano poter avere un ruolo rilevante (Mitchell, 2000).

A seguito di un'inchiesta giudiziaria presso la Procura della Repubblica di Torino, è stato confermato un aumento di rischio nella popolazione di giocatori di calcio in Italia. Questo aumento è stato valutato in due diversi modalità e in studi separati (Belli and Vanacore, 2005, Vanacore et al., 2006).

Il primo studio è stato effettuato basandosi sui certificati di morte su una coorte di circa 24.000 calciatori professionisti e semiprofessionisti. Questo studio ha rivelato la presenza di un significativo eccesso di decessi per SLA nel periodo 1960–1996 rispetto a quanto atteso nella popolazione italiana (tratto dai dati ISTAT) (casi osservati 8, casi attesi 0,69) (Belli and Vanacore, 2005, Vanacore et al., 2006). Questo eccesso è risultato particolarmente significativo fra i soggetti di età inferiore ai 60 anni. I risultati di questo studio sono estremamente indicativi dell'esistenza di un rapporto patogenetico fra SLA e calcio, ma presentano alcuni problemi metodologici, quali:

- (1) inaccuratezza delle diagnosi riportate nei certificati di morte;
- (2) l'incompletezza della coorte di calciatori utilizzata che includeva giocatori sia professionisti che non professionisti;
- (3) il confronto non corretto fra le diagnosi di SLA nei giocatori di calcio, che includevano le cause di morte iniziale, intermedia, terminale e aggiuntiva, e i dati di riferimento ISTAT, che includono la sola causa di morte iniziale;
- (4) il mancato controllo delle diagnosi di SLA nella popolazione di calciatori.

Per ovviare a questi problemi si sono impostati studi retrospettivi di coorte basati sui calciatori tesserati per le squadre di serie A e B nel periodo 1970–2001 identificati attraverso gli archivi della ditta Panini e gli archivi dell'Ente Nazionale di Previdenza e Assistenza Lavoratori dello Spettacolo (ENPALS), cui sono obbligatoriamente iscritti tutti i giocatori di calcio professionisti dal giugno 1973. La coorte dello studio comprendeva 7325 giocatori. Fra questi sono stati diagnosticati di 5 casi di SLA, con un'età media di esordio di 43,4 anni. Il significativo aumento del rischio di insorgenza di SLA in giocatori professionisti (periodi di gioco pari o superiore a 6 anni) osservato era di 6,5, superiore sia all'eccesso di rischio che si osserva in generale durante l'attività sportiva e sia da studi caso controllo pubblicati in letteratura (Chio et al., 2005, Chio et al., 2009). Ciò potrebbe indirettamente indicare che il rischio di sviluppare la SLA fra i calciatori professionisti non è esclusivamente connesso all'attività fisica intensa o all'effetto di traumi o microtraumi come ipotizzato (Piazza et al., 2004), ma appare specificamente correlato all'attività calcistica in sé, anche con casi in ambito amatoriale (Wicks et al., 2007). Nello studio recente di Taioli (Taioli, 2007a), effettuato in gruppi di giocatori professionisti, si dimostra che mentre resta bassa la mortalità per patologie come cancro e malattie cardiovascolari, rispetto alla popolazione generale, alla stessa età aumenta invece di circa 18 volte la mortalità per SLA e incidenti d'auto.

Da tutti i lavori epidemiologici che sono stati pubblicati nel corso di questi anni, si possono sollevare alcune ipotesi che sembrano legate all'alto rischio di SLA fra i calciatori italiani, quali:

- l'uso di sostanze per migliorare le prestazioni atletiche oppure abuso di farmaci leciti, a dosi superiori e per periodi più prolungati rispetto a quelli normalmente utilizzati dalla popolazione generale (Belli and Vanacore, 2005, Vanacore et al., 2006, Taioli, 2007b);
- il contatto con sostanze utilizzate come diserbanti o concimi nei campi di gioco o allenamento;
- le alterazioni metaboliche del muscolo o del motoneurone correlate a specifiche metodiche di allenamento o di gioco;
- i traumi e microtraumi ripetuti, specifici del gioco del calcio (Piazza et al., 2004).

Tenendo inoltre conto della giovane età di esordio nella maggior parte dei casi di SLA fra i calciatori, si può inoltre ipotizzare che il fattore tossico ambientale responsabile dell'insorgenza della SLA induca un'anticipazione dell'età di insorgenza della malattia in soggetti "geneticamente" predisposti (Chio et al., 2005).

Sebbene gli studi epidemiologici siano maggiormente concentrati all'interno del contesto del calcio italiano, numerosi altri giocatori professionisti di football americano hanno sviluppato la SLA nel corso degli ultimi anni, e i dati risultano molto preoccupanti (Abel, 2007) con un aumento di rischio di 40 volte rispetto all'intera popolazione americana. Non è ancora chiaro se questa associazione sia solo casuale.

1.4 Integrazione alimentare durante l'attività sportiva

L'utilizzo di supplementi non-anabolici a fini nutrizionali e di miglioramento della performance atletica, è comune tra gli sportivi. Le diverse sostanze utilizzate non sono supportate da veri e propri studi scientifici su animali che abbiano testato il vero beneficio, ma soltanto da benefici teorici. Le dosi « raccomandate » durante esercizi fisici intensi sono così messe in discussione poichè gli studi a favore di un loro effettivo beneficio risultano poco chiari (Schwenk and Costley, 2002). Da uno studio condotto nel 2007 nell'ambiente sportivo, più dell' 82% dei giocatori intervistati riportava di fare un uso costante di supplementi, il 93% usavano farmaci antinfiammatori non steroidei e il 28% vitamine (Taioli, 2007a). Tuttavia, rimangono forti perplessità sulla reale efficacia di questi prodotti anche in considerazione del fatto che i favorevoli all'integrazione indicano quantitativi e tempi di somministrazione assai diversi (Schwenk and Costley, 2002, ASSOCIATION, 2009).

1.5 Amminoacidi a catena ramificata

Gli amminoacidi a catena ramificata (*Branched-Chain Amino Acid*, BCAA) sono considerati supplementi nutrizionali e l'uso di questi integratori si è molto diffuso soprattutto nell'ultimo decennio, favorito da una vasta produzione scientifica che avrebbe dimostrato una specifica efficacia di queste sostanze nel migliorare la prestazione sportiva.

Valina, Leucina e Isoleucina sono tre amminoacidi essenziali, detti a catena ramificata in quanto caratterizzati da una catena di atomi di carbonio che devia dalla catena principale (Fig. 7). Questi vengono utilizzati come fonte di energia in modo preferenziale dal muscolo durante l'esercizio fisico e rappresentano il 30% della massa muscolare. Inoltre sarebbero in grado di promuovere la sintesi proteica (effetto anabolizzante) e di favorire i processi

di recupero dopo un carico di lavoro muscolare. Una corretta assunzione dei BCAA è necessaria per una normale crescita e sviluppo e quindi sono importantissimi nell'alimentazione.

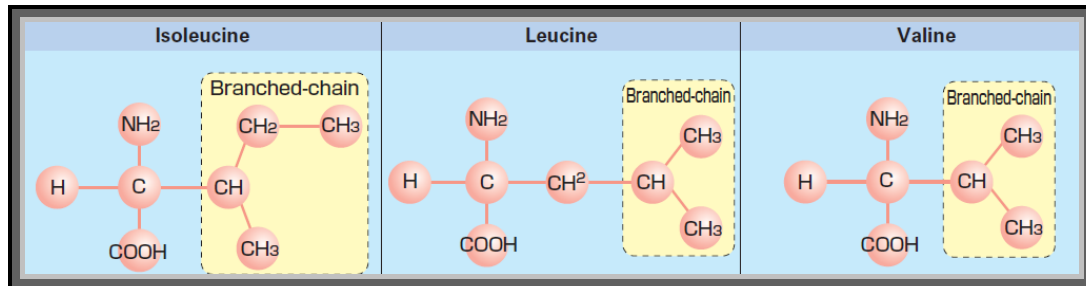


Fig. 7 Struttura dei tre amminoacidi ramificati: Isoleucina, Leucina e Valina, con evidenziati i gruppi alifatici che determinano la ramificazione.

Gli amminoacidi ramificati sono ampiamente presenti nelle proteine dei comuni alimenti che, pertanto, se consumati nelle giuste quantità, sono in grado di coprire completamente il fabbisogno nutrizionale giornaliero degli atleti. Nella maggioranza dei casi, l'uso degli integratori contenenti amminoacidi (in particolare ramificati e arginina, ornitina e lisina) da parte degli atleti e degli sportivi in genere è motivato dalla speranza e/o convinzione di poter ottenere un aumento di produzione e rilascio in circolo dell'ormone della crescita (Growth Hormon, GH, (De Palo et al., 2001). In tal modo verrebbero potenziati i processi metabolici e in particolare anabolici, quali aumento delle masse muscolari e della forza, mediati da questo fondamentale ormone ipofisario. Tuttavia, l'analisi critica e statisticamente corretta dei dati disponibili in letteratura sembrerebbe smentire un effetto di questo tipo di integratori, quando assunti da atleti sani, opportunamente allenati e con abitudini alimentari corrette (Giampietro and Gambarara, 2005). Infatti l'allenamento e il già elevato apporto di amminoacidi con gli alimenti, tipico degli sportivi in genere, sarebbero sufficienti da soli ad ottenere la massima stimolazione possibile del GH, sempre entro i limiti fisiologici, e

quindi l'uso di integratori proteici e amminoacidici non produrrebbe ulteriori aumenti della concentrazione plasmatica dell'ormone.

Negli sport ad alto impatto quali la maratona, il ciclismo di resistenza e il tennis è stato dimostrato un miglioramento delle performance mediante l'utilizzo di un'integrazione alimentare a base di leucina, valina e isoleucina, a dosi di 39, 19 e 19 rispettivamente, per un totale di 77 mg/kg/die (MacLean et al., 1994, Ohtani et al., 2006). Gli studi più recenti riportano che l'utilizzo di questa integrazione, ad esempio nel gioco del calcio, può portare ad un miglioramento delle performance cognitive nella fase finale delle partite, senza però migliorare la performance fisica (Meeusen et al., 2006).

1.6 Metabolismo e fabbisogno umano di BCAA

La regolazione degli enzimi chiave del catabolismo dei BCAA è essenziale per limitare l'ossidazione irreversibile dei BCAA quando l'assunzione di questi amminoacidi è insufficiente, e per eliminarli efficientemente quando sono assunti in eccesso rispetto alla normale richiesta.

Il catabolismo dei BCAA coinvolge inizialmente due vie enzimatiche comuni, una transaminazione e una successiva decarbossilazione ossidativa. Di conseguenza, le quantità relative dei singoli BCAA si influenzano vicendevolmente. Gli enzimi catabolici dei BCAA, a differenza di quelli di tutti gli altri amminoacidi essenziali che sono presenti solo nel fegato, sono distribuiti ubiquitariamente in tutto il corpo e tutte le trasformazioni biochimiche avvengono nei mitocondri, con l'unica eccezione del SNC dove le reazioni avvengono nel citosol (Hutson et al., 1998, Shimomura et al., 2004).

I BCAA vengono assorbiti nell'intestino e giungono al fegato da dove, non subendo trasformazioni chimiche, vengono immessi nella circolazione sanguigna per essere poi metabolizzati in larga parte a livello del muscolo

scheletrico (Gelfand et al., 1986). Il primo passaggio del metabolismo dei BCAA nel tessuto periferico è la deaminazione mediante l'enzima branched-chain amino-trasferasi (BCAT) per produrre α -cheto-acidi a catena ramificata (BCKA). Esistono due diverse isoforme per questo enzima: la prima, distribuita ubiquitariamente in tutto il corpo, è presente nei mitocondri (BCATm), la seconda, sintetizzata principalmente nel cervello, è attiva nel citosol (BCATc; Fig. 8) (Bixel et al., 1997).

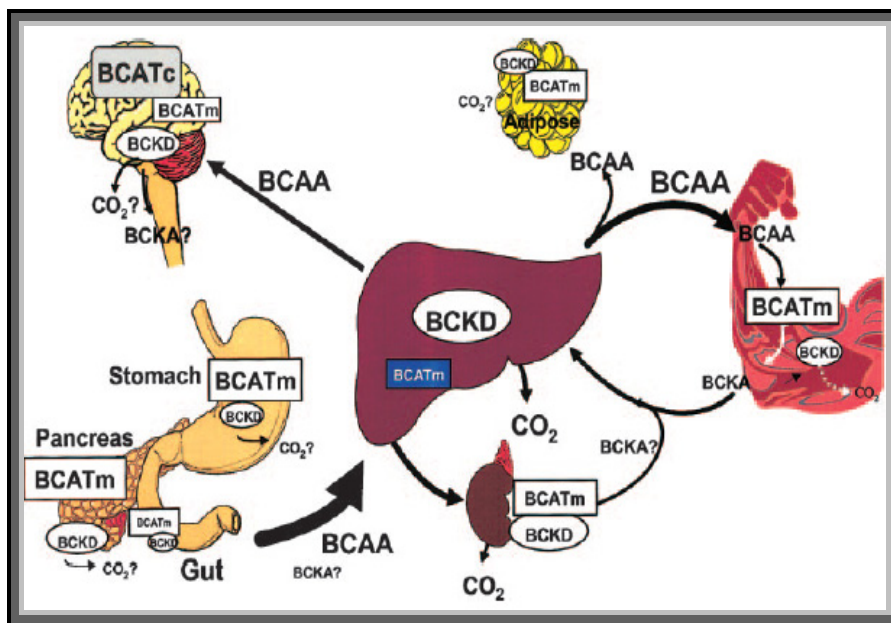


Fig. 8 Localizzazione degli enzimi del catabolismo dei BCAA nel corpo. La produzione di gruppi amminici nei differenti tessuti è diversa e dipende dall'espressione di determinati enzimi. (Da Hutson et al, 2005)

I BCKA vengono incorporati nelle proteine, oppure possono essere utilizzati come substrato energetico non solo nel muscolo scheletrico, ma anche nel cervello, nei reni, nel fegato e nel cuore (Abumrad et al., 1982). In questi organi i BCAA subiscono una decarbossilazione ossidativa, limitante e irreversibile catalizzata dalla deidrogenasi dei BCKA (BCKD) con la conseguente generazione dei substrati per il ciclo dell'acido citrico (Fig. 9; ciclo di Krebs). Sulla base di studi condotti su modelli animali, è stato

osservato che nell'insufficienza epatica cronica il catabolismo accelerato dei BCAA nel cervello può ridurre la neurotossicità dell'ammoniaca promuovendo la sintesi di glutamina a partire dal glutammato (Watanabe et al., 1986, Kasinski et al., 2004). Inoltre studi metabolici (Hutson, 2006) riportano che nel caso in cui la proteina chinasi BCK che regola l'attivazione del complesso BCKD è mutata, la disponibilità dei BCAA per la sintesi proteica si annulla. Il fenotipo murino che ne deriva è soggetto a disfunzione muscolare ed attacchi epilettici. Queste manifestazioni si osservano anche nei pazienti affetti da MSUD (Maple Syrup Urine Disease), in cui al contrario si blocca l'ossidazione dei BCAA con conseguente accumulo tossico di BCAA e BCKA (Zhang et al., 1989).

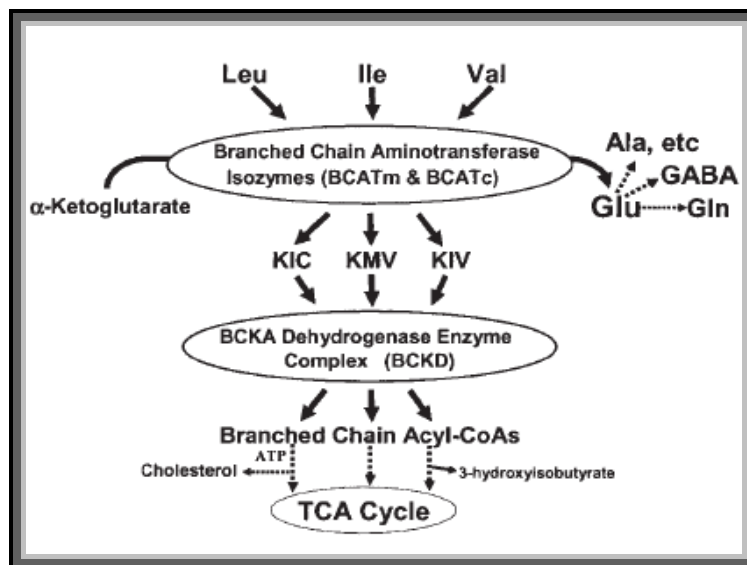


Fig. 9 Prodotti del catabolismo dei BCAA. Il primo step è una transaminazione dei BCAA ed è catalizzato dagli isozimi della Branched chain aminotrasferasi. (Da Hutson et al. 2005)

Nel 1985 l'organizzazione mondiale della sanità (*World Health Organization*, WHO) in collaborazione con l'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura (*Food and Agriculture Organization*, FAO) e l'Organizzazione delle Nazioni Unite (*United Nations Organization*, ONU) stabilirono il fabbisogno

giornaliero degli amminoacidi essenziali nelle diverse fasce d'età. Nel neonato, ad esempio, la quantità di Leucina (Leu), Isoleucina (Ile) e Valina (Val) necessaria per un corretto sviluppo è rispettivamente 161, 70 e 93 mg/Kg/die. Questa quantità va via via diminuendo fino ad arrivare nell'adulto a 14, 10 e 10 mg/Kg/die rispettivamente (FAO/WHO, 1985). Questa diminuzione del fabbisogno dei BCAA in funzione dell'età si spiega con la necessità del neonato di aumentare la propria massa muscolare e quindi l'accrescimento durante tutto lo sviluppo. In uno studio successivo (FAO/WHO, 1991, FAO/WHO, 2007), queste quantità sono state riviste soprattutto nell'adulto modificandole in 19, 13 e 13 mg/Kg/die dei tre BCAA (Leu-Ile-Val). Questi amminoacidi, come tutti quelli essenziali, sono introdotti in quantità sufficiente con una dieta equilibrata (Kreider et al., 1993).

1.7 Gli amminoacidi a catena ramificata nel SNC ed effetto sui meccanismi di fatica centrale

I BCAA svolgono un ruolo importante nel cervello sia nel regolare il metabolismo dell'azoto, sia nella sintesi della glutammina. I BCAA passano rapidamente la barriera emato-encefalica scambiandosi con la glutammina e sono i maggiori donatori di azoto per la formazione di glutammina e glutammato nel cervello (Yudkoff et al., 1994, Yudkoff, 1997, Daikhin and Yudkoff, 2000, Hutson et al., 2001, Yudkoff et al., 2005). Gli astrociti ossidano i BCAA per formare i BCKA, in questo modo forniscono azoto amminico per il pool di glutammato delle cellule gliali (Bixel et al., 1997, Bixel et al., 2001). I BCKA traslocano nel citosol dei neuroni dove vengono riconvertiti in BCAA e corpi chetonici (Bixel and Hamprecht, 1995). Il neurotrasmettitore glutammato è rimosso dal liquido extracellulare dagli astrociti e metabolizzato a glutammina mediante l'enzima *glutammina sintetasi*,

responsabile della regolazione della concentrazione di questo neurotrasmettitore. La glutammina è quindi rilasciata dagli astrociti e riassorbita dai neuroni nei quali viene idrolizzata a glutammato e ammoniaca dall'enzima *glutaminasi*. L'ammoniaca così prodotta viene utilizzata per la sintesi di BCAA a partire dai BCKA. I BCAA sono successivamente rilasciati nello spazio extracellulare e riassorbiti dagli astrociti, completando il ciclo BCAA-Glutammato (BCAA – shuttle; Fig. 10). Questo ciclo permette la regolazione della concentrazione del glutammato (Platell et al., 2000). È stato osservato che eccessi di BCAA o dei loro derivati, quali l'ammoniaca, sono tossici per lo sviluppo del sistema nervoso centrale (Bachmann et al., 2004, Kasinski et al., 2004). Infatti, questi autori hanno dimostrato che in coltura cellulare un'esposizione all'ammoniaca prima del completo differenziamento induce un alterato sviluppo assonale colinergico accoppiato ad un decremento della creatina e della fosfocreatina, mentre un'esposizione di una coltura già differenziata non porta agli stessi risultati.

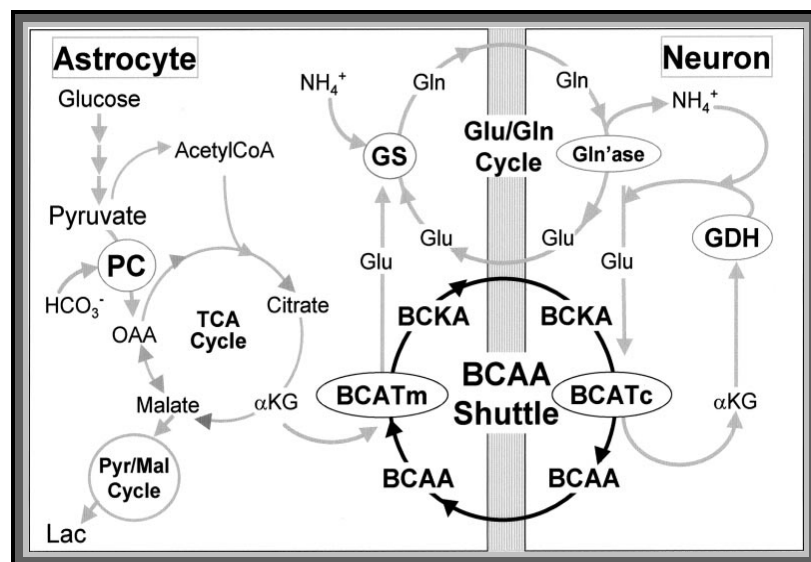


Fig.10 Relazione che intercorre tra i BCAA, BCKA e la Glutammina tra i vari organi. (Da Hutson et al., 2001)

I BCAA funzionano da importante substrato energetico nel cervello (Hutson et al., 2005) e sono rapidamente metabolizzati dalle cellule neuronali in coltura anche quando altri substrati energetici, come ad esempio il glucosio, sono presenti in abbondanza.

L'integrazione dei BCAA è stata considerata importante soprattutto per due aspetti:

- riduzione della fatica centrale causata da un allenamento intenso;
- riduzione della degradazione proteica del muscolo in seguito all'allenamento.

Un aspetto sicuramente interessante è il ruolo che diversi ricercatori attribuiscono ai BCAA nel determinare una riduzione della sensazione di fatica durante un esercizio fisico prolungato (Blomstrand and Saltin, 2001). Fisiologicamente la fatica può essere definita come l'incapacità di mantenere uno sforzo prolungato e può essere indicata come periferica e centrale. Per fatica periferica si intende la diminuzione della capacità di svolgere un lavoro muscolare. Questo tipo di fatica coinvolge sia la trasmissione neuromuscolare, sia l'interazione actina-miosina (Green et al., 1995, Davis et al., 1998). Sono stati identificati diversi fattori responsabili della fatica periferica, come la diminuzione nel muscolo del glicogeno e della fosfocreatina, l'accumulo di protoni, la difficoltà di trasmissione neuromuscolare e l'aumento del lattato a livello muscolare.

Le cause molecolari della fatica centrale non sono ancora state chiarite ma una delle ipotesi sarebbe un incremento nel sangue della concentrazione di triptofano (TRP) e quindi del neurotrasmettitore 5-idrossitriptamina (5-HT), o serotonina, e che, nei neuroni coinvolti nel controllo dell'attività motoria nel cervello, può essere responsabile della fatica di tipo centrale. Si ritiene che la variazione di concentrazione della serotonina cerebrale sia dipendente da un aumento del triptofano libero plasmatico e sia responsabile dello stato di

fatica centrale che è caratterizzato da sonnolenza, malumore, senso di stanchezza e difficoltà a proseguire l'impegno (Newsholme and Blomstrand, 2006). Poiché il triptofano è il precursore della sintesi di 5-HT, un incremento della sua quota libera (f-TRP), ovvero non legata all'albumina nel sangue, porta ad un suo maggiore trasporto attraverso la barriera emato-encefalica, mediata dal sistema di trasporto L1 specifico per gli amminoacidi neutri. Infatti la concentrazione di serotonina nel cervello aumenta quando vi è un aumento del rapporto tra la concentrazione di f-TRP e la concentrazione totale dei BCAA nel plasma (Mizuno et al., 2006). È stato infatti osservato che l'assunzione di BCAA potrebbe far diminuire il rapporto f-TRP/BCAA nel plasma riducendo così la sintesi di 5-HT (Newsholme and Blomstrand, 1996). L'incremento della serotonina si verifica principalmente durante un allenamento prolungato per due ragioni:

- i BCAA presenti nel sangue vengono ossidati per produrre energia durante la contrazione del muscolo scheletrico;
- nel plasma la concentrazione di acidi grassi aumenta, parallelamente all'incremento del f-TRP, poiché competono entrambi per il legame con l'albumina (Davis et al., 2000).

Poiché è stato osservato che l'aumento degli acidi grassi circolanti, che si verifica durante un esercizio fisico submassimale, può essere parzialmente bloccato da un'alimentazione ricca di carboidrati (CHO), sono state studiate le conseguenze dell'integrazione alimentare con BCAA associati ai carboidrati sulla fatica centrale (Davis et al., 1992).

È stata posta l'attenzione sull'integrazione dei BCAA come mezzo per prevenire la fatica di tipo centrale durante un'attività prolungate quali ad esempio lo sci di fondo, le maratone o le partite di calcio (Blomstrand et al., 1991, Newsholme et al., 1991). In una serie di studi e lavori successivi emerge che:

- somministrazioni di BCAA da 7,5 a 21 g prima e durante l'esercizio fisico, inducono in alcuni soggetti un miglioramento nelle prestazioni sia fisiche (Newsholme et al., 1991) che mentali (Blomstrand et al., 1991).
- non si evidenziano differenze significative nelle prestazioni fisiche né un miglioramento della fatica di un gruppo di volontari durante attività fisica intensa a cui, 70 minuti prima dell'esercizio, sono stati somministrati 20 g di BCAA, rispetto ad un gruppo a cui era stata somministrata una soluzione zuccherata (Varnier et al., 1994).
- in uno studio su ratti si dimostra che la somministrazione di alte dosi di BCAA causava l'insorgenza della fatica precocemente rispetto alla somministrazione di sola acqua e glucosio (Verger et al., 1994).
- alte dosi di BCAA possono essere in grado di ridurre la fatica centrale, ma determinano un aumento delle concentrazioni di ammoniaca, uno dei cataboliti dei BCAA, che si sa essere tossica per il cervello e i muscoli (van Hall et al., 1995a, van Hall et al., 1995b, Kasinski et al., 2004).

1.8 Possibile implicazione dei BCAA nella SLA

Alcuni ricercatori hanno ipotizzato che la neurotossicità causata da un eccesso di glutammato extracellulare potesse contribuire alla degenerazione dei motoneuroni bulbari e spinali (Plaitakis et al., 1988). Infatti è stato riportato che una parziale anomalia dell'enzima glutammato deidrogenasi (GDH) può causare un incremento dei livelli del glutammato nel plasma dei pazienti affetti da SLA (Plaitakis and Carosco, 1987, Plaitakis, 1990). Il glutammato è convertito in α -chetoglutarato e viceversa dall'enzima GDH. L'attività di questo enzima è stata dimostrata essere normale (Plaitakis and Carosco, 1987) o ridotta (Hugon et al., 1989) nei leucociti dei pazienti SLA, mentre risultava essere elevata nelle corna dorsali e nel midollo spinale (Malessa et al., 1991). Poiché la GDH può essere attivata allostericamente dai BCAA (Yielding and

Tomkins, 1961, Erecinska and Nelson, 1990), è stato ipotizzato che la progressione della malattia potesse essere modificata dalla somministrazione di questi amminoacidi.

Successivamente, in uno studio effettuato su 22 pazienti SLA, 11 dei quali trattati per un anno con BCAA (12 g di L-Leucina, 8 g di L-Isoleucina, 6,4 g di L-Valina) ed 11 con placebo, è stato dimostrato che, nel gruppo trattato con i BCAA si notava un significativo miglioramento in termini di mantenimento della forza muscolare e della capacità di camminare (Plaitakis et al., 1988), mentre nel gruppo trattato con il placebo si notava una diminuzione dello stato funzionale, in accordo con la storia naturale della malattia. Altri due studi invece (Testa et al., 1989, Beghi and Mennini, 2004) hanno riportato che i pazienti trattati con BCAA non riscontravano nessun vantaggio terapeutico rispetto al gruppo di controllo. In contrasto con i risultati di Plaitakis del 1988, un gruppo italiano di studio della SLA, nel 1989, ha iniziato in diversi centri specializzati una ricerca per valutare l'efficacia e la sicurezza dei BCAA nei pazienti trattati.

La sperimentazione è stata effettuata in nove centri SLA tra ospedali e università, per un totale di 126 pazienti. 61 pazienti sono stati trattati con un prodotto venduto sul mercato italiano, contenente 1,2 g di L-Leucina, 0,6 g di L-Isoleucina e 0,6 g di L-Valina e 7,6 g di carboidrati; 65 pazienti sono stati trattati con un placebo, contenente solo i carboidrati. Ai pazienti sono stati somministrati 2 pasticche, contenenti i BCAA o il placebo a secondo del gruppo, da assumere per via orale prima dei pasti 5 volte al giorno per tutto il periodo di studio. Nel 1991 un eccesso di mortalità tra i soggetti a cui venivano somministrati i BCAA, in assenza quindi di risultati positivi in favore del trattamento con i BCAA, ha portato il comitato per il monitoraggio dei dati a richiedere l'interruzione di questo studio (1993). Erano infatti morti 24 pazienti trattati con i BCAA e 13 trattati con il placebo. La percentuale di

sopravvivenza era, per i pazienti trattati con i BCAA, del 92% a 3 mesi, 81% a sei mesi, 74% a nove mesi e 59% a dodici mesi; mentre per i pazienti trattati con il placebo la corrispondente percentuale di sopravvivenza era del 100%, 90%, 85% e 74%. Il rischio relativo di morte nei pazienti trattati con i BCAA è risultato essere 2,3 volte superiore ai pazienti trattati con il placebo (1993).

2 Il complesso mTOR (mammalian target of Rapamycin)

Molti studi sono stati eseguiti per esaminare il ruolo dei BCAA nell'induzione di modificazioni molecolari che aumentano la sintesi proteica muscolare. Alcuni hanno riportato che, combinando l'integrazione di BCAA con un allenamento intenso, si amplificherebbero alcuni segnali genetici, mentre da altri studi emerge che, assumendo questi amminoacidi prima e dopo l'attività fisica, si ridurrebbe la degradazione proteica muscolare (Blomstrand et al., 2006). Un supplemento di BCAA infatti crea un'alterazione dell'attività della trasduzione del segnale delle vie che regolano la trascrizione dei geni coinvolti nella crescita muscolare (Blomstrand et al., 2006). A livello cellulare è coinvolta la via dell'mTOR (mammalian target of Rapamycin) regolata anche dalla presenza di nutrienti come il glucosio, nonché da ormoni come l'insulina (Fig. 11) (Proud, 2006, Krebs et al., 2007, Proud, 2007).

mTOR, e la cascata di reazioni che da esso derivano, viene attivato quando la cellula ha a disposizione alti livelli di nutrienti (Proud, 2002). Con queste premesse i ricercatori hanno ipotizzato che il ruolo di «sensore energetico cellulare» svolto da mTOR potesse essere applicato in modo più generale alla regolazione del bilancio energetico del corpo intero. Per verificare quest'ipotesi è stato studiato il segnale di mTOR e la sua cascata di reazioni nell'ipotalamo, un'importante area cerebrale coinvolta nella regolazione dell'appetito e del peso corporeo (Cota et al., 2006, Mori et al., 2009).

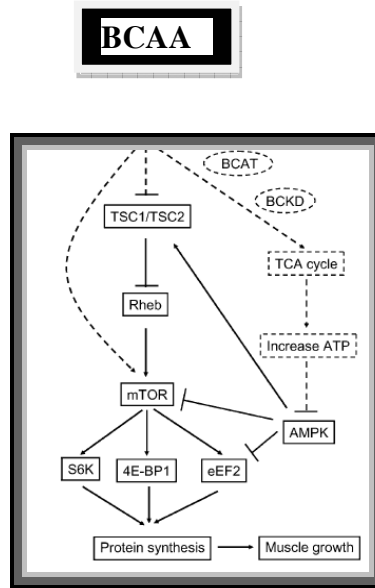


Fig. 11 Destino dei BCAA nelle cellule e stimolazione della sintesi proteica e dell'accrescimento muscolare .

La proteina mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) (Kubica et al., 2005) è una molecola di 290 KDa, così chiamata perché inibita dal macrolide *Rapamicina*, antibiotico prodotto dal batterio *Streptomyces hygroscopicus*. La *Rapamicina* e i suoi derivati presentano un unico meccanismo d'azione che comporta l'interazione con una piccola molecola proteica dal peso di 12 KDa, nota come FKBP12 (*FK506-binding protein*) a formare un complesso che si va a legare ad mTOR, inibendola (Bjornsti and Houghton, 2004). I due complessi in cui è presente la proteina mTOR sono:

- il complesso mTORC1 è responsabile della regolazione della sintesi proteica e si compone di mTOR, raptor (regulatory associated protein of mTOR) ed G β L (Hara et al., 2002). Raptor è una grossa molecola di 150 KDa, che stabilisce interazioni multiple con mTOR e con suoi substrati (Kim et al., 2002); G β L, invece, è una proteina di 36 KDa, che si lega al dominio chinasi di mTOR, regolandone positivamente l'attività catalitica (Wullschleger et al., 2005).
- il complesso mTORC2 è costituito da mTOR, G β L e da una proteina dal peso molecolare di circa 200 KDa proteina, nota come rictor

(rapamycin-insensitive companion of mTOR). La funzione fisiologica di mTORC2 non è ancora del tutto chiara, tuttavia l'ipotesi ad oggi più accreditata è che tale complesso moduli l'organizzazione dell'actina citoscheletrica (Jacinto et al., 2004).

mTORC1 è una serin-treonin chinasi costituita da un dominio catalitico, un sito di legame per il complesso FKBP12-Rapamicina ed un probabile dominio ad azione auto-inibitoria (*negative regulatory domain*) (Sekulic et al., 2000).

L'attività della proteina mTOR e dei suoi target è modulata da numerosi stimoli, quali fattori di crescita (IGF-1), nutrienti (amminoacidi), stress ambientali (ipossia), ormoni (insulina, T₃, GH, testosterone) e secondi messaggeri (IP3 e calcio) (Inoki et al., 2005).

Studi condotti su cellule di mammifero suggeriscono che, il complesso mTORC1 possa agire da sensore dei livelli intracellulari di nutrienti. In assenza di amminoacidi e in particolare la leucina (Kim et al., 2002, Kim et al., 2003), tale complesso andrebbe incontro ad una variazione conformazionale che precluderebbe la chinasi mTOR dal fosforilare i suoi substrati (Kim et al., 2002, Kim et al., 2003, Wang et al., 2006, Wang et al., 2008). Al contrario, in presenza di amminoacidi, lo stesso complesso proteico subirebbe una modificazione tridimensionale tale da promuovere un'efficiente interazione tra raptor ed i substrati di mTOR, favorendone la fosforilazione ad opera della chinasi (Kim et al., 2002, Kim et al., 2003) (Fig. 12).

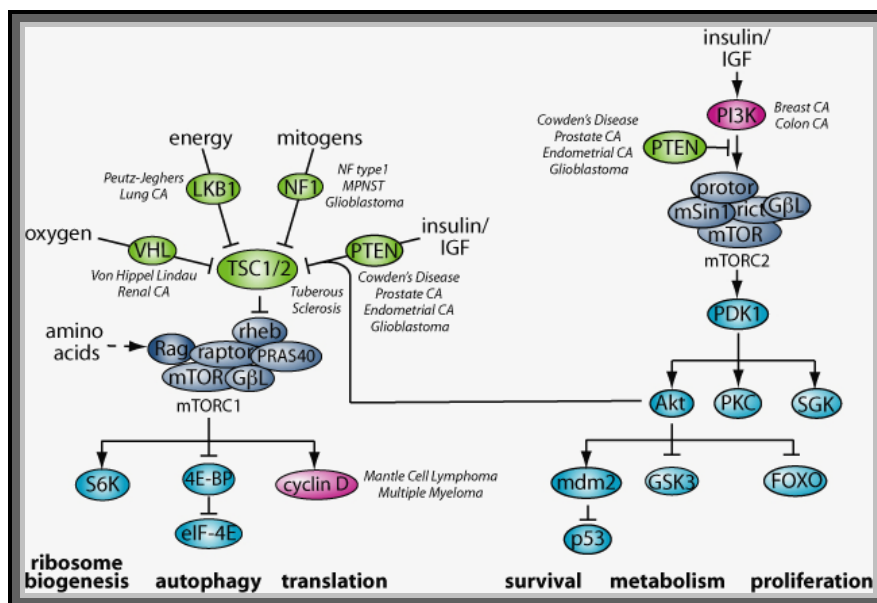


Fig. 12 Schematizzazione di tutti i segnali esterni che giungono alla cellula e permettono l'attivazione del complesso mTORC1 ed mTORC2 e regolazione di diversi meccanismi.

Dal punto di vista strutturale, la Rapamicina è un macrolide derivato dalla fermentazione dell' actinomicete "*Streptomyces hygroscopicus*", originariamente isolato dal terreno nell'isola di Rapa Nui nel 1975 (Fig. 13).

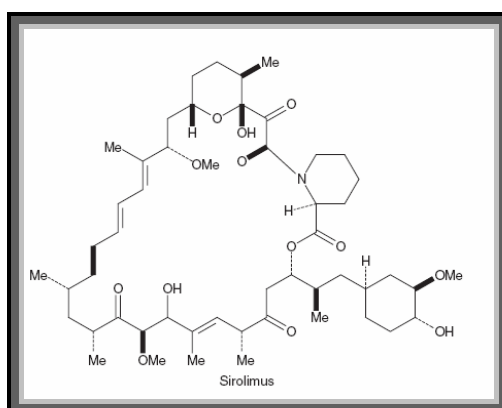


Fig. 13 struttura della Rapamicina

Al farmaco, chiamato appunto "Rapamicina" dal nome dell'isola dove fu scoperto, è stato in seguito aggiunto il nome generico di "Sirolimus", mentre

“Rapamune” è il nome registrato dall’ industria farmaceutica che lo produce e lo distribuisce (Wyeth/Pfizer Inc).

La Rapamicina venne dapprima studiata come molecola antifungina ed antitumorale e solo in seguito l’interesse per il farmaco si spostò sulle sue potenti proprietà immunosoppressive. La Rapamicina infatti, una volta legata al recettore citoplasmatico FKBP-12, interagisce con il complesso proteico mTOR bloccandone le sue funzioni.

Si ritiene che molte malattie neurodegenerative siano generate da alterazioni della conformazione di alcune proteine, che vanno incontro alla formazione di aggregati (Christie et al., 2002). Queste patologie, per le quali è stato appositamente coniato il termine di “proteinopatie”, sono caratterizzate dalla presenza, all’interno di aree specifiche del sistema nervoso centrale, di aggregati proteici che possono variamente localizzarsi in sede intra- o extracellulare nelle diverse malattie (Christie et al., 2002). Tali cambiamenti conformazionali, “misfolding”, possono essere la conseguenza di mutazioni geniche che alterano la struttura primaria della proteina codificata, di alterazioni dei sistemi che controllano il corretto processo di ripiegamento della catena polipeptidica durante la sintesi proteica, oppure di insulti tossici che possono colpire la cellula durante il proprio ciclo vitale e danneggiare la proteina in fase post-traduzionale.

Studi genetici e l’impiego estensivo di animali transgenici hanno dimostrato che le alterazioni conformazionali possono determinare la totale o parziale perdita di funzione della proteina alterata oppure conferiscono alla proteina proprietà tossiche per “guadagno di funzione”, incrementando l’attività fisiologica o causando la comparsa di nuove proprietà (Rubinsztein et al., 2007).

Dall’attività dei sistemi di degradazione proteica, in grado di regolare i normali livelli e il turnover fisiologico delle proteine, dipende la capacità della

cellula di rimuovere le proteine danneggiate e potenzialmente tossiche. L'autofagia regola il turnover fisiologico di svariati costituenti cellulari, inclusi organuli e proteine, solubili o aggregate, mediante un processo multifasico che coinvolge l'attività degradativa lisosomiale (Klionsky and Ohsumi, 1999). Sulla base delle diverse modalità con cui i componenti intracellulari vengono indirizzati ai lisosomi, si distinguono tre tipi principali di autofagia, che prendono il nome di macroautofagia, microautofagia e autofagia mediata da chaperonine (CMA). I diversi tipi di autofagia differiscono per tipologia di substrato e meccanismo di regolazione attivazione.

Tra queste la Rapamicina sembra essere un forte induttore della macroautofagia, un processo di autodegradazione che in condizioni fisiologiche è costitutivamente attivo e causa il turnover basale delle componenti cellulari e regola il bilancio di nutrienti negli eucarioti (Fig. 14) (Schmelzle and Hall, 2000, Yorimitsu and Klionsky, 2005).

È stato studiato approfonditamente il ruolo degli aggregati citotossici nelle malattie neurodegenerative, come nell'Alzheimer (AD), il Parkinson (PD), l'Huntington (HD) e varie atassie spinocerebellari (SCA), in cui mutazioni nella sequenza primaria amminoacidica causano errori nell'assemblaggio proteico con la formazione di aggregati (Berger et al., 2006). Si ritiene che una mancanza di autofagia causi la neurodegenerazione (Takada et al., 2005, Berger et al., 2006, Hara et al., 2006) e che questo meccanismo giochi un ruolo importante nella neuroprotezione (Webb et al., 2003, Ravikumar et al., 2004, Berger et al., 2006, Hornberger and Chien, 2006, Kabuta et al., 2006). In un articolo pubblicato sulla rivista Nature, Sarkar e collaboratori affermano che somministrando delle molecole denominate «small-molecule enhancers», si stimola il processo di autofagia attraverso il quale le cellule eliminano le proteine alterate e mal ripiegate come la proteina huntingtina mutante (Sarkar

et al., 2007). I ricercatori ritengono che stimolando l'autofagia nelle persone che soffrono della corea di Huntington, o in altre malattie neurodegenerative, anche se non si rallenta o arresta la produzione di proteina huntingtina, le cellule eliminano meglio i resti tossici in eccesso, ritardando l'apparizione dei sintomi (Rubinsztein et al., 2007). È stato anche dimostrato che sia la Rapamicina che il suo analogo CCI-779, siano protettivi nella *Drosophila* e in modelli murini di HD (Ravikumar et al., 2004).

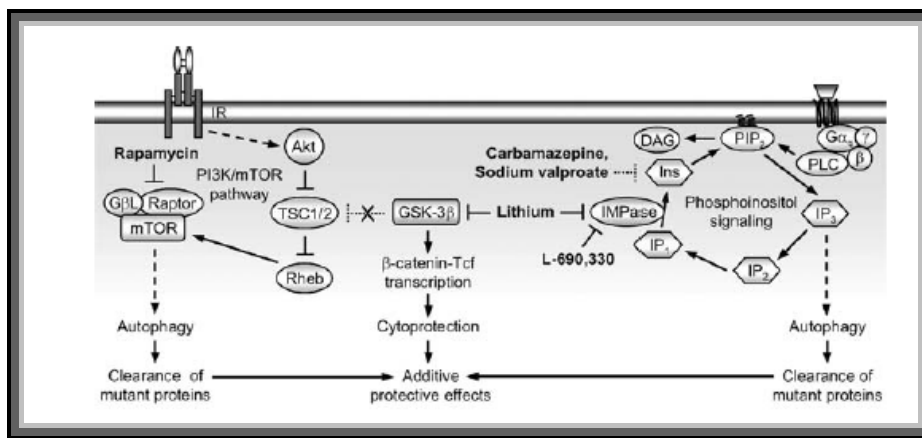


Fig. 14 Vie di attivazione intracellulari dell'autofagia ad opera della Rapamicina e del Litio

La SLA risulta essere una delle patologie in cui un'alterata conformazione proteica (SOD1) induce un accumulo di aggregati neurotossici e per questo l'autofagia sembra avere un ruolo importante.

In particolare, diversi lavori hanno riportato che l'autofagia riduce i livelli (Kabuta et al., 2006) di tossicità nella SLA mediata da accumulo di SOD1 mutata in una linea di neuroblastoma. Gli aggregati tossici di SOD1 mutata, trovati in modelli animali di fSLA e in pazienti affetti, potrebbe suggerire un meccanismo alterato di autofagia e quindi il coinvolgimento di un pathway mTOR-dipendente modificato (Bruijn et al., 1997, Watanabe et al., 2001, Kobayashi et al., 2006). Inoltre Kabuta dimostra che l'autofagia abbassa sia i livelli di proteina della SOD1 mutata, che la tossicità indotta da quest'ultima

(Kabuta et al., 2006). È stato inoltre riportato che la funzionalità di mTOR attivata attraverso la fosforilazione della Serina²⁴⁴⁸ sia ridotta nei topi mutati G93A ad uno stadio precoce prima della comparsa dei sintomi (Morimoto et al., 2007). È possibile quindi che l'autofagia regolata dalla rapamicina sia in questo modello di SLA uno dei meccanismi coinvolti. Tuttavia non ci sono lavori sui meccanismi di autofagia in vivo nella SLA.

Poiché i BCAA regolano il complesso mTOR, e poiché una loro eccessiva assunzione risulterebbe implicata nello sviluppo della SLA, saranno studiate le proprietà di scarica di potenziali d'azione e la funzionalità dei canali ionici voltaggio-dipendenti, parametri che risultano essere alterati nel corso della patologia.

3 I canali ionici Voltaggio-dipendenti e la trasmissione sinaptica

La genesi dei messaggi nervosi dipende da rapide variazioni della differenza del potenziale elettrico esistente sulle membrane neuronali. Questa rapida variazione del potenziale di membrana è denominata potenziale d'azione. Nel corso di un potenziale d'azione, il potenziale di membrana può andare incontro a variazioni dell'ordine di 500 millivolt al secondo. Variazioni di quest'ordine di grandezza sono rese possibili dalla presenza di canali ionici che costituiscono una classe di proteine integrali che attraversano la membrana da parte a parte. Questi canali posseggono tre proprietà importanti: (1) lasciano passare gli ioni; (2) riconoscono e selezionano le diverse specie ioniche; (3) si aprono e si chiudono in risposta a segnali specifici che possono essere di natura elettrica, meccanica o chimica (Kandel et al., 1991). Le dimensioni di questi canali, dedotte dalla dimensione delle più grosse particelle che possono attraversarli, corrispondono ad un diametro non maggiore di 8 Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$). Essi quindi non possono essere percorsi dalla maggior parte delle molecole non dissociate che si trovano nei liquidi organici, mentre lasciano passare, in modo più o meno selettivo nei diversi casi, molti ioni inorganici grazie alle loro dimensioni relativamente piccole (Hille, 1986). I canali ionici possiedono la peculiare caratteristica di poter passare da uno *stato aperto* o *attivato*, che consente il passaggio degli ioni, ad uno *stato chiuso* ed eventualmente, ad uno *stato inattivato*, nei quali la pervietà dei canali è interrotta e gli ioni non passano. La transizione tra lo stato di apertura e quello di chiusura può essere determinata da variazioni del potenziale di membrana. In questo caso si parla di canali ionici voltaggio-dipendenti. Se invece la modificazione è indotta da particolari sostanze in grado di combinarsi con gruppi chimici delle proteine costituenti il canale, i

canali sono detti chemio-dipendenti. I canali ionici voltaggio-dipendenti sono costituiti da due parti: un dominio che, appunto, è sensibile a variazioni di voltaggio e un dominio che forma il poro attraverso cui passano gli ioni (Pongs, 1999, Sansom et al., 2000).

3.1 Genesi ionica dei potenziali d'azione

I neuroni sono, per definizione, delle cellule eccitabili che rispondono ad uno stimolo adeguato variando il loro potenziale di membrana e, superato il valore soglia, generano un potenziale d'azione.

Le cellule nervose sono, inoltre, in grado di generare potenziali d'azione in un ampio intervallo di frequenze, e possono rispondere a piccoli cambiamenti di correnti variando di molto la loro frequenza di scarica, o di firing (Tateno et al., 2004). Le proprietà di scarica delle cellule nervose dipendono all'espressione di molti tipi di canali ionici voltaggio-dipendenti. Si ritiene che le conduttanze voltaggio dipendenti delle cellule neuronali del cervello di mammifero includano almeno 2 o 3 componenti delle correnti di sodio, 4 o 5 diverse componenti delle correnti di calcio, 4 o 5 componenti delle correnti di potassio attivate dalla variazione del voltaggio e almeno 2 o 3 di quelle attivate dal calcio, e le correnti attivate dall'iperpolarizzazione. Le proprietà di attivazione ed inattivazione di ciascun canale, e la densità alla quale sono espressi sulla membrana di ciascun neurone, determinano la forma e la ripetitività del firing (Bean, 2007).

3.2 I canali ionici del sodio voltaggio dipendenti

Il principale contributo per la genesi del potenziale d'azione è dato dai canali ionici voltaggio-dipendenti del sodio (Fig. 15). Uno stimolo depolarizzante,

infatti ne provoca la rapida attivazione (della durata di circa un centinaio di microsecondi) e la comparsa di una corrente entrante di sodio. Questa corrente induce un'ulteriore depolarizzazione che fa aprire un numero ancora maggiore di canali Na^+ , determinando un ulteriore aumento della corrente entrante. La corrente di sodio, al permanere della depolarizzazione, raggiunge un valore massimo o di picco, in seguito al quale si riduce rapidamente e ritorna al suo livello di riposo in circa 2 ms. Questo rapido decadimento spontaneo di corrente dimostra che, al permanere della depolarizzazione, i canali ionici del Na^+ presentano il fenomeno dell' inattivazione, che li rende nuovamente impervi allo ione dopo che sono stati per un breve periodo attivati nello stato aperto. La loro successiva attivazione, però, richiede il passaggio attraverso lo stato di chiusura (Taglietti and Casella, 1997). Se la depolarizzazione generata dalla corrente del sodio raggiunge un valore soglia, viene innescato il potenziale d'azione. Infatti l'attivazione di questi canali del sodio è responsabile della fase d'ascesa del potenziale d'azione (Catterall, 2000a, Yu and Catterall, 2003, Catterall et al., 2005).

I canali del sodio (Fig. 15) sono formati da una subunità α di 260 kDa associata ad una o più subunità ausiliare β ($\beta 1$, $\beta 2$ e/o $\beta 3$) di 33 ÷ 36 kDa. Ad oggi sono state identificate nove subunità α ($\text{Nav}1.1$ - $\text{Nav}1.9$). Le subunità α sono suddivise in quattro domini (I – IV) simili tra loro e ognuno dei quali contiene sei α -eliche transmembrana (S1 – S6). Ogni dominio ha nell' α -elica S4 dei residui amminoacidici carichi positivamente che inducono cambiamenti conformazionali nel canale a seconda del potenziale di membrana. Ogni dominio ha, tra le α -eliche S5 e S6, un *loop* rientrante che va a formare la parte extracellulare del poro (quella responsabile della selettività del canale) mentre l' α -elica S6 va a formare la parte intracellulare del poro (Catterall, 2000a, Yu and Catterall, 2003, Catterall et al., 2005).

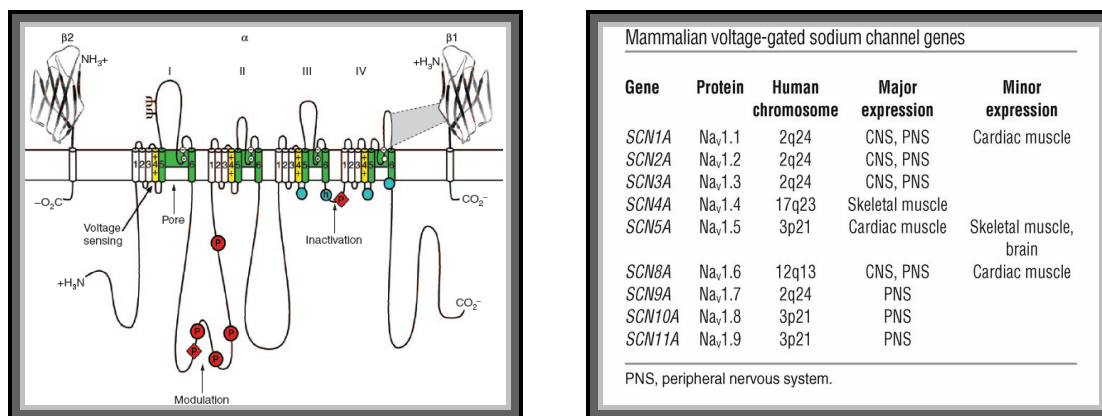


Fig. 15 *Struttura dei canali del sodio voltaggio-dipendenti. A sinistra) Rappresentazione schematica delle subunità del canale dei canali del sodio voltaggio-dipendenti. La subunità α è illustrata insieme alle subunità $\beta 1$ e $\beta 2$. I numeri romani indicano i domini dei segmenti, 5 e 6 sono i segmenti che formano il poro (verde), 4 è il sensore del voltaggio (giallo), il loop intracellulare tra i domini III e IV contiene il motivo IFM responsabile dell'inattivazione (celeste), P sono i siti di fosforilazione (i cerchi rossi sono i bersagli della protein chinasi A e i rombi rossi sono i bersagli della protein chinasi C) e Ψ è un probabile sito di N-glicosilazione (Yu and Catterall, 2003). Il TTx si lega al primo loop. A destra) Classificazione e localizzazione dei geni codificanti le subunità α del canale del sodio.*

Da un punto di vista sperimentale, i canali del sodio sono stati i primi canali voltaggio-dipendenti ad essere scoperti. Da un punto di vista evolutivo, sono invece gli ultimi ad essersi sviluppati. I canali del sodio infatti sembrano derivare dai canali del calcio che contengono quattro domini omologhi (Yu and Catterall, 2003).

I lavori di Hodgkin e Huxley hanno definito le tre caratteristiche principali dei canali del sodio: l'attivazione voltaggio-dipendente, la conduttanza selettiva e l'inattivazione spontanea. Come già visto le prime due caratteristiche risiedono rispettivamente in una serie di residui amminoacidici carichi positivamente e nel loop rientrante tra le α -eliche S5 e S6. L'inattivazione è un processo rapido che avviene nel giro di pochi millisecondi ed è determinato dal loop che connette i domini III e IV. All'interno di questo loop è presente una sequenza di tre amminoacidi denominata IFM (da Isoleucina, fenilalanina e metionina) la cui fenilalanina si

lega al lato citoplasmatico del poro causandone la chiusura (Catterall, 2000a, Yu and Catterall, 2003, Catterall et al., 2005).

Questi canali possono essere bloccati dalla tetrodotossina (TTX), una tossina letale prodotta dai pesci appartenenti alla famiglia dei Tetraodontidae (il cui esemplare più noto è il pesce palla). Questa tossina va a legarsi nel poro selettivo del canale impedendo l'ingresso del sodio senza tuttavia alterare i meccanismi d'apertura del canale (Song et al., 1997).

I canali del sodio, oltre alla tipica corrente a rapida inattivazione e responsabile del potenziale d'azione denominata corrente transiente (I_{NaT}), possono generare una corrente "non-inattivante", denominata corrente persistente (I_{NaP}) (Ogata and Ohishi, 2002). Le prime osservazioni della presenza di una corrente di sodio sottosoglia persistente provengono da studi sull'ippocampo, cervelletto e neocorteccia di guinea pig. Attualmente non è ancora stata determinata con esattezza l'origine di questa corrente ma sono state proposte due teorie per spiegare questa corrente (Kiss, 2008).

La prima teoria è basata sul modello di Hodgkin-Huxley che definisce questa corrente come una finestra di corrente ("window current") generata dall'ampio set di stati di inattivazione della I_{NaT} in grado di sostenere questa piccola corrente entrante (Hodgkin and Huxley, 1952). Da questa teoria sono nate ipotesi sul probabile meccanismo molecolare di queste modifiche cinetiche (Alzheimer et al., 1993) del canale del sodio regolato da fosforilazioni o dall'interazione con proteine G (Agrawal et al., 2001).

La seconda teoria nasce dall'idea di un diverso sottotipo di canale del sodio, che non si inattiva (French et al., 1990). La diversità molecolare dei canali voltaggio dipendenti del sodio deriva dal fatto che la componente strutturale principale nel cervello, la subunità α (260-kDa), presenta nove diverse forme con un'omologia di sequenza amminoacidica > del 50 %. Le cinetiche di conduzione risultano così diverse e sono modulate sia dal tipo di subunità

alfa espressa sia dall'associazione di questa con le diverse subunità ausiliari (beta). Alcuni canali del sodio hanno quindi una modalità di conduzione ionica persistente rispetto ad altri in cui risulta transiente.

La I_{NaP} può essere già osservata a circa -70 mV e ad un V_{50} (ossia il voltaggio alla quale sono attivi il 50 % dei canali) di -52 mV (molto più negativo del V_{50} della I_{NaT} di -34 mV), condizione in cui il neurone presenta pochi canali del sodio transienti attivi e quindi una più alta resistenza di ingresso. La resistenza all'inattivazione fa sì che questa corrente possa indurre un ingresso di sodio all'interno della cellula pari a quello della I_{NaT} (Saint, 2008).

L'attività persistente dei canali del sodio è responsabile delle oscillazioni sottosoglia del potenziale di membrana della cellula e del firing evocato a potenziali di soglia bassi nella corteccia entorinale di ratto (Agrawal et al., 2001). Questo causa un'attività sinaptica sostenuta che, in condizioni fisiologiche potrebbe avere influenza sulla codificazione della memoria mentre in situazioni patologiche contribuisce all'epilettogenesi e alla neurodegenerazione (van Zundert et al., 2008).

Negli ultimi anni la corrente del sodio persistente è stata molto studiata soprattutto da un punto di vista clinico. Infatti è stato osservato come questa corrente risulti aumentata in neuroni corticali di topi transgenici malati di SLA (a causa dell'espressione della forma mutata della superossido dismutasi) (Kuo et al., 2005, Tamura et al., 2006, Pieri et al., 2009). Questa corrente tuttavia poteva essere ridotta mediante la somministrazione di riluzolo a basse concentrazioni (Urbani and Belluzzi, 2000, Pieri et al., 2009). La stessa corrente è stata definita come la causa dell'incremento di calcio intracellulare associato a casi di angina ed aritmie cardiache varie (Maier, 2009). Tali malattie possono essere curate con l'utilizzo di un farmaco in grado di bloccare tale corrente, la ranolazina (Maier, 2009).

3.3 I canali ionici del calcio Voltaggio dipendenti

I livelli intracellulari del calcio regolano molti processi cellulari come la trascrizione genica, il differenziamento fenotipico, l'attivazione di enzimi ed in particolare nelle cellule nervose sono implicati nel rilascio del neurotrasmettitore, nella regolazione e morte neuronale (Randall and Tsien, 1995, Scamps et al., 1998). Tutti i canali del calcio (Fig. 16) presentano voltaggio-dipendenza e sono attivati dalla depolarizzazione. Attraverso essi fluisce una corrente ionica entrante, e possono svolgere nelle membrane delle cellule eccitabili, un ruolo simile a quello del sodio nella genesi del potenziale d'azione. L'attività dei canali voltaggio dipendenti del calcio diventa quindi fondamentale per accoppiare i segnali elettrici a delle ben precise reazioni cellulari (Catterall, 2000b, Catterall et al., 2005, Catterall and Few, 2008). Caratteristica generale dei canali ionici del calcio è la loro bassa conduttanza che, unitamente alla loro relativa scarsità nelle membrane fa sì che la loro attivazione abbia generalmente un effetto limitato sul potenziale di membrana, sicuramente meno importante di quello dei canali del sodio e del potassio. Anche le cinetiche di attivazione e di inattivazione sono meno veloci di quelle dei canali del sodio e di conseguenza le correnti del calcio sostengono generalmente le "componenti lente" delle manifestazioni elettriche cellulari. Un'ultima caratteristica che accomuna i vari tipi di canali ionici per il calcio è quella di essere, pur in diverso grado, bloccati da alcuni cationi bi- e tri-valenti come il cadmio, il nichel e il lantanio.

I neuroni possiedono diversi tipi di canali del calcio voltaggio-dipendenti ed è proprio in relazione alla loro voltaggio-dipendenza e alle caratteristiche della loro inattivazione che si possono suddividere in due categorie (Carbone and Swandulla, 1989). I canali "low voltage activated" o LVA, sono così chiamati perché vengono attivati già da modeste depolarizzazioni della membrana

cellulare. Essi presentano una pronta inattivazione voltaggio-dipendente per cui, al permanere della depolarizzazione, essi rimangono aperti solo per breve tempo e da qui il nome alternativo di canali T (transienti), (Carbone and Lux, 1987). Questi canali hanno una conduttanza piuttosto bassa e sono numerosi in molti tipi di neuroni ma non in tutti, mancano per esempio nei neuroni dei gangli ortosimpatici. La principale funzione dei canali LVA sembra essere quella di partecipare alla genesi dei potenziali d'azione ed alla modulazione della loro frequenza di scarica. Farmacologicamente questi canali sono più sensibili al nichel che agli altri cationi (Lnenicka and Hong, 1997).

I canali "high voltage activated" o HVA, sono così chiamati perché il loro passaggio allo stato attivo richiede depolarizzazioni membranali relativamente elevate. I canali HVA sono caratterizzati da una conduttanza più elevata rispetto ai canali LVA, dall'essere più sensibili al cadmio rispetto al nichel e dall'essere più permeabili al bario rispetto al calcio (Fox et al., 1987). Per questi canali l'inattivazione è relativamente lenta ed è determinata primariamente dall'innalzamento della concentrazione intracellulare dello ione calcio. Si tratta di un meccanismo autolimitante (feed-back negativo) che è finalizzato ad impedire che la concentrazione intracellulare del calcio si innalzi al di sopra dei limiti fisiologici. La funzione dei canali HVA è quella di accoppiare i fenomeni elettrici membranali con i vari processi calcio-dipendenti che avvengono all'interno della cellula. In base alla sensibilità a diversi bloccanti farmacologici, i canali HVA possono essere ulteriormente suddivisi in:

- canali L, bloccati dai vari tipi di diidropiridine;
- canali N, bloccati dall' ω -conotossina;
- canali P/Q, bloccati dall' ω -agatossina.

La distinzione farmacologica è il miglior criterio usato per distinguere i canali del calcio HVA. Essi presentano infatti caratteristiche differenti per quanto

riguarda l'attivazione, la conduttanza e la velocità di inattivazione a secondo del tipo di cellule in cui sono presenti. Ad esempio i canali N, nella radice del ganglio dorsale di pollo, hanno una velocità di inattivazione maggiore e una conduttanza che è circa la metà di quella dei canali L. In altri neuroni di mammifero, invece, la conduttanza e la velocità di inattivazione dei canali N risulta essere la stessa di quella dei canali L (Lnenicka and Hong, 1997). Le proprietà biofisiche dei canali P e Q, identificati recentemente, non sono state così ampiamente esaminate come quelle dei canali N ed L. I canali di tipo P, originariamente descritti nelle cellule del Purkinje del ratto, hanno un'attivazione ad un voltaggio più negativo rispetto ai canali N ed L e una più lenta velocità di inattivazione (Mintz et al., 1992). La corrente dei canali di tipo Q, trovata nei granuli di cervelletto di ratto, è simile alla corrente dei canali P, eccetto per la sua più rapida inattivazione (Randall and Tsien, 1995). Esistono inoltre dei canali del calcio che non risentono dell'effetto di nessun tipo di bloccante degli altri canali del calcio. Questi canali sono detti di tipo R (Resistenti).

In numerosi studi sperimentali, l'ingresso presinaptico di calcio è stato associato principalmente ai canali del calcio di tipo P/Q e N (Qian and Noebels, 2001), anche se è stato riportato il coinvolgimento di altri tipi di canale, in particolare i canali di tipo R (Svoboda and Mainen, 1999). La loro attivazione è guidata dal potenziale di membrana ma dipende molto dallo stato del canale. Alcuni neuroni utilizzano solo un tipo di canale (N o P/Q) altri invece utilizzano i due canali e coinvolgono anche canali di tipo R (Wilson et al., 2001). Tuttavia a livello della corteccia motoria sono state identificate principalmente le componenti N-, L-, P/Q, ed R distinte farmacologicamente (Lorenzon and Foehring, 1995). Evidenze sempre più convincenti suggeriscono che i canali P/Q sono associati a siti di rilascio ad alta probabilità di neurotrasmettitore (Reid et al., 2003). I canali P/Q ed N, in

presenza di fattori neurotrofici, come per esempio il BDNF, aumentano l'attività sinaptica, aumentano la loro densità sulle membrane neuronali (Baldelli et al., 2002).

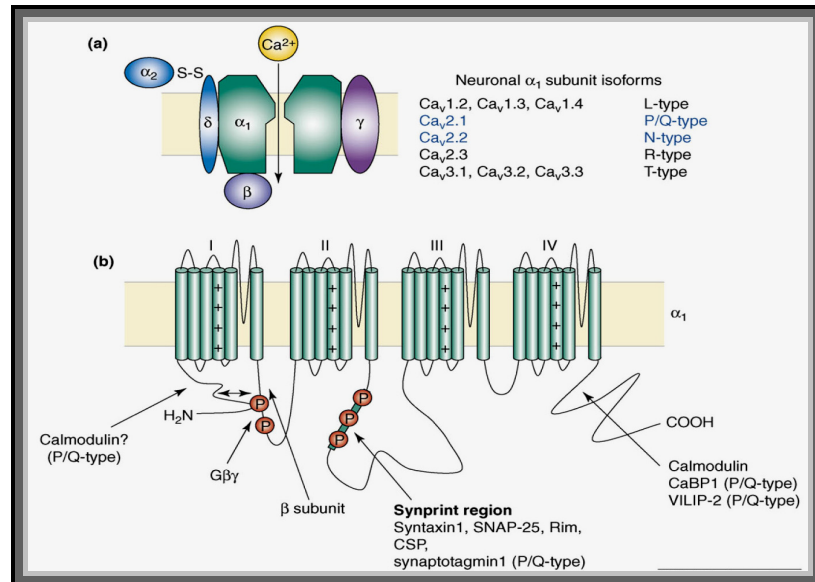


Fig. 16 Aspetti strutturali dei canali Ca^{2+} voltaggio dipendenti. (a) subunità che compongono i canali Ca^{2+} e (b) topologia della porzione transmembrana della subunità α_1 . Sono indicati i siti chiave di interazione delle proteine. I cerchi rossi rappresentano i siti chiave di fosforilazione e i simboli + indicano le eliche transmembrana sensibili al voltaggio per ciascun dominio. Le subunità $\beta\gamma$ della proteina G possono interagire a livello di una regione formata dall'N-terminale dei domini I e II dell'ansa intracitoplasmatica, da (Evans and Zamponi, 2006).

Scopo dello studio

L'ipotesi per cui gli amminoacidi a catena ramificata, valina, leucina e isoleucina, (Branched Chain Amino Acids: BCAA) possano essere coinvolti nella patogenesi della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è alla base di questa tesi.

Sono stati condotti molti studi epidemiologici sulla SLA ed in particolare è stata riscontrata un'aumentata incidenza ed una diminuita età di manifestazione, statisticamente significative, di questa patologia tra i calciatori professionisti (Chiò et al., 2005, Belli and Vanacore, 2005).

Una corretta assunzione dei BCAA è necessaria per una normale crescita e sviluppo e quindi sono importantissimi nell'alimentazione. È stato dimostrato che i BCAA rallentano l'insorgenza della fatica di tipo centrale (Newsholme and Blomstrand, 2006) e che questi promuovono la sintesi proteica (effetto anabolizzante), aumentando la massa muscolare corporea. Per tale ragione questi amminoacidi vengono ampiamente utilizzati come integratori alimentari in ambito sportivo come ad esempio nel gioco del calcio, esercitato a livelli agonistici.

Sono state avanzate diverse ipotesi sul ruolo che queste sostanze hanno nella SLA ed una di queste suggerisce che l'integrazione di alte concentrazioni di BCAA possa determinare, con meccanismi non ancora noti, una maggiore predisposizione a questa patologia (Belli and Vanacore, 2005, Vanacore et al., 2006, Taioli, 2007b).

È noto infatti che un supplemento di BCAA crei un'alterazione dell'attività della trasduzione del segnale delle vie che regolano la trascrizione dei geni coinvolti nella crescita muscolare (Blomstrand et al., 2006), in particolare coinvolgendo il complesso intracellulare dell'mTOR (mammalian target of Rapamycin).

Studi precedenti hanno indicato che nel modello murino di SLA (G93A), sia i motoneuroni spinali (Pieri et al., 2003, Kuo et al., 2004) che i neuroni corticali (Pieri et al., 2009) risultano essere maggiormente eccitabili rispetto ai neuroni di controllo a parità di stimolazione e questa riscontrata ipereccitabilità è stata più volte riportata in lavori clinici relativi a pazienti SLA (Caramia et al., 2000, Naka and Mills, 2000). Il coinvolgimento dell'ipereccitabilità corticale osservata sia in cellule prelevate dal modello murino G93A che in pazienti affetti da SLA, e i dati epidemiologici che ipotizzano l'uso di sostanze anaboliche nello sviluppo di questa patologia, hanno suggerito la linea di ricerca adottata nel corso di questa tesi.

Si è deciso infatti di esaminare gli effetti di un'esposizione prolungata delle cellule corticali in coltura primaria ai BCAA. In seguito a questo trattamento è stata studiata l'attività elettrica neuronale effettuando registrazioni elettrofisiologiche ed utilizzando la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell sia in modalità current-clamp che voltage-clamp.

Si è voluto studiare quindi se la somministrazione di BCAA fosse in grado:

- (1) di modificare le proprietà biofisiche dei potenziali d'azione;
- (2) di modulare la funzionalità delle correnti ioniche di membrana, voltaggio-dipendenti di Sodio e Calcio, implicate nell'eccitabilità intrinseca neuronale;
- (3) di modificare l'attivazione di vie di trasduzione del segnale mTOR; per fare ciò è stato valutato l'effetto della Rapamicina, inibitore di mTOR, sull'eccitabilità neuronale sia in neuroni trattati con i BCAA che nel modello transgenico di SLA, G93A, rispetto alla condizione di controllo.

La comprensione di come i BCAA influiscano sulle proprietà fisiologiche e funzionali dei neuroni corticali può permettere di stabilire un loro possibile coinvolgimento nell'eziopatogenesi della SLA contribuendo alla

comprensione del probabile meccanismo d'azione interessato, al fine di individuare nuovi trattamenti terapeutici.

4 Materiali e metodi

4.1 Colture cellulari

I dati riportati in questa tesi sono stati ottenuti da esperimenti eseguiti sui neuroni corticali di topi C57BL/6J e di topi transgenici G93A (B6SJL-TgN 1 Gur, Laboratori Jackson U.S.A) in cui viene fatta sovraesprimere la SOD1 umana mutata insieme alla forma murina. Il topo G93A è caratterizzato dalla sostituzione, in eterozigosi, di una glicina con un'alanina in posizione 93. Questi topi manifestano, a partire dal quarto mese di vita, i primi sintomi della malattia (indebolimento prima degli arti inferiori con difficoltà deambulatorie e poi interessamento degli arti superiori) che, entro i quattro mesi, si rivelerà fatale.

I topi transgenici G93A mostrano un'attività elevata della superossido dismutasi indicando che la patologia non è causata da una riduzione dell'attività enzimatica ma dalla presenza stessa della mutazione che risulta, quindi, essere tossica (Gurney et al., 1994, Gurney, 1997, Gurney, 2000).

Le colonie murine sono state allevate nello stabulario sito presso la Stazione per la tecnologia animale dell'Università degli studi di Roma "Tor Vergata", progettando ed attuando gli accoppiamenti. I topi vengono separati quando si verifica la formazione di un tappo di sperma nell'orifizio genitale della femmina e da quel momento si considera la femmina gravida. Gli embrioni vengono prelevati al quindicesimo giorno di gestazione (E15) (la gravidanza dura diciotto-venticinque giorni), praticando un taglio nella regione ventrale della femmina, precedentemente anestetizzata, letalmente, con alotano (Sigma). Si procede così alla dissezione, che viene effettuata con l'ausilio di uno stereomicroscopio (Zeiss, Stemi 2000) e con strumenti di dissezione sterili. Come precedentemente descritto, da ogni embrione viene rimosso il cervello che viene successivamente liberato dalle meningi; a questo punto è possibile

prelevare gli emisferi corticali (Dugan et al., 1995, Carunchio et al., 2007). Terminata la dissezione, le cortecce cerebrali, riunite in un'unica provetta che contiene 5 mL di PBS (phosphate-buffered saline, GIBCO), vengono centrifugate per 3 minuti a 1100 rpm a circa 15°C. Viene quindi rimosso il surnatante e aggiunto 1 mL di tripsina allo 0.025% (Sigma) per ogni corteccia prelevata. Le cortecce vengono lasciate in incubatore a 37°C e al 5% di CO₂ per 10 minuti, al termine dei quali si provvede ad inattivare la tripsina con l'aggiunta di 100 µL di FBS per ogni mL di tripsina. Si procede centrifugando nuovamente a 1100 rpm per 3 minuti a 15°C e al termine della centrifuga si elimina il supernatante. Si sospende il pellet con il terreno di coltura composto da Neurobasal e supplementato con B27 (1/50 mL), L-glutamina (250 µL/50 mL) e gentamicina (100 µL/50 mL) e si procede alla triturazione meccanica attuata per mezzo di Pasteur di vetro. Le cellule così ottenute vengono contate con l'ausilio della Camera di Thoma. Si procede quindi alla piastratura delle cellule di Controllo, che viene effettuata in capsule di Petri del diametro di 35 mm (Falcon). Al fine di rendere il substrato più adesivo per le cellule, le Petri e i vetrini in esse contenuti vengono ricoperte, e lasciate per tutta la notte, da una soluzione acquosa di Poly-L-lisina (1 mg/ml, Sigma). La piastratura è quindi effettuata ad una densità pari a 750.000 cellule/2mL di terreno e le Petri vengono poste in incubatore alla temperatura di 37°C e con il 5% di CO₂. Le cellule neuronali sono state utilizzate per questi esperimenti a partire dal settimo-ottavo giorno dalla data della coltura (7-8 days "in vitro", DIV) (Fig. 17).

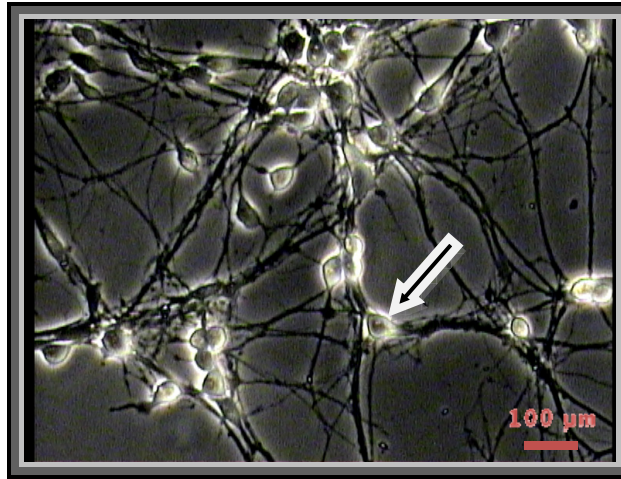


Fig. 17 Coltura primaria di corteccia di topo al 8 giorno in coltura (8 DIV)

Per ogni nuova nidata delle colonie e per ogni embrione utilizzato per le colture primarie, si è proceduto con uno screening proteico per rilevare l'espressione della proteina umana. La tecnica consiste nell'analizzare i campioni tramite una elettroforesi proteica su gel verticale di acrilamide che consente la separazione delle proteine in base alle dimensioni e alla carica netta. I campioni sono omogenati e derivano, nel caso degli embrioni, dal corpo dell'embrione stesso, e nel caso dei topi, dall'estremità della coda. L'omogenizzazione viene effettuata manualmente in PBS Dulbecco's, utilizzando degli appositi pestelli.

Successivamente i campioni vengono sottoposti a due cicli congelamento-scongelo, immergendoli alternativamente in azoto liquido e in un bagnetto termostato a 37°C. Ad ogni campione viene aggiunto un campione di caricamento contenente 40% glicerolo, Tris HCl pH 6,8 (250 mM) e Blu di Bromo Fenolo come colorante (Sigma). Il gel di poliacrilamide è costituito da una porzione detta di impaccamento, che corrisponde alla regione dove sono presenti i pozzetti, e da una porzione detta di separazione.

Gel di separazione: 10% acrilamide (Genaxis), Tris HCl pH 8,8 (0,37 M), 10% ammonio persolfato (Genaxis), TEMED (1 mM) (Genaxis), H₂O.

Gel di impaccamento: 4% acrilamide, Tris HCl pH 6,8 (0,12 M), 10% ammonio persolfato, TEMED (1 mM), H₂O.

Le due regioni del gel differiscono, quindi, per la percentuale di acrilamide e per il pH e la concentrazione del Tris-HCl che le costituisce.

Le normali dimensioni di un gel sono 12 cm × 14 cm con uno spessore di 1,2 mm. Un pettine di plastica viene inserito tra le due lastre contenenti il gel appena preparato in modo da creare diversi pozzetti per il caricamento dei campioni. Dopo circa 30 minuti la polimerizzazione è ultimata, si toglie delicatamente il pettine e il gel è così pronto per il caricamento.

L'elettroforesi viene eseguita a 4° C in Trisglicina, applicando una intensità di corrente pari a 15 mA per ogni gel.

Terminata la corsa elettroforetica i gel vengono sottoposti a colorazione, che consiste nell'immersione dei gel in una soluzione acquosa contenente 1 mg/ml di Nitro Blue Tetrazolium (Sigma) per 45 minuti. Tale composto è in grado di interagire con i radicali superossido prodotti dalla fotossidazione ciclica della riboflavina, presente in una soluzione in cui il gel verrà immerso successivamente. Questa seconda soluzione contiene K₂HPO₄ (36 mM) a pH 7,8, TEMED (28 mM), e riboflavina, assumendo una colorazione violetta.

Tale colorazione permette di evidenziare le bande corrispondenti ad attività SOD1 come zone del gel in cui tale colorazione non appare (Fig.18).

Questa tecnica consente di distinguere, con certezza, i campioni contenenti la SOD1 umana, e quindi il transgene, dai campioni che contengono solamente la SOD1 murina. Lo screening è stato eseguito prima di ogni esperimento per poter discriminare tra cellule G93A positive e negative (Controlli).

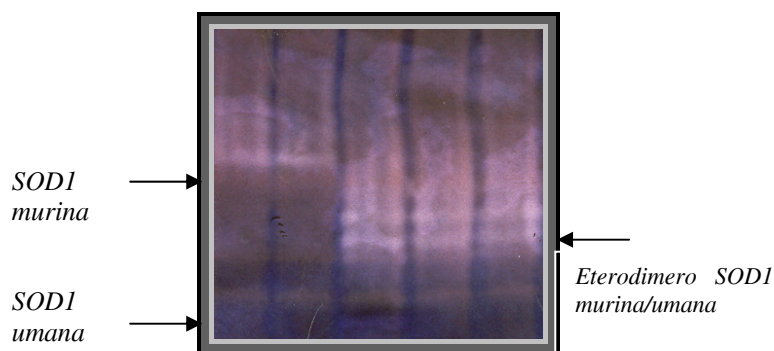


Fig. 18 Risultato di uno screening proteico per una popolazione di cellule G93A. Nei campioni positivi è possibile osservare la presenza della SOD1 umana e dell'eterodimero SOD1 murina/umana. Nei campioni negativi è rilevabile solo la SOD1 murina. La banda corrispondente alla SOD1 murina non è osservabile nei campioni G93A poiché la quasi totalità della proteina murina è impegnata nella formazione dell'eterodimero con la SOD1 umana.

4.2 Trattamento delle cellule corticali

Le colture cellulari, risultate negative per la presenza del transgene, sono state successivamente trattate per diversi tempi sia con i tre BCAA (Sigma) somministrati contemporaneamente per 1-7 giorni, sia con Valina, Leucina e Isoleucina singolarmente per 6 giorni. Inoltre sono stati condotti esperimenti trattando le cellule con Alanina e Fenilalanina (Sigma) per 6 giorni e con Rapamicina per 24 h o 6 giorni (Vinci-Biochem). Gli unici esperimenti condotti sulle cellule provenienti dagli embrioni G93A sono stati quelli in cui è stato studiato l'effetto di un trattamento con la Rapamicina (24 h). Tutte le sostanze sono state aggiunte nel terreno di crescita. Gli stock di amminoacidi sono stati preparati in acqua sterile, mentre lo stock di Rapamicina in DMSO sterile (Sigma) ad una concentrazione di 1 mg/ml. Almeno 4 colture diverse sono state utilizzate per ciascun parametro analizzato attraverso l'applicazione di tecniche elettrofisiologiche.

4.3 Registrazione elettrofisiologiche

4.3.1 La tecnica del Patch-Clamp

La tecnica del “patch-clamp” (letteralmente, blocco di area) è stata ideata nel 1976 da Erwin Neher e Bert Sakmann per la registrazione delle correnti di singoli canali ionici (Neher and Sakmann, 1976). Questa tecnica costituisce un perfezionamento di quella di blocco del voltaggio (“voltage-clamp”). Infatti grazie agli esperimenti di patch-clamp, si è potuto risalire al comportamento delle singole unità componenti il segnale di corrente rilevato nei tradizionali esperimenti di voltage-clamp. La tecnica del patch-clamp utilizza un elettrodo metallico che viene inserito in una micropipetta di vetro contenente un’ appropriata soluzione di elettroliti. La punta della pipetta è dotata di un’apertura terminale del diametro di 2-3 μm che viene appoggiata delicatamente sulla membrana cellulare e vi aderisce strettamente, formando una saldatura, detta seal così perfetta da consentire attraverso di essa solo una minima fuga (leakage) di corrente dall’interno del microelettrodo verso il liquido extracellulare (Fig. 19). La formazione di un buon seal è facilitata da una debole suzione tramite un tubicino di gomma collegato al microelettrodo; il seal deve comunque raggiungere una resistenza di almeno 1-10 Giga Ω (10^9 - 10^{10} Ohm) affinché si realizzi una condizione di isolamento elettrico sufficiente perché il microelettrodo raccolga le correnti che fluiscono attraverso i pochi canali ionici che si trovano nell’area di alcuni μm^2 del “patch” (Taglietti e Casella, 1991).

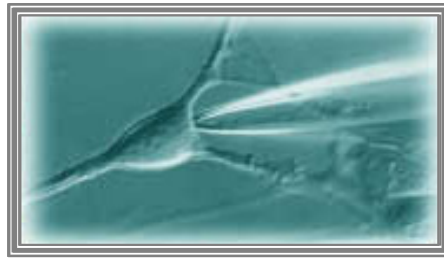


Fig. 19 *Fotografia della punta dell'elettrodo entrata in contatto con la membrana cellulare (da Queen's Medical Center, University of Hawaii).*

Per avvicinare l'elettrodo al preparato cellulare si utilizza un micromanipolatore in grado di spostare un supporto (holder) su cui è montato l'elettrodo. L'holder garantisce la continuità elettrica tra la soluzione conduttrice con cui è riempito l'elettrodo e l'amplificatore differenziale. La soluzione conduttrice è una soluzione fisiologica intracellulare filtrata, che può essere modificata in modo da consentire condizioni il più possibili fisiologiche e adatte al tipo di esperimento che si vuole intraprendere. L'amplificatore costituisce il sistema elettrico ed è fornito di due ingressi: quello invertente (-) che riceve il potenziale di membrana e quello diretto (+) che riceve il potenziale di comando ottenuto da un generatore esterno regolabile. Ogni volta che il potenziale di comando (V_c) e quello di membrana non coincidono, l'amplificatore eroga "una corrente di clamp" che viene immessa nella cellula attraverso l'elettrodo e la sua intensità è proporzionale alla differenza tra i potenziali dei due ingressi dell'amplificatore ($V_c - V_m$), mentre la direzione è sempre tale da riportare V_m al valore corrispondente al segnale di comando (V_c) (Fig. 20).

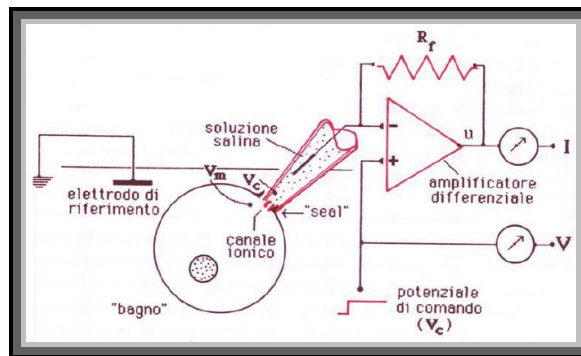


Fig. 20 Rappresentazione schematica del principio del patch clamp

Il preparato cellulare è situato in una capsula di Petri (su vetrino) alloggiata sul piano di un microscopio invertito (Axiovert 25; 400x). Il vetrino contenente le cellule viene prelevato pochi minuti prima dell'inizio dell'esperimento. Sotto la cappa sterile a flusso laminare si sostituisce il normale terreno di coltura con la soluzione fisiologica esterna filtrata. Con l'ausilio del microscopio invertito si immerge l'elettrodo nel bagno controllando che la resistenza dell'elettrodo sia di 3-4 M Ω .

Nel corso degli anni questa tecnica è stata applicata a parecchi tipi di cellule, nervose e non, per lo studio di tutte e tre le grandi famiglie di canali ionici conosciute: i canali voltaggio-dipendenti, i canali dipendenti dai neurotrasmettitori, e i canali attivati dagli stimoli meccanici (Kandel et al., 1994).

4.3.2 Configurazioni

La tecnica del patch-clamp si è rivelata molto versatile anche per le finalità che vanno al di là della determinazione delle correnti di singolo canale. Con opportune manovre, infatti, si possono realizzare alcune interessanti condizioni che consentono, da un lato un facile studio delle correnti globali dell'intera membrana cellulare esterna al "patch", e dall'altro di esaminare il comportamento di una piccola area membranale rimossa dalla cellula e posta

in contatto con mezzi diversi da quelli naturali (Taglietti, 1991). Le configurazioni più comunemente utilizzate sono quattro (Fig.21):

Cell-attached: la normale condizione di patch che si ottiene semplicemente poggiando la punta dell'elettrodo alla cellula e ottenendo una resistenza di circa 1 G Ω (gigaseal). Questa configurazione permette lo studio delle correnti microscopiche di singolo canale e di variare la composizione ionica della soluzione a contatto con versante esterno della membrana compresa nel "patch".

Whole-cell: si ottiene producendo la rottura della membrana compresa nel patch esercitando tramite il microelettrodo una suzione di sufficiente intensità. Questa configurazione permette di studiare le correnti ioniche "macroscopiche" che fluiscono attraverso l'intera superficie membranale esterna al patch.

Tutti gli esperimenti eseguiti in questa tesi sono stati compiuti in configurazione whole-cell, cioè sono state studiate le correnti ioniche totali della membrana cellulare.

4.3.3 Current-clamp e Voltage-clamp

Due sono le tecniche elettrofisiologiche di registrazione intracellulare: il current-clamp e il voltage-clamp.

Il current-clamp permette di misurare la differenza di potenziale generata a cavallo della membrana dal passaggio di una corrente di intensità nota. Con questa tecnica si misura inoltre una qualsiasi variazione del potenziale di membrana, in risposta a stimoli di corrente. A tal fine lo sperimentatore necessita di un microelettrodo che, collegato ad un generatore di corrente costante regolabile, è in grado di "iniettare" la corrente nella cellula e di prelevare i segnali provenienti da questa. Ciò è possibile utilizzando un amplificatore che permette la lettura del potenziale di membrana e qualsiasi

sua variazione conseguente all'ingresso della corrente iniettata dal microelettrodo.

La tecnica del voltage-clamp consiste invece nel portare la membrana cellulare ad un potenziale prefissato e misurare le correnti che vi passano attraverso; per fare ciò è necessario un amplificatore che misuri la corrente che passa attraverso la membrana e vi supplisca con una corrente uguale e contraria, in modo che il potenziale non sia ulteriormente modificato. Si dice perciò che il potenziale è "clampato", cioè bloccato ad un certo livello scelto dallo sperimentatore. La tecnica di registrazione elettrofisiologica utilizzata per ottenere i dati relativi a questa tesi è stata quella del voltage-clamp.

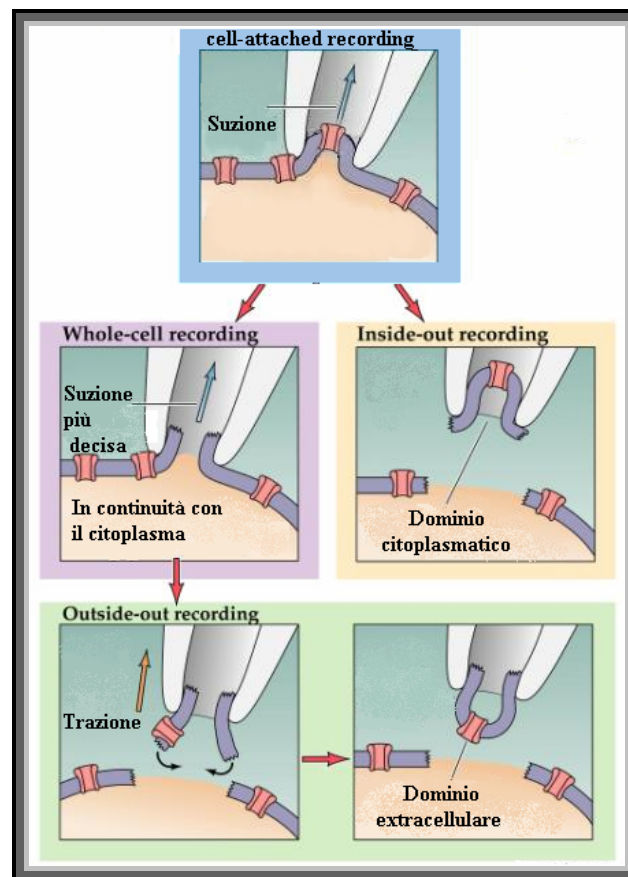


Fig. 21 Procedimento per ottenere le quattro configurazioni principali della tecnica del patch-clamp: (A) cell-attached; (B) whole-cell; (C) inside-out; (D) outside-out.

4.3.4 Le proprietà elettriche della membrana cellulare

La membrana citoplasmatica può essere paragonata ad un condensatore elettrico; infatti la sua composizione strutturale le conferisce due specifiche proprietà elettriche: la resistenza e la capacità. La resistenza dipende dal numero e dalla permeabilità dei diversi canali ionici che attraversano la tela membranale e consentono il passaggio degli ioni. La capacità dipende dal potere del doppio strato fosfolipidico di accumulare, ai due versanti membranali, due strati di ioni di segno opposto. Infatti le catene idrocarburiche dei fosfolipidi di membrana, essendo apolari, costituiscono uno strato isolante analogo al dielettrico di un condensatore, mentre i gruppi fosfatidici polari che si affacciano alle due superfici membranali (interna ed esterna) possono accumulare o cedere, grazie alla loro dissociazione, cariche elettriche in modo analogo alle armature di un condensatore. La capacità della membrana dipende, inoltre, dal suo limitato spessore che è circa di 60 Å. L'interazione tra le cariche di segno opposto diminuisce, infatti, con l'aumentare della distanza che le separa.

Le unità di misura sono il Farad (F) per la capacità elettrica, l'ohm (Ω) per la resistenza e il siemens (S) per la conduttanza che è il reciproco della resistenza e può essere definita come la misura della facilità con cui gli ioni permeano la membrana. Dal punto di vista elettrico la membrana citoplasmatica si comporta come un circuito RC, cioè una resistenza (R) ed una capacità (C) poste in parallelo.

La corrente totale di membrana che si registra risulta essere la somma di due termini: la corrente ionica (I_i), che corrisponde alla corrente provocata al passaggio degli ioni attraverso i canali ionici e la corrente capacitiva (I_c) che è

la corrente necessaria per caricare o scaricare la membrana, che funge da capacità.

$$(1) \quad I_m = I_i + I_c$$

Sapendo che la corrente capacitiva si esprime come

$$(2) \quad I_c = C_m \cdot dV_m / dt$$

dove C_m è la capacità di membrana e V_m il suo potenziale. Si può sostituire l'equazione (2) nella (1) così da ottenere che

$$(3) \quad I_m = I_i + C_m \cdot dV / dt$$

Tenendo fermo il potenziale di membrana ad un valore costante, dV_m/dt può essere considerato nullo, ricavando così:

$$(4) \quad I_m = I_i$$

In questo modo è possibile misurare direttamente la componente ionica della corrente.

4.3.5 Elettrodi e soluzioni

Per le registrazioni elettrofisiologiche di correnti ioniche, è necessario instaurare una continuità elettrica tra la cellula e l'amplificatore attraverso una micropipetta di vetro borosilicato (elettrodo) riempita di soluzione fisiologica. Gli elettrodi sono dei piccoli capillari della lunghezza di 1,12 cm

ed un diametro esterno di 1,5 mm; vengono tirati mediante uno strumento denominato “puller” (Narishige, JAPAN, Fig. 22), costituito da una torretta mobile verticale su cui viene montato l’elettrodo bloccandone le due estremità. Al centro della torretta si trova una resistenza circolare attraverso cui passa una corrente elettrica; la resistenza si oppone al passaggio di tale corrente per cui l’energia elettrica viene dissipata sotto forma di calore, provocando il surriscaldamento della resistenza che diviene quindi incandescente. Il calore liberato riscalda la zona centrale dell’elettrodo provocandone un assottigliamento. A seconda dei parametri che sono stati definiti nel puller (l’intensità di corrente che si lascia passare nella resistenza e la durata del riscaldamento di quest’ultima) e dei cicli successivi di riscaldamento e raffreddamento della resistenza, l’elettrodo si spezza; ne deriva un microelettrodo con una punta sottile e una specifica resistenza.



Fig 22. Puller per la preparazione di elettrodi di vetro

Gli elettrodi vengono preparati pochi minuti prima dell’inizio dell’esperimento, per evitare che l’umidità dell’aria alteri le proprietà desiderate. Gli elettrodi vengono quindi riempiti con la soluzione fisiologica intracellulare di registrazione specifica per l’esperimento che si vuole effettuare. Per gli esperimenti in Current-clamp sono state utilizzate soluzioni fisiologiche aventi la seguente composizione:

SOLUZIONE INTRACELLULARE

EGTA	1 mM	
K-Glu	145 mM	
CaCl ₂	0,1 mM	pH ~ 7,3
HEPES	10 mM	
Mg-ATP	2 mM	

SOLUZIONE EXTRACELLULARE:

NaCl	120 mM	
KCl	3 mM	
CaCl ₂	2 mM	pH ~ 7,3
Mg ₂ Cl	2 mM	
Glucosio	20 mM	
HEPES	10 mM	

Per lo studio delle correnti ioniche del sodio è stata utilizzata la seguente soluzione intracellulare ed extracellulare:

SOLUZIONE INTRACELLULARE:

EGTA	5 mM	
CsCl	130 mM	
CaCl ₂	0,24 mM	pH ~ 7,3
HEPES	10 mM	
Glucosio	10 mM	
Mg ₂ Cl	1 mM	
TEA-Cl	20 mM	

SOLUZIONE EXTRACELLULARE:

NaCl	120 mM	
KCl	3 mM	
CaCl ₂	2 mM	pH ~ 7,3
Mg ₂ Cl	2 mM	
Glucosio	20 mM	
HEPES	10 mM	
4-amminopiridina (2mM) e cadmio (0.2 mM)		

Per lo studio delle correnti ioniche del calcio è stata utilizzata la seguente soluzione intracellulare (Bouron et al., 2006):

SOLUZIONE INTRACELLULARE:

EGTA	10 mM	
CsCl	120 mM	
HEPES	10 mM	pH ~ 7,3
Mg ₂ Cl	2 mM	
ATP-Na ₂	3 mM	

E come soluzione extracellulare:

CaCl ₂	2 mM	
D-glucosio	10 mM	
HEPES	10 mM	pH ~ 7,3
Mg ₂ Cl	1 mM	
Tea-Cl	145 mM	
TTX (0.2-0.4 µM)		

4.3.6 Apparato sperimentale

La strumentazione impiegata per le registrazioni elettrofisiologiche (Fig. 23) è alloggiata su di un tavolo antivibrante e collegata elettricamente a terra, per evitare così qualsiasi interferenza elettrica e meccanica proveniente dall'ambiente circostante.



Fig. 23 La strumentazione impiegata per le registrazioni elettrofisiologiche (setup strumentale presso il laboratorio di elettrofisiologia presso l'Università di Tor Vergata) è alloggiata su di un tavolo antivibrante e collegata elettricamente a terra, per evitare così qualsiasi interferenza elettrica e meccanica proveniente dall'ambiente circostante

Per caratterizzare i vari tipi di canali del sodio e del calcio, è necessario separare le correnti per poterle studiare singolarmente. Il metodo più preciso di separazione delle correnti è quello farmacologico, basato sulla diversa sensibilità dei canali all'azione dei farmaci agonisti e antagonisti. Queste sostanze vengono somministrate alle cellule mediante un sistema di perfusione delle soluzioni controllato elettronicamente. Questo sistema è costituito da quattro piccolissimi elettrodi posti in parallelo tra di loro e connessi a tubicini di silicone a loro volta collegati a delle elettrovalvole. Affinché gli elettrodi della perfusione siano posti in posizione ottimale in

prossimità del tappeto cellulare, si utilizza un micromanipolatore che permette movimenti microscopici. Le elettrovalvole vengono controllate manualmente dallo sperimentatore il quale, aprendole o chiudendole, permette ai farmaci in soluzione di scorrere lungo i tubicini di silicone e fuoriuscire dagli elettrodi per perfondere le cellule. Un aspiratore che si immette in un recipiente di raccolta, assicura il ricambio della soluzione fisiologica, e/o delle sostanze che perfondono la cellula. L'uscita dell'amplificatore è collegata ad uno oscilloscopio che permette una visione costante dei fenomeni elettrici. Mediante un convertitore analogico-digitale e digitale-analogico, il circuito del patch-clamp viene controllato da un personal computer che utilizza specifici programmi (pClamp, Axon Instrument Inc.) con i quali vengono impostati i potenziali di comando secondo i protocolli sperimentali desiderati.

4.4 Analisi dei dati

Le registrazioni elettrofisiologiche sono state analizzate utilizzando il software Clampfit 9 (Axon Instruments). Per l'analisi delle proprietà passive delle cellule, la traccia prodotta dalla stimolazione con -100 pA di corrente è stata fittata con la funzione esponenziale decrescente

$$V(t) = V_{\max} * e^{-t/\tau}$$

dove $V(t)$ è il potenziale calcolato ad un particolare momento (t), V_{\max} è l'ampiezza massima raggiunta durante l'iniezione di -100 pA e τ è la costante di tempo della membrana (numericamente pari al tempo necessario affinché V_m aumenti di un valore pari al 63% di $V_{m\text{iniziale}} - V_{m\text{max}}$). Da questa

equazione si può ricavare il valore di τ che esprime la maggior o minor velocità con cui V_m raggiunge il valore finale.

Sapendo che: $\tau = C_m * R_m$

dove R_m è la resistenza di membrana, è possibile calcolare la capacità di membrana C_m . Negli esperimenti in voltage clamp la capacità di membrana è stata ottenuta utilizzando la funzione Membrane test di Clampex 9. E' stata quindi calcolata la densità di corrente, data dal rapporto tra l'ampiezza della corrente registrata e la capacità della cellula, e indice della densità dei canali espressi in membrana dai neuroni analizzati.

L'analisi statistica è stata eseguita con Origin 7.5 (OriginLab corporation, USA), applicando il *t*-Test a due popolazioni con un livello di significatività pari a 0,05 e il test ANOVA, seguito dalla correzione di Bonferroni, con il programma statistico SPSS.

5 Risultati

5.1 Effetto dei BCAA sulle proprietà passive e attive di neuroni corticali

In questo studio sono state effettuate registrazioni elettrofisiologiche in cellule nervose corticali all' 8° giorno in coltura (DIV), utilizzando la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell per valutare l'eccitabilità neuronale in cellule trattate con i BCAA rispetto ai neuroni di Controllo.

Gli esperimenti sono stati condotti su neuroni morfologicamente omogenei (piramidali) che rispondevano alla corrente depolarizzante con un'attività di scarica ripetitiva (Pieri et al., 2009).

Sono stati eseguiti gli esperimenti aggiungendo i BCAA nel terreno di coltura cellulare ad una concentrazione di 200 μM di Leucina (Leu), 200 μM Isoleucina (Ile) e 200 μM Valina (Val) (Hutson et al., 1998), a partire dal primo giorno in coltura (1 DIV) fino al settimo (7 DIV), al fine di valutare se tempi differentemente lunghi di esposizione potessero modificare i parametri considerati. Dall'analisi dei dati sperimentali si è potuto constatare che il potenziale di riposo risulta non modificato nei neuroni trattati per 6 giorni con i BCAA, così come sembrano non modificarsi le proprietà passive di membrana (Resistenza, Capacità e Costante di tempo τ , Tabella 1).

	Potenziale di riposo (mV)	Resistenza (M Ω)	Capacità (pF)	τ (ms)
Controlli (n=33)	-59.7 \pm 4.7	569.2 \pm 198.7	67.4 \pm 12.9	38.1 \pm 14.8
BCAA 2 gg (n=11)	-59.7 \pm 4.2	593.8 \pm 258.7	69 \pm 26.3	39.5 \pm 21.3
BCAA 4 gg (n=13)	-58.4 \pm 3	592.9 \pm 156.9	61.2 \pm 14.7	37 \pm 10 .3
BCAA 6 gg (n=14)	-59.3 \pm 4.2	564.6 \pm 189.1	61.9 \pm 17.2	35 \pm 9.6

Tabella 1. Proprietà passive di cellule corticali di Controllo, o esposte per 2, 4 e 6 giorni a 200 μ M di BCAA. La costante di tempo, la capacità cellulare, la resistenza di ingresso e il potenziale di riposo della cellula non sono statisticamente significativi (ANOVA test, $P > 0.05$).

Le cellule corticali sono state quindi stimulate con una corrente di +60 pA e sono state analizzate le proprietà del primo potenziale d'azione e la frequenza di firing, stimata come l'inverso dell'intervallo di tempo tra i primi due picchi. In neuroni esposti per 6 giorni ai BCAA alcune proprietà di firing sono risultate modificate significativamente. Infatti, in cellule trattate con i BCAA per 6 giorni, il tempo di soglia (26.31 ± 17.91 ms) e il potenziale di soglia (-26.31 ± 4.15 mV; $n=14$) del primo potenziale d'azione differivano significativamente rispetto ai Controlli (43.67 ± 22.43 ms, -29.24 ± 4.38 mV, $n=39$; Student t -test, $P < 0.05$).

L'analisi della frequenza di firing (Fig. 24 A e B), ha mostrato che nelle cellule trattate per 4, 6, e 7 giorni con i BCAA, tale parametro aumentava significativamente (ANOVA test; $P < 0.05$). Questi risultati indicano che a parità di stimolazione, le cellule corticali trattate con i BCAA presentavano un numero maggiore di potenziali d'azione nell'unità di tempo e quindi risultavano maggiormente eccitabili rispetto ai controlli. Inoltre già a partire da iniezioni di corrente di +20 pA i neuroni esposti per 6 giorni a BCAA mostravano potenziali d'azione che non erano presenti in nessuna delle cellule di Controllo registrate (Fig. 24 C). In tutti i neuroni la frequenza

aumentava in relazione alla corrente iniettata (da +40 pA fino a +200 pA). Per ciascuna iniezione di corrente la frequenza di firing risultava significativamente aumentata dopo 6 giorni di esposizione a BCAA (n=26), rispetto ai Controlli (n=54; Fig. 24 D). I valori variavano da 9.73 ± 7.53 a 40.07 ± 14.99 Hz nei Controlli e da 17.37 ± 11.51 a 61.36 ± 13.35 Hz nelle cellule trattate con BCAA (Fig. 24 D).

Questa ipereccitabilità corticale, riscontrata nei neuroni corticali dopo l'esposizione ai BCAA, è stata precedentemente riportata nel modello transgenico murino di SLA, G93A (Pieri et al., 2009) (Fig. 25).

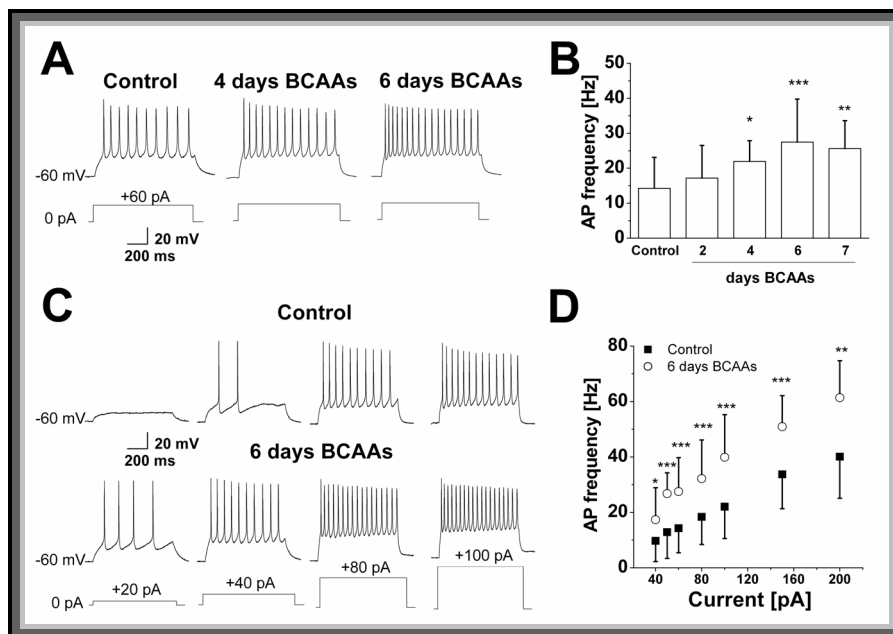


Fig. 24 Effetto dei BCAA sull'eccitabilità nervosa di neuroni corticali.

A – Proprietà di scarica dei potenziali d'azione in condizioni di Controllo, e dopo 4 e 6 giorni di esposizione ai BCAA. Tracce di esempio delle variazioni di potenziale della membrana, evocate dall'iniezione di +60 pA di corrente per 1 secondo.

B – Media e deviazione standard delle frequenze di firing a +60 pA in neuroni di Controllo (n=53) ed esposte per 2 (n=22), 4 (n=21), 6 (n=32) e 7 giorni (n=15) ai BCAA.

C – Tracce esemplificative della variazione del potenziale di membrana in seguito a stimolazioni con correnti di +20 pA, +40 pA, +80 pA e +100 pA (1 sec) in condizioni di Controllo e dopo un'esposizione per 6 giorni ai BCAA.

D – Media e deviazione standard delle frequenze di firing evocate in un intervallo di correnti da +40 a +200 pA in Controllo (n=53) e dopo un'esposizione per 6 giorni ai BCAA (n=32) (Student t-test per dati indipendenti, * P<0.05, ** P<0.02, *** P<0.0001).

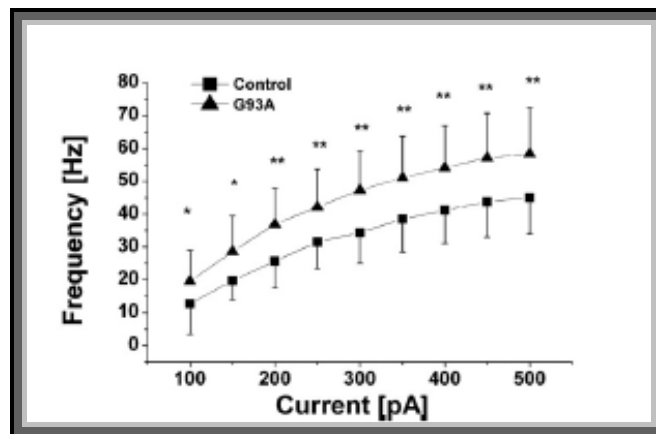


Fig. 25 Relazione tra corrente e frequenza di firing nel modello G93A.

Media e deviazione standard delle frequenze di firing a seguito della stimolazione in corrente in un intervallo da +100 a +500 pA in neuroni corticali di Controllo ($n=24$) e G93A ($n=15$). Ciascuna iniezione di corrente evoca scariche di potenziali d'azione con una frequenza significativamente più alta nei G93A (da Pieri et al., 2009).

5.2 Specificità dell'effetto di BCAA

Per testare la specificità d'azione dei BCAA sull'osservata ipereccitabilità di neuroni corticali, si sono utilizzati due diversi amminoacidi, Fenilalanina e Alanina. Questi due amminoacidi, rispetto ai BCAA (ramificati e alifatici), sono stati scelti in quanto presentavano una ramificazione di tipo aromatico (Fenilalanina) o nessuna ramificazione (Alanina). Il loro effetto è stato quindi confrontato con quello di Valina, Leucina e Isoleucina, trattando le cellule per 6 giorni con una concentrazione di 200 μM ciascuno. Come riportato in Fig. 26 A, C le frequenze di Controllo (14.26 ± 8.85 Hz; $n=55$), in presenza di Alanina (13.39 ± 5.79 Hz; $n=8$), e Fenilalanina (14.93 ± 10.43 Hz; $n=8$) non erano significativamente diverse tra loro (ANOVA test; $P>0.05$), mentre risultavano differenti rispetto alle frequenze riscontrate nei neuroni esposti a 200 μM Valina (28.66 ± 11.19 Hz; $n=20$), Isoleucina (23.18 ± 15.92 Hz; $n=9$) e Leucina (22.47 ± 11.05 Hz; $n=7$), singolarmente (ANOVA test; $P<0.05$; Fig. 26 B, C).

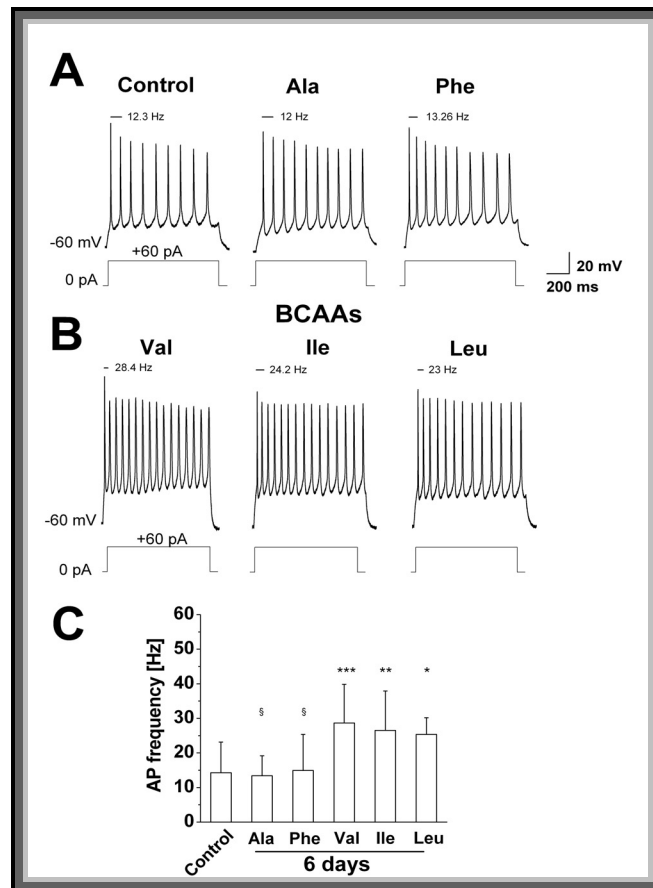


Fig. 26 Specificità dell'effetto di BCAA sulle frequenze di firing di neuroni corticali a 8 DIV.

A- Tracce di esempio di potenziali d'azione indotti da una corrente di +60 pA in neuroni di Controllo, e dopo 6 giorni di esposizione a Alanina e Fenilalanina (200 μ M).

B- Tracce di esempio di potenziali d'azione indotti da una corrente di +60 pA in neuroni di Controllo, e dopo 6 giorni di esposizione a Valina (Val, 200 μ M), Isoleucina (Ile, 200 μ M) e Leucina (Leu, 200 μ M).

C- Istogramma con le medie e deviazioni standard delle frequenze di scarica nelle sei diverse condizioni. Le differenze statistiche sono indicate in figura (ANOVA test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.0001$ rispetto al controllo e, § $P < 0.05$ rispetto alla condizione con Valina).

Da questi esperimenti è emerso che gli amminoacidi non ramificati non producono variazioni di frequenza di firing rispetto al controllo e che la Valina risulta essere l'amminoacido ramificato con maggiori proprietà eccitatorie.

Per tale ragione sono stati condotti degli studi per approfondire l'azione della Valina sull'ipereccitabilità neuronale. Le cellule sono state trattate con Valina a concentrazione crescenti (da 10 a 300 μ M) al fine di effettuare un'analisi

dose-risposta. Come è riportato in Fig. 27 A e B, la Valina determina un incremento di frequenza di firing all'aumentare della concentrazione, a parità di iniezioni di corrente. Il plateau è raggiunto tra 200 e 300 μM . I valori presentati in Fig. 27 B sono 14.26 ± 8.85 Hz (n=55); 10.57 ± 6.39 Hz (n=9); 15.65 ± 5.62 Hz (n=13); 22.09 ± 6.37 Hz (n=10); 28.66 ± 11.20 Hz (n=20); 29.49 ± 18.12 Hz (n=12), rispettivamente per le condizioni di Controllo, 10, 50, 100, 200 e 300 μM di Valina per 6 giorni.

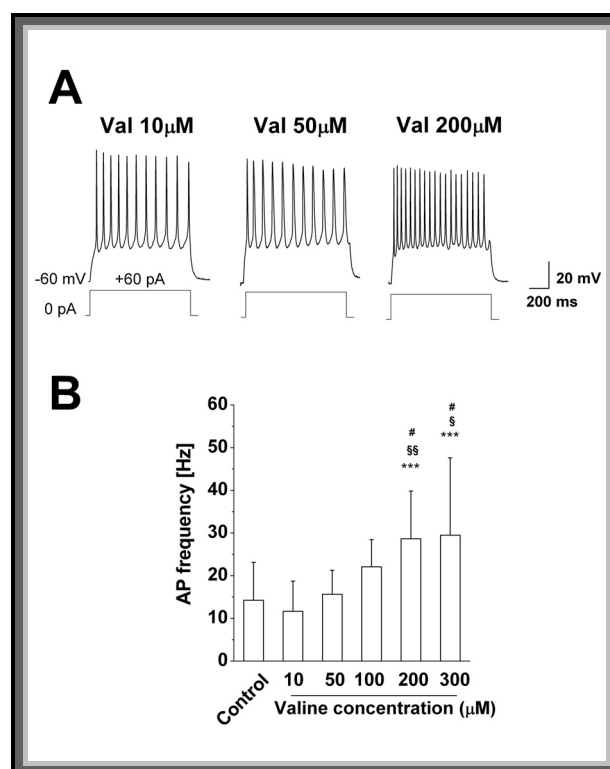


Fig. 27 Relazione dose-risposta tra diverse concentrazioni di Valina e la frequenza di firing.

A- Tracce di esempio di neuroni corticali esposti per 6 giorni a 10, 50 e 200 μM di Valina.

B- Istogramma con le medie e deviazioni standard delle frequenze in relazione a dosi crescenti di Valina. I dati risultano significativi a 200 e 300 μM di Valina (ANOVA test, *** $P < 0.0001$ rispetto al controllo; § e §§ = $P < 0.05$ e $P < 0.02$ rispetto alla condizione 10 μM di Valina; # = $P < 0.05$ rispetto alla condizione 50 μM di Valina).

5.3 Effetto della Rapamicina

Molti lavori pubblicati recentemente indicano che i BCAA sono tra i maggiori attivatori del complesso mTOR. In particolare sembrano rivestire un importante ruolo nel meccanismo di attivazione del complesso e nella regolazione ipotalamica della fame (Cota et al., 2006).

Per verificare se i BCAA esercitano la loro specifica azione attraverso il meccanismo d'azione che coinvolge il pathway di mTOR, si è proceduto al trattamento dei neuroni con diverse dosi e tempi diversi di Rapamicina che inducono l'inibizione del complesso mTOR.

In particolare, secondo lavori pubblicati in letteratura (Foster and Toschi, 2009), la Rapamicina sarebbe in grado di inibire questo complesso proteico già a concentrazioni comprese tra 0.5 e 100 nM.

Le cellule corticali in coltura sono state esposte ai seguenti trattamenti:

- Valina 200 μ M per 6 giorni;
- Valina 200 μ M per 6 giorni + Rapamicina 10 nM per 24 ore;
- Valina 200 μ M per 6 giorni + Rapamicina 50 nM per 24 ore;
- Valina 200 μ M per 6 giorni + Rapamicina 2 nM per 6 giorni;
- Rapamicina 10 nM per 24 ore;
- Rapamicina 50 nM per 24 ore;
- Rapamicina 2 nM per 6 giorni.

I valori medi delle frequenze sono stati confrontati con quelli provenienti da cellule di Controllo, attraverso un'analisi statistica ANOVA, seguita dalla correzione di Bonferroni (Fig. 28).

Il trattamento con la Valina (200 μ M per 6 giorni) come abbiamo già visto in Figura 27, induce un significativo aumento di frequenza di firing (28.66 ± 11.20 Hz, n=20) rispetto ai Controlli (14.26 ± 8.85 Hz, n=55). Questo effetto si riduce attraverso un trattamento con Rapamicina, sebbene a concentrazioni di

10 nM per 24 ore questa riduzione non risulti significativa (22.50 ± 7.72 Hz; $n=9$). L'ipereccitabilità corticale risulta inibita significativamente dopo il trattamento con Rapamicina sia a 50 nM per 24 ore (16.12 ± 8.93 Hz; $n=12$) che a 2 nM per 6 giorni (17.35 ± 8.87 Hz; $n=8$) (Fig. 28). Questi valori sono confrontabili con quelli ottenuti nei neuroni di controllo. Inoltre, per verificare se la Rapamicina da sola producesse modifiche nel firing dei neuroni, cellule di controllo sono state trattate con le stesse dosi di farmaco da solo. Questo trattamento non ha prodotto variazioni nelle proprietà di scarica neuronali (Fig. 28 B).

Per verificare il coinvolgimento del complesso mTOR nella ipereccitabilità indotta dalla Valina, si sono studiati gli effetti del trattamento con Rapamicina, su cellule già trattate con la Valina. È stato utilizzato un protocollo di stimolazione con correnti depolarizzanti (+40/+200 pA) (Fig. 28 C). Questo studio indica che il trattamento con Rapamicina è capace di revertire l'ipereccitabilità corticale provocata dalla Valina, probabilmente attraverso l'inibizione del complesso mTOR, in quanto la frequenza di scarica è confrontabile con quella ottenuta da neuroni di controllo (Fig. 28 C).

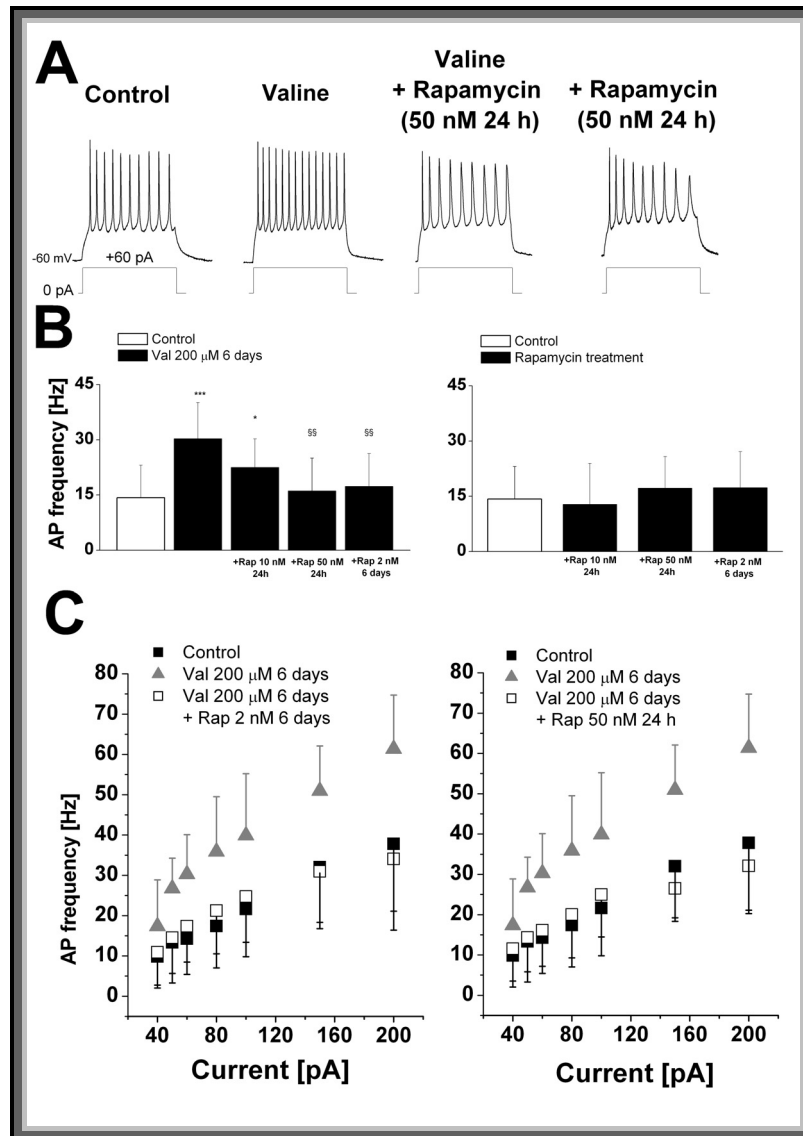


Fig. 28 Effetto della Rapamicina sull'ipereccitabilità indotta dalla Valina.

A- Tracce di esempio di scariche di potenziali d'azione in cellule di controllo o trattate con Valina, Valina + Rapamicina o Rapamicina da sola. Sotto ogni traccia è riportato il protocollo sperimentale. **B - A sinistra**) Istogramma delle medie e deviazioni standard delle frequenze del potenziale d'azione indotte dall'iniezione di +60 pA di corrente per 1 secondo, nelle diverse condizioni sperimentali descritte nel testo. Le significatività mostrate in figura evidenziano che la Rapamicina ripristina le frequenze di firing a valori di controllo, annullando a concentrazioni di 50 nM per 24 ore o di 2 nM per 6 giorni, l'effetto ipereccitante della Valina (ANOVA test * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$ rispetto al controllo e §§ $P < 0.02$ rispetto alla Valina. **A destra**) Effetto della Rapamicina da sola sulle cellule di controllo. **C - A sinistra**) Media e deviazione standard delle frequenze di firing in un intervallo di corrente iniettata da +40 a +200 pA in Controllo ($n=53$), Valina (200 μM, 6 giorni; $n=15$) e Valina (200 μM, 6 giorni + Rapamicina 2 nM, 6 giorni; $n=8$). I valori di frequenza per ciascuna corrente dopo trattamento con Valina sono significativamente differenti rispetto ai Controlli o in presenza di 2 nM di Rapamicina. **A destra**) Media e deviazione standard delle frequenze di firing in un intervallo di corrente iniettata da +40 a +200 pA in Controllo ($n=53$), Valina (200 μM, 6 giorni; $n=15$) e Valina (200 μM, 6 giorni + Rapamicina 2 nM, 6 giorni; $n=8$). I valori di frequenza per ciascuna corrente dopo trattamento con Valina sono significativamente differenti rispetto ai Controlli o in presenza di 50 nM di Rapamicina.

5.4 Confronto con il modello G93A

Diversi lavori hanno riportato ipereccitabilità nel modello murino di SLA, G93A. Studi condotti dai nostri laboratori hanno mostrato questa alterazione dell'eccitabilità sia a livello di motoneuroni spinali sia a livello di neuroni corticali della corteccia motoria (Zona et al., 2006, Pieri et al., 2009), come mostrato in Figura 25. Lo stesso dato è stato confermato da esperimenti condotti nel corso di questa tesi. Le Figure 29 A e B mostrano infatti l'ipereccitabilità di neuroni G93A e l'effetto del trattamento con la Rapamicina per 24 ore su questa alterazione. Le iniezioni di corrente depolarizzante (+40/+200 pA) inducono frequenze di firing che nelle cellule G93A risultano essere significativamente maggiori (da $20,41 \pm 10,94$ Hz a $58,63 \pm 20,70$ Hz) sia rispetto ai Controlli ($9,82 \pm 7,76$ Hz a $37,80 \pm 16,70$ Hz), che rispetto a cellule G93A stesse trattate con Rapamicina ($10,83 \pm 8,57$ Hz a $38,24 \pm 9,02$ Hz; ANOVA Test $P < 0.05$).

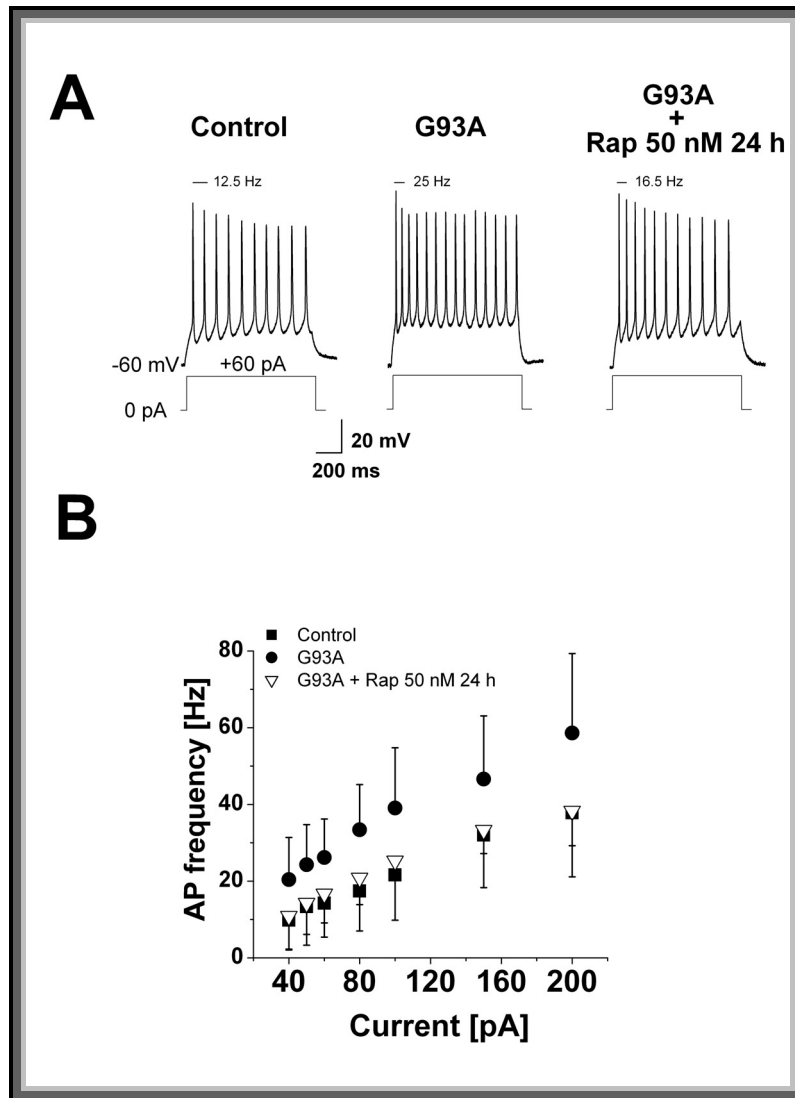


Fig. 29 Effetto della Rapamicina su neuroni corticali G93A

A- Tracce di esempio di cellule di Controllo, G93A e G93A trattate con 50 nM di Rapamicina per 24 ore, ottenute con correnti di +60 pA per 1 secondo. Sopra ciascuna traccia è presente il valore della frequenza della cellula corrispondente.

B- Frequenze di firing indotte da correnti comprese tra +40 e +200 pA nelle condizioni mostrate in A.

5.5 Effetto dell'esposizione di BCAA sulla funzionalità dei canali ionici voltaggio-dipendenti

Poiché è stata osservata una differenza significativa della frequenza di firing nelle cellule trattate con BCAA, si sono analizzate le correnti ioniche voltaggio-dipendenti che potessero essere eventualmente coinvolte. Le variazioni di potenziale della membrana e la genesi del potenziale d'azione sono dovute all'apertura e chiusura di canali del Sodio, Potassio e Calcio e per tale motivo sono state queste correnti ad essere analizzate.

5.5.1 Studio dei canali ionici voltaggio-dipendenti del Sodio: corrente transiente e persistente

Le correnti voltaggio-dipendenti del Sodio sono state distinte mediante due protocolli sperimentali che hanno permesso di isolarle, sia in condizioni di controllo che dopo trattamento con BCAA. Il primo tipo di corrente del sodio analizzata è quella transiente, caratterizzata da una rapida cinetica di attivazione e inattivazione (I_{NaT}) e farmacologicamente bloccata dal TTX. La dipendenza dal voltaggio è stata studiata con step di depolarizzazioni successivi, mantenendo la cellula a un potenziale (V_h) di -60 mV, imponendole un prestimolo a -100 mV e depolarizzandola da -60 a +50 mV con incrementi di 5 mV (Fig. 30 A). A potenziali maggiori di -50 mV si attiva una corrente entrante che presenta il picco massimo a circa -15 mV (Fig. 30 A e B). Questa corrente si inattiva in presenza di 1 μ M di Tetrodotossina (TTX). La corrente di picco è stata normalizzata per il valore della capacità di ciascuna cellula (densità di corrente) e analizzata in relazione al voltaggio (Fig. 30 B).

Il trattamento per 6 giorni con 200 μM di BCAA non ha prodotto significativi cambiamenti né sulle cinetiche di attivazione e inattivazione, né sulla densità di corrente di questi canali transienti rispetto ai Controlli (ANOVA test $P > 0.05$).

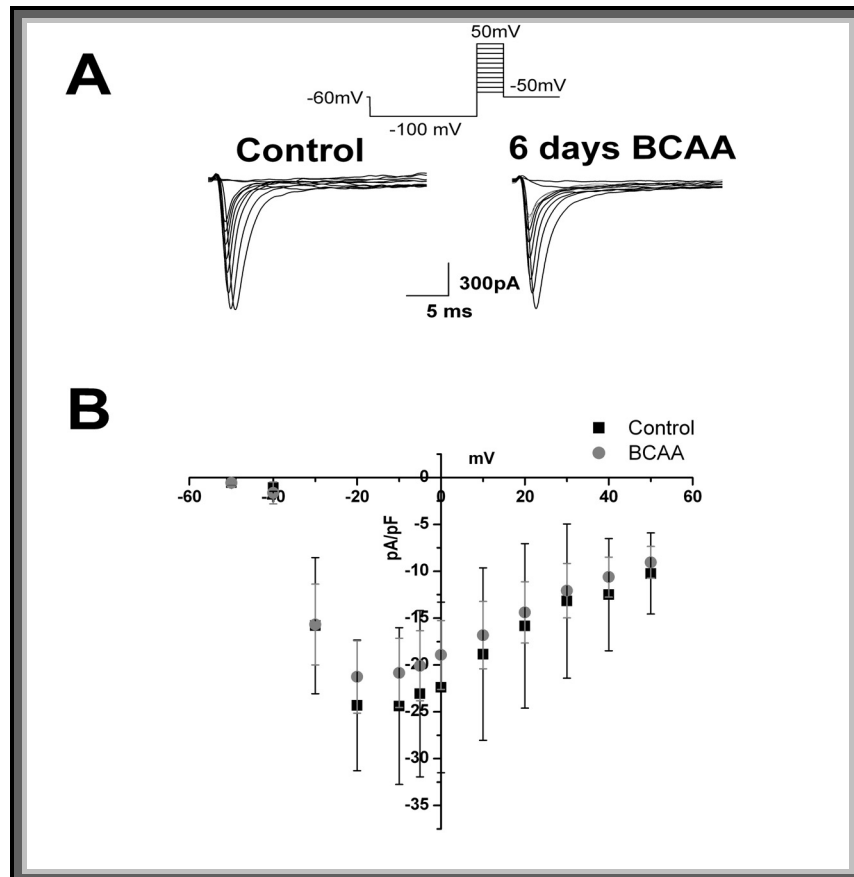


Fig. 30 Relazione corrente-voltaggio della corrente transiente del sodio.

A-Tracce di esempio di correnti transienti del sodio registrate in condizioni di controllo e dopo trattamento per 6 giorni di BCAA. In alto è mostrato il protocollo sperimentale applicato.

B- Medie e deviazioni standard delle densità di corrente transiente del sodio registrate a differenti depolarizzazioni della membrana.

È noto che l'eccitabilità neuronale è spesso modulata da un secondo tipo di corrente del Sodio che ha una diversa conduttanza e diverse proprietà cinetiche, nota come corrente del Sodio persistente (I_{NaP}). Un nostro precedente lavoro condotto sui neuroni corticali G93A ha dimostrato che l'eccitabilità neuronale è strettamente dipendente dalla corrente persistente attivata nella cellula (Pieri et al., 2009) e che quest'ultima è risultata essere

maggiore nel modello di SLA. Per tale motivo, avendo riscontrato che anche i BCAA inducono ipereccitabilità, si sono analizzate le proprietà biofisiche della corrente persistente, in seguito a trattamento per 6 giorni con i BCAA. In condizioni sperimentali in cui le correnti di calcio e potassio erano bloccate, è stato applicato un protocollo sperimentale che prevede una lenta rampa di variazione del potenziale (14 mV/s) da -100 mV a +30 mV, sia in cellule trattate che in quelle di controllo.

Come riportato in Fig. 31, intorno a valori di potenziale di -60 mV si attiva una corrente entrante. Questa corrente del sodio che non si inattiva, è bloccata dal TTX in modo reversibile (TTX, 1 μ M; Fig. 31 A). Le curve corrente-voltaggio (I/V) mostrate in Fig. 31 B, sono state ottenute sottraendo le ampiezze di corrente persistente prima e dopo l'esposizione al TTX nei neuroni di Controllo (n=15) e in quelli esposti a 6 giorni di BCAA (n=18) (Fig. 31 B).

Dalle curve I/V si ricavano le seguenti informazioni:

- il potenziale di attivazione della I_{NaP} risulta simile nei Controlli e neuroni trattati con BCAA (-61.24 ± 4.53 mV, n=18; -59.98 ± 5.82 mV, n=15, rispettivamente; *t*-test, $P > 0.05$);
- il potenziale di picco della I_{NaP} risulta simile nei Controlli e neuroni trattati con BCAA (-37.53 ± 7.65 mV; -39.03 ± 4.61 mV rispettivamente; *t*-test, $P > 0.05$);
- le ampiezze di corrente I_{NaP} misurate al picco sono significativamente più alte dopo l'esposizione ai BCAA (39.94 ± 14.03 pA) rispetto ai Controlli (22.32 ± 12.26 pA, *t*-test, $P < 0.02$);
- la densità di corrente I_{NaP} (Controllo: 0.49 ± 0.24 pA/pF; BCAA: 0.78 ± 0.31 pA/pF; *t*-test, $P < 0.05$) risulta quasi raddoppiata nelle cellule trattate con BCAA.

Questi risultati sono concordi con quanto riscontrato nel modello murino G93A (Pieri et al., 2009) (Fig. 32) e ciò indica che la componente del sodio I_{NaP} è una delle cause di ipereccitabilità corticale, in entrambi i casi.

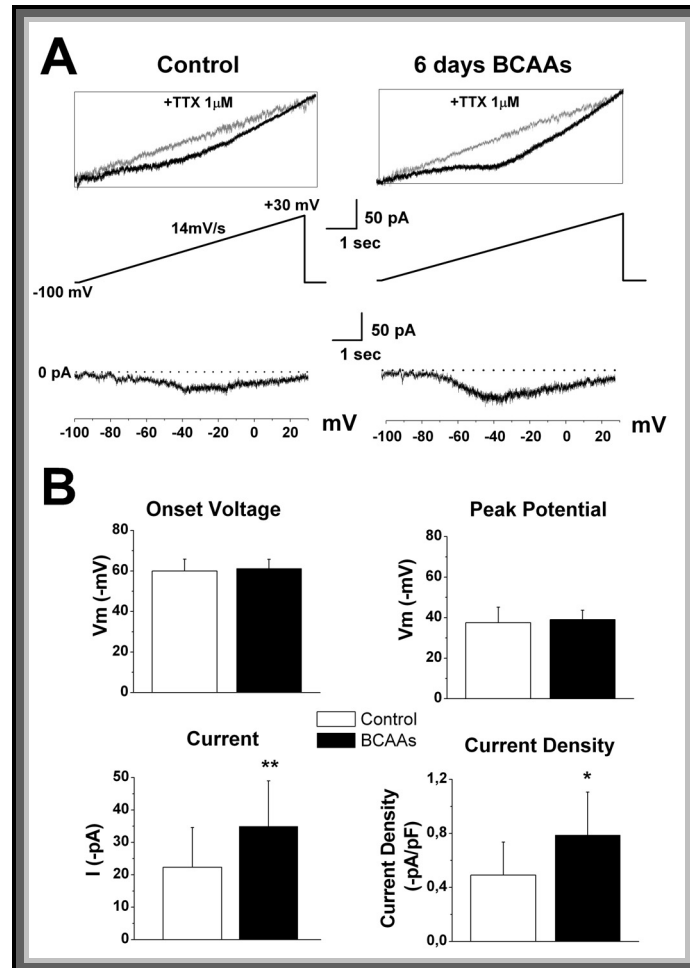


Fig. 31 Corrente di sodio persistente in cellule di Controllo ed esposte per 6 giorni ai BCAA

A- Tracce di esempio di I_{NaP} evocate da un protocollo a rampa della velocità di 14 mV/sec, da -100 a +30 mV in neuroni corticali di 8 DIV. Dagli stessi neuroni sono state estrapolate le correnti vere e proprie dopo sottrazione con la traccia in presenza di TTX (1 μ M).

B- I valori medi con le deviazioni standard di controlli e BCAA sono relativi a: potenziale di attivazione, potenziale di picco, intensità di corrente e densità di corrente. Questi ultimi due dati sono statisticamente significativi (t-Student test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.02$).

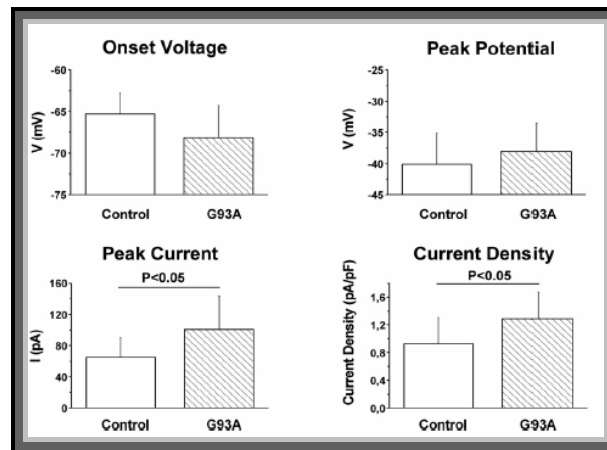


Fig. 32 Medie e deviazioni standard dei parametri analizzati della corrente del sodio I_{NaP} nel modello G93A (Da Pieri et al., 2009)

5.5.2 Caratterizzazione farmacologica dei canali ionici del calcio voltaggio dipendenti

I neuroni corticali dei vertebrati sono caratterizzati dalla presenza di molteplici canali del calcio voltaggio-dipendenti, che possono essere identificati basandosi su criteri biofisici e/o farmacologici. Per quanto riguarda le caratteristiche biofisiche si possono distinguere:

- i canali del calcio LVA (*Low Voltage Activated*), i quali hanno una bassa soglia di attivazione, e sono attivi ad un potenziale di membrana di -60 / -50 mV. Sono responsabili di una piccola corrente di tipo transiente;
- i canali del calcio HVA (*High Voltage Activated*), con una soglia di attivazione più alta rispetto ai canali LVA, pari ad un potenziale di membrana di circa -40 mV.

Attraverso delle registrazioni elettrofisiologiche, utilizzando la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell, si è cercato di caratterizzare quest'ultima categoria di canali del calcio voltaggio-dipendenti, applicando alle singole cellule diversi protocolli di depolarizzazione. Per effettuare le registrazioni, nella soluzione fisiologica esterna sono stati aggiunti 0.4 μ M di Tetrodotossina (TTX) e 2 mM di 4-aminopiridina (4-AP) per bloccare

rispettivamente le correnti voltaggio-dipendenti del sodio e quelle transienti del potassio. In configurazione whole-cell, partendo da un potenziale di membrana di -80 mV, sono stati applicati step di depolarizzazione da -60 a $+30$ mV, della durata di 120 ms ciascuno. Questo protocollo è stato applicato sia a cellule di controllo ($n=44$) che a cellule trattate con 200 μ M di BCAA per 6 giorni ($n=23$). Come mostrato nella Fig. 33, nella popolazione di controllo ad una depolarizzazione di -40 mV si attiva una corrente entrante, che raggiunge il picco a 0 mV. La densità di questa corrente differisce significativamente rispetto a quella ottenuta nelle cellule trattate con i BCAA. I valori medi di densità di corrente misurati al picco aumentavano da $10,75 \pm 4,89$ pA/pF (cellule di controllo) a $17,79 \pm 4,64$ pA/pF (cellule trattate con i BCAA). L'analisi statistica è stata effettuata applicando il t -test di Student e la significatività è stata riscontrata per le intensità di corrente evocate da potenziali tra -10 mV e $+30$ mV.

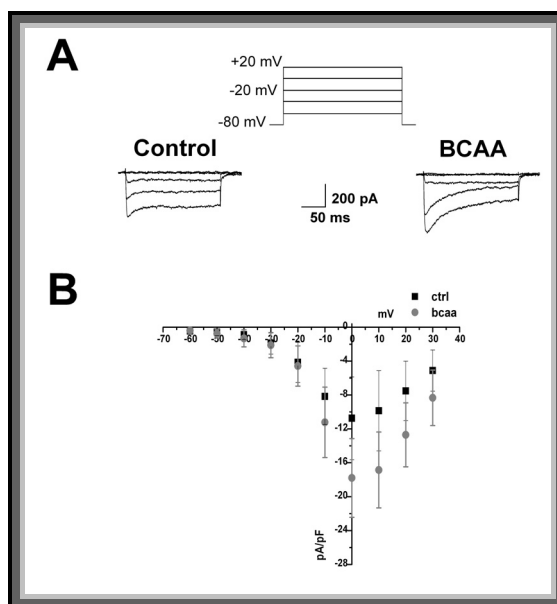


Fig. 33 Caratterizzazione della corrente del Ca^{2+} in relazione al potenziale di membrana in neuroni corticali di controllo e trattati con i BCAA. **A-** Tracce di correnti entranti di Ca^{2+} evocate dall'applicazione di un protocollo e l'applicazione di step depolarizzanti **B-** Curva I/V che illustra le medie e le deviazioni standard della densità di corrente del calcio totale evocata dall'applicazione di step di depolarizzazione successivi, a partire da un potenziale di -80 mV fino ad un potenziale di $+20$ mV.

Si è poi proceduto alla caratterizzazione farmacologica dei canali del calcio HVA facendo uso di specifiche sostanze che bloccano selettivamente le diverse componenti. A tal fine è stato applicato un protocollo a singolo step depolarizzante (da -80 mV a 0 mV) nelle condizioni di controllo e lo stesso protocollo è stato ripetuto in seguito alla perfusione per 30 secondi di ciascun bloccante, sulla stessa cellula. La prima componente caratterizzata è stata quella indotta dall'apertura dei canali di tipo P/Q, bloccata dall' ω -agatossina, una sostanza estratta dal veleno del ragno *Agelenopsis aperta*. Applicando alle cellule una soluzione esterna fisiologica contenente 500 nM di ω -agatossina IVA, i canali HVA di tipo P/Q sono selettivamente bloccati. Successivamente, oltre ai P/Q, si sono selettivamente bloccati i canali di tipo N attraverso una soluzione contenente 1 μ M di ω -conotossina GVIA (+500 nM di ω -agatossina IVA), estratta dal veleno del serpente marino *Conus geographus*. Infine somministrando anche 50 μ M di nifedipina (+ 1 μ M di ω -conotossina GVIA, 500 nM di ω -agatossina IVA) (Fig. 34 A) si è isolata la corrente di tipo L. La somministrazione ulteriore di Cadmio (0.2 mM) ha quindi bloccato anche la componente resistente alle tre tossine (componente R). Ciascun tipo di corrente è stato ottenuto sottraendo le differenti tracce ottenute dalle varie registrazioni a seguito delle successive perfusioni contenenti i diversi bloccanti (Fig 34 A). Si sono riscontrate alcune differenze nella densità delle correnti. Infatti, cellule di controllo (n=44) e quelle trattate con i BCAA (n=23) differivano in maniera significativa sia nella corrente totale (P<0.05) che nella componente N (P<0.02). Nonostante non sia stata osservata una differenza significativa, la densità di corrente della componente P/Q risultava aumentata nelle cellule trattate con BCAA (Fig. 34 A e B). Stessi risultati, ancora preliminari, ma completamente sovrapponibili, sono stati ottenuti dal modello G93A (Fig. 34 B)

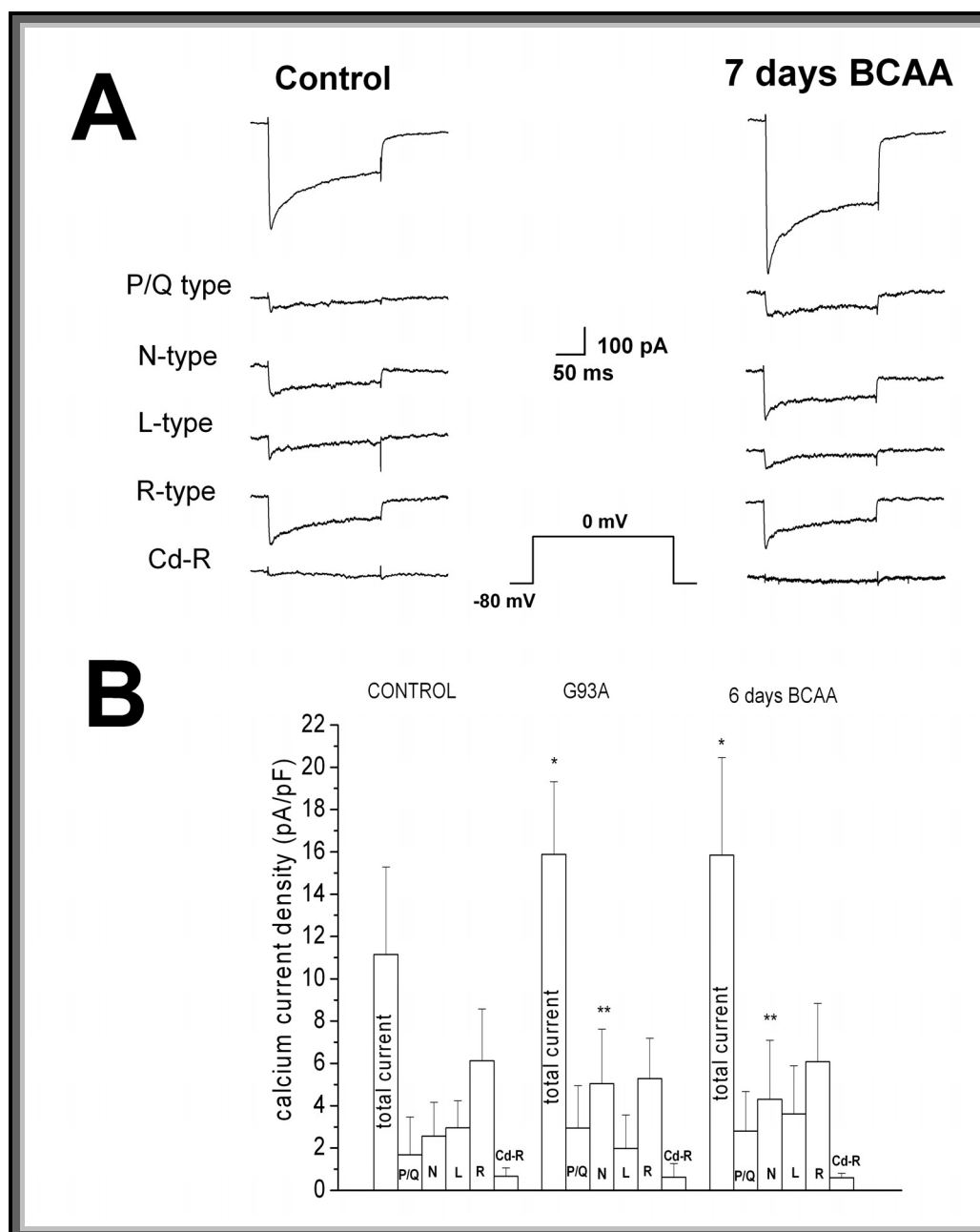


Fig. 34 A- Tracce medie delle sottrazioni di corrente dopo successive applicazioni delle tossine. La sottrazione della traccia di corrente ottenuta in presenza di ω -agatossina IVA da quella totale indica la corrente di tipo P/Q, la sottrazione della traccia di corrente ottenuta in presenza di ω -conotossina GVIA + ω -agatossina IVA da quella ottenuta con ω -agatossina IVA indica la corrente di tipo N. La sottrazione della traccia di corrente ottenuta in presenza di ω -conotossina GVIA + ω -agatossina IVA + nifedipine da quella ottenuta in presenza di ω -conotossina GVIA + ω -agatossina IVA, indica la componente L. La somministrazione di cadmio e la sottrazione tra questa traccia con quella ottenuta dando i tre bloccanti indica la componente R. **B-** Densità di corrente evocata dalla depolarizzazione mostrata in A, nelle condizioni sperimentali di controllo, G93A e BCAA. L'analisi statistica è stata effettuata applicando un t-test di Student (* $P < 0.05$ rispetto densità di corrente di calcio totale ottenuta nei controlli; ** $P > 0.02$ rispetto alla densità di corrente di calcio di tipo N ottenuta nei controlli).

6 Discussione

Studi epidemiologici hanno evidenziato una maggiore incidenza di casi di SLA nei calciatori professionisti italiani rispetto alla popolazione generale (Belli and Vanacore, 2005, Chio et al., 2005, Vanacore et al., 2006, Armon, 2007, Belli and Vanacore, 2008). Inoltre, in questa popolazione, l'età di insorgenza della patologia (< 50 anni) è significativamente inferiore rispetto a quella della popolazione italiana (> 60 anni). Una delle ipotesi avanzate per spiegare tale evidenza è stata l'assunzione di dosi eccessive di alcuni integratori alimentari da parte dei calciatori, come ad esempio gli amminoacidi ramificati (Belli and Vanacore, 2005) e a seguito di questa ipotesi si è aperta un'inchiesta giudiziaria per indagarne le cause (Belli and Vanacore, 2005, Chio et al., 2005, Vanacore et al., 2006, Armon, 2007, Belli and Vanacore, 2008).

Gli amminoacidi ramificati sono ampiamente presenti nelle proteine dei comuni alimenti che pertanto, se consumati nelle giuste quantità, sono in grado di coprire completamente il fabbisogno nutrizionale giornaliero degli atleti. Nella maggioranza dei casi, l'uso degli integratori contenenti amminoacidi da parte degli atleti è motivato dalla convinzione di poter ottenere un aumento della massa muscolare ed una riduzione della sensazione di fatica (Blomstrand and Saltin, 2001).

I BCAA svolgono un ruolo essenziale nel sistema nervoso centrale, nella regolazione del metabolismo dell'azoto e nella sintesi della glutammina (Yudkoff, 1997). Essi oltrepassano velocemente la barriera ematoencefalica attraverso specifici trasportatori di amminoacidi (Smith, 2000, Takanaga et al., 2005, Broer, 2006) e a livello astrocitario sono utilizzati per ripristinare il pool di glutammato (Bixel et al., 1997). Un'eccessiva somministrazione di BCAA porterebbe quindi la cellula nervosa ad accumulare sostanze tossiche come i

corpi chetonici, o a rilasciare elevate quantità di glutammato (Dufour et al., 2001, Hutson et al., 2005, Yudkoff et al., 2005). In particolare, la Valina sembrerebbe avere un'azione molto tossica per le cellule attraverso il rilascio del suo specifico catabolita methacrylyl-CoA che presenta una forte azione mutagenica (Shimomura et al., 2004). In uno studio di Doufur (Dufour et al., 2001), effettuato su un modello di epilessia non convulsiva (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg, GAERS), è stata dimostrata un'induzione di eccitabilità neuronale da parte della Leucina e del suo metabolita α -KIC (α -ketoisocaproato) attraverso variazioni di glutammato nel tratto talamo-corticale.

Recentemente è stato riportato che la quantità di glutammato extracellulare è regolata dalla concentrazione di BCAA (ciclo BCAA-glutammato) e che un eccesso di questo neurotrasmettitore eccitatorio, in seguito ad un'alterazione metabolica dei BCAA, ha molteplici effetti tossici per la cellula (Contruscieri et al., 2009). Inoltre, poiché fisiologicamente i BCAA regolano specifiche vie di segnalazione intracellulare, concentrazioni eccessive di questi amminoacidi provocherebbero uno squilibrio di tali meccanismi di trasduzione. Una volta entrati nella cellula i BCAA attivano, infatti, una serie di segnali di trasduzione che hanno come bersaglio il complesso mTOR (Proud, 2004, Tokunaga et al., 2004, Gulati and Thomas, 2007, Krebs et al., 2007). In particolare, studi recenti condotti su cellule corticali hanno dimostrato che, in seguito all'entrata nel neurone di Leucina attraverso il sistema di trasporto degli amminoacidi di tipo L (Ishizuka et al., 2008), si attiva la proteina S6 chinasi (p70S6K) tramite un'auto-fosforilazione. Quest'ultima è uno dei substrati di mTOR (Hara et al., 1998, Xu et al., 1998, Kimball et al., 1999, Xu et al., 2001) e regola la traduzione proteica, il volume e la sopravvivenza cellulare. L'attivazione della chinasi è sensibile all'azione della Rapamicina, farmaco inibitore del complesso mTOR.

Inoltre la Rapamicina sembra essere un forte induttore di autofagia, un processo di autodegradazione che in condizioni fisiologiche è costitutivamente attivo. Esso causa il turnover fisiologico delle componenti cellulari, regola il bilancio di nutrienti negli eucarioti (Schmelzle and Hall, 2000, Yorimitsu and Klionsky, 2005) e nella neurodegenerazione è considerato uno dei processi di protezione attivato per compensare eventuali danni (Sarkar et al., 2007). Recentemente infatti è stata osservata un'alterazione nell'attivazione del pathway di mTOR in molte patologie corticali, neurodegenerative e nell'epilettogenesi (Inoki et al., 2005, Tsang et al., 2007, Zeng et al., 2008). Tuttavia pochi lavori hanno verificato l'effetto della Rapamicina in un modello di SLA.

Diversi lavori hanno riportato che nel corso di questa patologia si generano modifiche di eccitabilità sia a livello corticale, che nei motoneuroni spinali (Eisen et al., 1993, Kew et al., 1993, Mills and Nithi, 1997, Brooks et al., 2000, Vucic and Kiernan, 2006, Vucic and Kiernan, 2008, Vucic et al., 2008). Le alterazioni sono state riscontrate sia in pazienti presintomatici affetti dalla forma di SLA familiare (Turner et al., 2005, Vucic et al., 2008), sia in colture cellulari provenienti da topi G93A (Pieri et al., 2003, Zona et al., 2006, Pieri et al., 2009).

L'ipereccitabilità corticale riscontrata nel modello di SLA, G93A, è strettamente correlata ad alterazioni di canali ionici voltaggio-dipendenti. In particolare i canali del Sodio di tipo persistente risultano alterati (Pieri et al., 2009) e studi condotti dal nostro laboratorio ma non ancora pubblicati dimostrano un aumento dell'ingresso di calcio mediante i canali voltaggio-dipendenti di tipo N (Pieri et al. 2009; 60° Congresso Italiano di Fisiologia). Il risultante sovraccarico di calcio, dovuto ad un'entrata incontrollata attraverso i canali voltaggio dipendenti e i recettori del glutammato AMPA (Guatteo et al., 2007), in associazione ad un'inefficiente capacità di tamponamento dello

ione da parte di neuroni G93A (Guatteo et al., 2007), causerebbe la neurodegenerazione (von Lewinski and Keller, 2005, Jaiswal et al., 2009).

Considerando le ipotesi per cui l'integrazione alimentare di BCAA è uno dei fattori rischio nello sviluppo della SLA, in questa tesi si è analizzato l'effetto elettrofisiologico dei BCAA sull'eccitabilità corticale e sui canali ionici. Parallelamente i risultati ottenuti sono stati confrontati con i dati già pubblicati riguardanti le alterazioni biofisiche di neuroni corticali G93A (Pieri et al., 2009). Inoltre, i dati presentati offrono anche spunti importanti per definire meglio il meccanismo coinvolto e l'importanza del complesso mTOR nella patologia della SLA.

Nel corso di questa tesi è stato dimostrato che i BCAA inducono, in maniera specifica, ipereccitabilità in neuroni corticali in coltura primaria, ottenuti dalla corteccia motoria embrionale. In particolar modo è stato osservato che la frequenza dei potenziali d'azione aumenta in modo significativo in seguito all'esposizione in cronico con i BCAA. L'ipereccitabilità indotta dai BCAA in cellule di controllo è paragonabile a quella già riscontrata nei neuroni G93A, evidenziando un'importante correlazione tra le due condizioni sperimentali. Inoltre, in maniera rilevante è stato dimostrato che la Rapamicina, bloccando il complesso mTOR, favorisce il ripristino di una frequenza di scarica confrontabile con i valori di controllo, sia in cellule trattate con i BCAA che nei neuroni G93A. Ciò potrebbe indicare che il complesso mTOR è coinvolto nella patogenesi della SLA.

Gli eventi che causano l'ipereccitabilità nella SLA non sono noti ma si può ipotizzare che dipendano da una alterazione nella cinetica o nella densità di canali ionici voltaggio dipendenti (Zona et al., 2006, Pieri et al., 2009). Per tale ragione nel corso di questa tesi è stato studiato se anche l'ipereccitabilità indotta dai BCAA fosse correlata a modifiche biofisiche di questi canali.

I dati ottenuti indicano che alte dosi di BCAA, somministrati per lunghi periodi (6-7 giorni), inducono, con un meccanismo d'azione simile a quello osservato nei G93A, un'alterazione nella densità di corrente del Sodio voltaggio dipendente di tipo persistente. Inoltre si è osservato un significativo aumento della densità di corrente del calcio rispetto al controllo e, in particolare, nelle componenti N e P/Q, che tra le altre sono quelle maggiormente coinvolte nella trasmissione sinaptica (Qian and Noebels, 2001). La localizzazione pre e post- sinaptica di questi due tipi di canali ionici e la loro funzionalità sono, infatti, strettamente correlati con il rilascio di vescicole di neurotrasmettitore in neuroni corticali (Reid et al., 2003). L'aumentato ingresso di calcio nella cellula nervosa a livello sinaptico sarebbe in grado quindi di provocare un maggior rilascio di glutammato e contribuire all'eccitossicità, ipotesi ampiamente investigata come causa di neurodegenerazione nella SLA (Rothstein, 1995).

Le alterazioni funzionali dei canali voltaggio-dipendenti del Sodio di tipo persistente o dei canali voltaggio-dipendenti del Calcio possono giustificare quindi l'ipereccitabilità osservata nei neuroni corticali di topi di controllo trattati con i BCAA.

Sulla base di quanto descritto nei risultati, tutte le modifiche biofisiche riscontrate nei neuroni corticali dopo il trattamento con i BCAA sono strettamente paragonabili a quelle riscontrate nei neuroni G93A e probabilmente coinvolgono la stessa via di trasduzione regolata dal complesso mTOR.

I dati presentati nel corso di questa tesi sembrano evidenziare un parallelismo tra gli effetti dei BCAA a lungo termine e le alterazioni riscontrate nel modello murino di SLA, G93A, in neuroni corticali primari. Per la prima volta si è dimostrato che un trattamento con i BCAA indurrebbe in cellule di controllo un fenotipo simile a quello ritrovato nel modello di SLA. L'aumento del

numero di potenziali d'azione, della corrente voltaggio dipendente di Sodio persistente e di Calcio sono state osservate in entrambi i casi.

Questo dato sembra essere in accordo con diversi studi epidemiologici che riportano una maggiore incidenza di questa patologia nei calciatori. Infatti in questa disciplina sportiva l'utilizzo di integratori alimentari a base di BCAA è molto più diffusa rispetto ad altre discipline, e prevede la somministrazione di dosi maggiori rispetto a quelle suggerite in altre attività agonistiche.

Ulteriori esperimenti saranno condotti per caratterizzare la via del segnale di trasduzione mediata dal complesso mTOR nelle cellule trattate con gli amminoacidi ramificati e in quelle ottenute da embrioni del modello sperimentale di SLA. Questo studio fornirà una conoscenza più approfondita delle cause molecolari alla base delle alterazioni elettrofisiologiche riscontrate nelle due condizioni sperimentali e permetterà di comprendere se i meccanismi alla base di queste modifiche siano le stesse.

7 Bibliografia

1993. Branched-chain amino acids and amyotrophic lateral sclerosis: a treatment failure? The Italian ALS Study Group. In: *Neurology*), vol. 43. no. 12, pp. 2466-2470.
- Abel, E. L., 2007. Football increases the risk for Lou Gehrig's disease, amyotrophic lateral sclerosis. *Percept Mot Skills*. 104, 1251-1254.
- Abumrad, N. N., Robinson, R. P., Gooch, B. R. and Lacy, W. W., 1982. The effect of leucine infusion on substrate flux across the human forearm. *J Surg Res*. 32, 453-463.
- Agrawal, N., Hamam, B. N., Magistretti, J., Alonso, A. and Ragsdale, D. S., 2001. Persistent sodium channel activity mediates subthreshold membrane potential oscillations and low-threshold spikes in rat entorhinal cortex layer V neurons. *Neuroscience*. 102, 53-64.
- Albo, F., Pieri, M. and Zona, C., 2004. Modulation of AMPA receptors in spinal motor neurons by the neuroprotective agent riluzole. *J Neurosci Res*. 78, 200-207.
- Alzheimer, C., Schwindt, P. C. and Crill, W. E., 1993. Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *J Neurosci*. 13, 660-673.
- Anderson, C. M. and Swanson, R. A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 32, 1-14.
- Armon, C., 2007. Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *J Neurol Sci*. 262, 45-53.
- ASSOCIATION, A. D., 2009. Nutrition and Athletic Performance. *Med Sci Sports Exerc*.
- Bachmann, C., Braissant, O., Villard, A. M., Boulat, O. and Henry, H., 2004. Ammonia toxicity to the brain and creatine. *Mol Genet Metab*. 81 Suppl 1, S52-57.
- Baldelli, P., Novara, M., Carabelli, V., Hernandez-Guijo, J. M. and Carbone, E., 2002. BDNF up-regulates evoked GABAergic transmission in developing hippocampus by potentiating presynaptic N- and P/Q-type Ca²⁺ channels signalling. *Eur J Neurosci*. 16, 2297-2310.
- Bar-Peled, O., O'Brien, R. J., Morrison, J. H. and Rothstein, J. D., 1999. Cultured motor neurons possess calcium-permeable AMPA/kainate receptors. *Neuroreport*. 10, 855-859.
- Beal, M. F., 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol*. 58, 495-505.

- Bean, B. P., 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci.* 8, 451-465.
- Beghi, E. and Mennini, T., 2004. Basic and clinical research on amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders in Italy: recent findings and achievements from a network of laboratories. *Neurol Sci.* 25 Suppl 2, S41-60.
- Belli, S. and Vanacore, N., 2005. Proportionate mortality of Italian soccer players: is amyotrophic lateral sclerosis an occupational disease? *Eur J Epidemiol.* 20, 237-242.
- Belli, S. and Vanacore, N., 2008. Sports and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 269, 191; author reply 191-192.
- Bendotti, C., Calvaresi, N., Chiveri, L., Prella, A., Moggio, M., Braga, M., Silani, V. and De Biasi, S., 2001. Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J Neurol Sci.* 191, 25-33.
- Beretta, S., Carri, M. T., Beghi, E., Chio, A. and Ferrarese, C., 2003. The sinister side of Italian soccer. *Lancet Neurol.* 2, 656-657.
- Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F. M., Oroz, L. G., Underwood, B. R., Pangalos, M. N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B. O., O'Kane, C. J. and Rubinsztein, D. C., 2006. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet.* 15, 433-442.
- Bixel, M., Shimomura, Y., Hutson, S. and Hamprecht, B., 2001. Distribution of key enzymes of branched-chain amino acid metabolism in glial and neuronal cells in culture. *J Histochem Cytochem.* 49, 407-418.
- Bixel, M. G. and Hamprecht, B., 1995. Generation of ketone bodies from leucine by cultured astroglial cells. *J Neurochem.* 65, 2450-2461.
- Bixel, M. G., Hutson, S. M. and Hamprecht, B., 1997. Cellular distribution of branched-chain amino acid aminotransferase isoenzymes among rat brain glial cells in culture. *J Histochem Cytochem.* 45, 685-694.
- Bjornsti, M. A. and Houghton, P. J., 2004. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 4, 335-348.
- Blomstrand, E., Eliasson, J., Karlsson, H. K. and Kohnke, R., 2006. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J Nutr.* 136, 269S-273S.
- Blomstrand, E., Hassmen, P. and Newsholme, E. A., 1991. Effect of branched-chain amino acid supplementation on mental performance. *Acta Physiol Scand.* 143, 225-226.
- Blomstrand, E. and Saltin, B., 2001. BCAA intake affects protein metabolism in muscle after but not during exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 281, E365-374.

- Boillee, S., Vande Velde, C. and Cleveland, D. W., 2006. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 52, 39-59.
- Bouron, A., Boisseau, S., De Waard, M. and Peris, L., 2006. Differential down-regulation of voltage-gated calcium channel currents by glutamate and BDNF in embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci*. 24, 699-708.
- Broer, S., 2006. The SLC6 orphans are forming a family of amino acid transporters. *Neurochem Int*. 48, 559-567.
- Brooks, B. R., Bushara, K., Khan, A., Hershberger, J., Wheat, J. O., Belden, D. and Henningsen, H., 2000. Functional magnetic resonance imaging (fMRI) clinical studies in ALS--paradigms, problems and promises. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 1 Suppl 2, S23-32.
- Brown, R. H., Jr., 1997. Amyotrophic lateral sclerosis. Insights from genetics. *Arch Neurol*. 54, 1246-1250.
- Browne, S. E., Yang, L., DiMauro, J. P., Fuller, S. W., Licata, S. C. and Beal, M. F., 2006. Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. *Neurobiol Dis*. 22, 599-610.
- Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L. and Cleveland, D. W., 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*. 18, 327-338.
- Caramia, M. D., Palmieri, M. G., Desiato, M. T., Iani, C., Scalise, A., Telera, S. and Bernardi, G., 2000. Pharmacologic reversal of cortical hyperexcitability in patients with ALS. *Neurology*. 54, 58-64.
- Carbone, E. and Lux, H. D., 1987. Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol*. 386, 547-570.
- Carbone, E. and Swandulla, D., 1989. Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation. *Prog Biophys Mol Biol*. 54, 31-58.
- Carri, M. T., Ferri, A., Battistoni, A., Famhy, L., Gabbianelli, R., Poccia, F. and Rotilio, G., 1997. Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett*. 414, 365-368.
- Carriedo, S. G., Yin, H. Z. and Weiss, J. H., 1996. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci*. 16, 4069-4079.
- Carunchio, I., Pieri, M., Ciotti, M. T., Albo, F. and Zona, C., 2007. Modulation of AMPA receptors in cultured cortical neurons induced by the antiepileptic drug levetiracetam. *Epilepsia*. 48, 654-662.

- Catterall, W. A., 2000a. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 26, 13-25.
- Catterall, W. A., 2000b. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16, 521-555.
- Catterall, W. A. and Few, A. P., 2008. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*. 59, 882-901.
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P. and Striessnig, J., 2005. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*. 57, 411-425.
- Chio, A., Benzi, G., Dossena, M., Mutani, R. and Mora, G., 2005. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*. 128, 472-476.
- Chio, A., Calvo, A., Dossena, M., Ghiglione, P., Mutani, R. and Mora, G., 2009. ALS in Italian professional soccer players: the risk is still present and could be soccer-specific. *Amyotroph Lateral Scler*. 10, 205-209.
- Choi, D. W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1, 623-634.
- Christie, G. R., Hajdуч, E., Hundal, H. S., Proud, C. G. and Taylor, P. M., 2002. Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem*. 277, 9952-9957.
- Clement, A. M., Nguyen, M. D., Roberts, E. A., Garcia, M. L., Boillee, S., Rule, M., McMahon, A. P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R. J., Brown, R. H., Jr., Julien, J. P., Goldstein, L. S. and Cleveland, D. W., 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*. 302, 113-117.
- Cleveland, D. W., 1999. From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron*. 24, 515-520.
- Cleveland, D. W. and Rothstein, J. D., 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2, 806-819.
- Contruscieri, V., Paradisi, S., Matteucci, A. and Malchiodi-Albedi, F., 2009. Branched-Chain Amino Acids Induce Neurotoxicity in Rat Cortical Cultures. *Neurotox Res*.
- Corona, J. C., Tovar-y-Romo, L. B. and Tapia, R., 2007. Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 11, 1415-1428.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C. and Seeley, R. J., 2006. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*. 312, 927-930.

- Cox, P. A., Banack, S. A. and Murch, S. J., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 13380-13383.
- Cozzolino, M., Ferri, A. and Carri, M. T., 2008. Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxid Redox Signal.* 10, 405-443.
- Cudkovicz, M. E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P. E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D. L., Schoenfeld, D. A., Hosler, B. A., Horvitz, H. R. and Brown, R. H., 1997. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 41, 210-221.
- Daikhin, Y. and Yudkoff, M., 2000. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr.* 130, 1026S-1031S.
- Davis, B. A., Krivickas, L. S., Maniar, R., Newandee, D. A. and Feinberg, J. H., 1998. The reliability of monopolar and bipolar fine-wire electromyographic measurement of muscle fatigue. *Med Sci Sports Exerc.* 30, 1328-1335.
- Davis, J. M., Alderson, N. L. and Welsh, R. S., 2000. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *Am J Clin Nutr.* 72, 573S-578S.
- Davis, J. M., Bailey, S. P., Woods, J. A., Galiano, F. J., Hamilton, M. T. and Bartoli, W. P., 1992. Effects of carbohydrate feedings on plasma free tryptophan and branched-chain amino acids during prolonged cycling. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 65, 513-519.
- De Palo, E. F., Gatti, R., Cappellin, E., Schiraldi, C., De Palo, C. B. and Spinella, P., 2001. Plasma lactate, GH and GH-binding protein levels in exercise following BCAA supplementation in athletes. *Amino Acids.* 20, 1-11.
- Dufour, F., Nalecz, K. A., Nalecz, M. J. and Nehlig, A., 2001. Modulation of absence seizures by branched-chain amino acids: correlation with brain amino acid concentrations. *Neurosci Res.* 40, 255-263.
- Dugan, L. L., Bruno, V. M., Amagasu, S. M. and Giffard, R. G., 1995. Glia modulate the response of murine cortical neurons to excitotoxicity: glia exacerbate AMPA neurotoxicity. *J Neurosci.* 15, 4545-4555.
- Eisen, A., Pant, B. and Stewart, H., 1993. Cortical excitability in amyotrophic lateral sclerosis: a clue to pathogenesis. *Can J Neurol Sci.* 20, 11-16.
- Erecinska, M. and Nelson, D., 1990. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes. *J Neurochem.* 54, 1335-1343.
- Evans, R. M. and Zamponi, G. W., 2006. Presynaptic Ca²⁺ channels--integration centers for neuronal signaling pathways. *Trends Neurosci.* 29, 617-624.

- FAO/WHO, 1985. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 724, 1-206.
- FAO/WHO, 1991. Protein quality evaluation. Joint FAO/WHO. FAO Food Nutr Pap. 51, 1-66.
- FAO/WHO, 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition. World Health Organ Tech Rep Ser, 1-265, back cover.
- Foster, D. A. and Toschi, A., 2009. Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle*. 8, 1026-1029.
- Fox, A. P., Nowycky, M. C. and Tsien, R. W., 1987. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol*. 394, 149-172.
- French, C. R., Sah, P., Buckett, K. J. and Gage, P. W., 1990. A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J Gen Physiol*. 95, 1139-1157.
- Funari, E. and Testai, E., 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol*. 38, 97-125.
- Gelfand, R. A., Glickman, M. G., Jacob, R., Sherwin, R. S. and DeFronzo, R. A., 1986. Removal of infused amino acids by splanchnic and leg tissues in humans. In: *Am J Physiol*, vol. 250. no. 4 Pt 1, pp. E407-413.
- Ghosh, A. and Greenberg, M. E., 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*. 268, 239-247.
- Giagheddu, M., Puggioni, G., Masala, C., Biancu, F., Pirari, G., Piras, M. R. and Rachele, M. G., 1983. Epidemiologic study of amyotrophic lateral sclerosis in Sardinia, Italy. *Acta Neurol Scand*. 68, 394-404.
- Green, H. J., Ball-Burnett, M., Symon, S., Grant, S. and Jamieson, G., 1995. Short-term training, muscle glycogen, and cycle endurance. *Can J Appl Physiol*. 20, 315-324.
- Guatteo, E., Carunchio, I., Pieri, M., Albo, F., Canu, N., Mercuri, N. B. and Zona, C., 2007. Altered calcium homeostasis in motor neurons following AMPA receptor but not voltage-dependent calcium channels' activation in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 28, 90-100.
- Gulati, P. and Thomas, G., 2007. Nutrient sensing in the mTOR/S6K1 signalling pathway. *Biochem Soc Trans*. 35, 236-238.
- Guo, H., Lai, L., Butchbach, M. E., Stockinger, M. P., Shan, X., Bishop, G. A. and Lin, C. L., 2003. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet*. 12, 2519-2532.
- Gurney, M. E., 1997. Transgenic animal models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 244 Suppl 2, S15-20.

- Gurney, M. E., 2000. What transgenic mice tell us about neurodegenerative disease. *Bioessays*. 22, 297-304.
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X. and et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 264, 1772-1775.
- Hand, C. K. and Rouleau, G. A., 2002. Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 25, 135-159.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J. and Yonezawa, K., 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 110, 177-189.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C. and Avruch, J., 1998. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem*. 273, 14484-14494.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. and Mizushima, N., 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441, 885-889.
- Harrison, Isselbacher, K. J., Braunwald, E., Wilson, J. D., Martin, J. B., Fauci, A. S. and Kasper, D. L., 1995. *Principi di Medicina Interna*, New York.
- Heath, P. R. and Shaw, P. J., 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 26, 438-458.
- Hille, B., 1986. Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lect*. 82, 47-69.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 117, 500-544.
- Hornberger, T. A. and Chien, S., 2006. Mechanical stimuli and nutrients regulate rapamycin-sensitive signaling through distinct mechanisms in skeletal muscle. *J Cell Biochem*. 97, 1207-1216.
- Horner, R. D., Kamins, K. G., Feussner, J. R., Grambow, S. C., Hoff-Lindquist, J., Harati, Y., Mitsumoto, H., Pascuzzi, R., Spencer, P. S., Tim, R., Howard, D., Smith, T. C., Ryan, M. A., Coffman, C. J. and Kasarskis, E. J., 2003. Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology*. 61, 742-749.
- Hugon, J., Tabaraud, F., Rigaud, M., Vallat, J. M. and Dumas, M., 1989. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in leukocytes of patients with motor neuron disease. *Neurology*. 39, 956-958.

- Hume, R. I., Dingledine, R. and Heinemann, S. F., 1991. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*. 253, 1028-1031.
- Hutson, S. M., 2006. The case for regulating indispensable amino acid metabolism: the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase-knockout mouse. *Biochem J*. 400, e1-3.
- Hutson, S. M., Berkich, D., Drown, P., Xu, B., Aschner, M. and LaNoue, K. F., 1998. Role of branched-chain aminotransferase isoenzymes and gabapentin in neurotransmitter metabolism. *J Neurochem*. 71, 863-874.
- Hutson, S. M., Lieth, E. and LaNoue, K. F., 2001. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutr*. 131, 846S-850S.
- Hutson, S. M., Sweatt, A. J. and Lanoue, K. F., 2005. Branched-chain [corrected] amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. *J Nutr*. 135, 1557S-1564S.
- Inoki, K., Corradetti, M. N. and Guan, K. L., 2005. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet*. 37, 19-24.
- Ishizuka, Y., Kakiya, N., Nawa, H. and Takei, N., 2008. Leucine induces phosphorylation and activation of p70S6K in cortical neurons via the system L amino acid transporter. *J Neurochem*. 106, 934-942.
- Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E. D., De Zeeuw, C. I. and Hoogenraad, C. C., 2008. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci*. 28, 2075-2088.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., Hall, A. and Hall, M. N., 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 6, 1122-1128.
- Jaiswal, M. K., Zech, W. D., Goos, M., Leutbecher, C., Ferri, A., Zippelius, A., Carri, M. T., Nau, R. and Keller, B. U., 2009. Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci*. 10, 64.
- Johnson, F. O. and Atchison, W. D., 2009. The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology*. 30, 761-765.
- Julien, J. P., 1999. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 9, 554-560.
- Kabuta, T., Suzuki, Y. and Wada, K., 2006. Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J Biol Chem*. 281, 30524-30533.
- Kasinski, A., Doering, C. B. and Danner, D. J., 2004. Leucine toxicity in a neuronal cell model with inhibited branched chain amino acid catabolism. *Brain Res Mol Brain Res*. 122, 180-187.

- Kew, J. J., Leigh, P. N., Playford, E. D., Passingham, R. E., Goldstein, L. H., Frackowiak, R. S. and Brooks, D. J., 1993. Cortical function in amyotrophic lateral sclerosis. A positron emission tomography study. *Brain*. 116 (Pt 3), 655-680.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M., 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 110, 163-175.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M., 2003. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*. 11, 895-904.
- Kimball, S. R., Shantz, L. M., Horetsky, R. L. and Jefferson, L. S., 1999. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem*. 274, 11647-11652.
- Kirkinezos, I. G., Hernandez, D., Bradley, W. G. and Moraes, C. T., 2003. Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 53, 804-807.
- Kiss, T., 2008. Persistent Na-channels: origin and function. A review. *Acta Biol Hung*. 59 Suppl, 1-12.
- Klionsky, D. J. and Ohsumi, Y., 1999. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15, 1-32.
- Kobayashi, H., Kato, H., Hirabayashi, Y., Murakami, H. and Suzuki, H., 2006. Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophiying rats. *J Nutr*. 136, 234S-236S.
- Krebs, M., Brunmair, B., Brehm, A., Artwohl, M., Szendroedi, J., Nowotny, P., Roth, E., Fornsinn, C., Promintzer, M., Anderwald, C., Bischof, M. and Roden, M., 2007. The Mammalian target of rapamycin pathway regulates nutrient-sensitive glucose uptake in man. *Diabetes*. 56, 1600-1607.
- Kreider, R. B., Miriel, V. and Bertun, E., 1993. Amino acid supplementation and exercise performance. Analysis of the proposed ergogenic value. *Sports Med*. 16, 190-209.
- Kubica, N., Bolster, D. R., Farrell, P. A., Kimball, S. R. and Jefferson, L. S., 2005. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2Bepsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem*. 280, 7570-7580.
- Kuo, J. J., Schonewille, M., Siddique, T., Schults, A. N., Fu, R., Bar, P. R., Anelli, R., Heckman, C. J. and Kroese, A. B., 2004. Hyperexcitability of

- cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J Neurophysiol.* 91, 571-575.
- Kuo, J. J., Siddique, T., Fu, R. and Heckman, C. J., 2005. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol.* 563, 843-854.
- Lin, C. L., Bristol, L. A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L. and Rothstein, J. D., 1998. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron.* 20, 589-602.
- Liu, D., Wen, J., Liu, J. and Li, L., 1999. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *Faseb J.* 13, 2318-2328.
- Lnenicka, G. A. and Hong, S. J., 1997. Activity-dependent changes in voltage-dependent calcium currents and transmitter release. *Mol Neurobiol.* 14, 37-66.
- Longstreth, W. T., McGuire, V., Koepsell, T. D., Wang, Y. and van Belle, G., 1998. Risk of amyotrophic lateral sclerosis and history of physical activity: a population-based case-control study. *Arch Neurol.* 55, 201-206.
- Lorenzon, N. M. and Foehring, R. C., 1995. Characterization of pharmacologically identified voltage-gated calcium channel currents in acutely isolated rat neocortical neurons. I. Adult neurons. *J Neurophysiol.* 73, 1430-1442.
- Ludolph, A. C., Meyer, T. and Riepe, M. W., 2000. The role of excitotoxicity in ALS--what is the evidence? *J Neurol.* 247 Suppl 1, I7-16.
- MacLean, D. A., Graham, T. E. and Saltin, B., 1994. Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. *Am J Physiol.* 267, E1010-1022.
- Maier, L. S., 2009. A Novel Mechanism for the Treatment of Angina, Arrhythmias, and Diastolic Dysfunction: Inhibition of Late INa Using Ranolazine. *J Cardiovasc Pharmacol.*
- Majoor-Krakauer, D., Willems, P. J. and Hofman, A., 2003. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Genet.* 63, 83-101.
- Malessa, S., Leigh, P. N., Bertel, O., Sluga, E. and Hornykiewicz, O., 1991. Amyotrophic lateral sclerosis: glutamate dehydrogenase and transmitter amino acids in the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 54, 984-988.
- Martin, L. J., Al-Abdulla, N. A., Brambrink, A. M., Kirsch, J. R., Sieber, F. E. and Portera-Cailliau, C., 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull.* 46, 281-309.

- Meeusen, R., Watson, P., Hasegawa, H., Roelands, B. and Piacentini, M. F., 2006. Central fatigue: the serotonin hypothesis and beyond. *Sports Med.* 36, 881-909.
- Migliore, L. and Coppede, F., 2009. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res.* 667, 82-97.
- Mills, K. R. and Nithi, K. A., 1997. Corticomotor threshold is reduced in early sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 20, 1137-1141.
- Mintz, I. M., Adams, M. E. and Bean, B. P., 1992. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron.* 9, 85-95.
- Mitchell, J. D., 2000. Amyotrophic lateral sclerosis: toxins and environment. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 1, 235-250.
- Mizuno, K., Tanaka, M., Nozaki, S., Yamaguti, K., Mizuma, H., Sasabe, T., Sugino, T., Shirai, T., Kataoka, Y., Kajimoto, Y., Kuratsune, H., Kajimoto, O. and Watanabe, Y., 2006. Mental fatigue-induced decrease in levels of several plasma amino acids. *J Neural Transm.*
- Mori, H., Inoki, K., Munzberg, H., Opland, D., Faouzi, M., Villanueva, E. C., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D., MacDougald, O. A., Myers, M. G., Jr. and Guan, K. L., 2009. Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metab.* 9, 362-374.
- Morimoto, N., Nagai, M., Ohta, Y., Miyazaki, K., Kurata, T., Morimoto, M., Murakami, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T. and Abe, K., 2007. Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 1167, 112-117.
- Murch, S. J., Cox, P. A., Banack, S. A., Steele, J. C. and Sacks, O. W., 2004. Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand.* 110, 267-269.
- Naka, D. and Mills, K. R., 2000. Further evidence for corticomotor hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 23, 1044-1050.
- Neher, E. and Sakmann, B., 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 260, 799-802.
- Neilson, S., Robinson, I. and Rose, F. C., 1995. Mortality from motor neuron disease in Japan, 1950-1990: association with radioactive fallout from atmospheric weapons testing. *J Neurol Sci.* 134, 61-66.
- Newsholme, E. A. and Blomstrand, E., 1996. The plasma level of some amino acids and physical and mental fatigue. *Experientia.* 52, 413-415.
- Newsholme, E. A. and Blomstrand, E., 2006. Branched-chain amino acids and central fatigue. *J Nutr.* 136, 274S-276S.
- Newsholme, E. A., Blomstrand, E., Hassmen, P. and Ekblom, B., 1991. Physical and mental fatigue: do changes in plasma amino acids play a role? *Biochem Soc Trans.* 19, 358-362.

- Nguyen, M. D., D'Aigle, T., Gowing, G., Julien, J. P. and Rivest, S., 2004. Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 24, 1340-1349.
- Ogata, N. and Ohishi, Y., 2002. Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn J Pharmacol.* 88, 365-377.
- Ohtani, M., Sugita, M. and Maruyama, K., 2006. Amino acid mixture improves training efficiency in athletes. *J Nutr.* 136, 538S-543S.
- Okado-Matsumoto, A. and Fridovich, I., 2002. Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 9010-9014.
- Olney, J., 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids,. In: McGeer, E. G. et al. (Eds.), *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. Raven Press, New York, pp. 95-121.
- Orrell, R. W., 2000. Amyotrophic lateral sclerosis: copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene mutations. *Neuromuscul Disord.* 10, 63-68.
- Pardo, C. A., Xu, Z., Borchelt, D. R., Price, D. L., Sisodia, S. S. and Cleveland, D. W., 1995. Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 954-958.
- Piazza, O., Siren, A. L. and Ehrenreich, H., 2004. Soccer, neurotrauma and amyotrophic lateral sclerosis: is there a connection? *Curr Med Res Opin.* 20, 505-508.
- Pieri, M., Albo, F., Gaetti, C., Spalloni, A., Bengtson, C. P., Longone, P., Cavalcanti, S. and Zona, C., 2003. Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 351, 153-156.
- Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N. B. and Zona, C., 2009. Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 215, 368-379.
- Plaitakis, A., 1990. Glutamate dysfunction and selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: a hypothesis. *Ann Neurol.* 28, 3-8.
- Plaitakis, A. and Caroscio, J. T., 1987. Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 22, 575-579.
- Plaitakis, A., Smith, J., Mandeli, J. and Yahr, M. D., 1988. Pilot trial of branched-chain aminoacids in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet.* 1, 1015-1018.
- Platell, C., Kong, S. E., McCauley, R. and Hall, J. C., 2000. Branched-chain amino acids. *J Gastroenterol Hepatol.* 15, 706-717.
- Pongs, O., 1999. Ion channels diseases: episodic disorders of the nervous system. *Semin Neurol.* 11, 217-226.

- Proud, C. G., 2002. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem.* 269, 5338-5349.
- Proud, C. G., 2004. mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 313, 429-436.
- Proud, C. G., 2006. Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans.* 34, 213-216.
- Proud, C. G., 2007. Amino acids and mTOR signalling in anabolic function. *Biochem Soc Trans.* 35, 1187-1190.
- Qian, J. and Noebels, J. L., 2001. Presynaptic Ca²⁺ channels and neurotransmitter release at the terminal of a mouse cortical neuron. *J Neurosci.* 21, 3721-3728.
- Rabin, B. A., Griffin, J. W., Crain, B. J., Scavina, M., Chance, P. F. and Cornblath, D. R., 1999. Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 122 (Pt 8), 1539-1550.
- Raibon, E., Todd, L. M. and Moller, T., 2008. Glial cells in ALS: the missing link? *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 19, 441-459, vii-viii.
- Randall, A. and Tsien, R. W., 1995. Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 15, 2995-3012.
- Rao, S. D. and Weiss, J. H., 2004. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci.* 27, 17-23.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J. and Rubinsztein, D. C., 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet.* 36, 585-595.
- Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H., Jr., Scott, R. W. and Snider, W. D., 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 13, 43-47.
- Reid, C. A., Bekkers, J. M. and Clements, J. D., 2003. Presynaptic Ca²⁺ channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci.* 26, 683-687.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X. and et al., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362, 59-62.
- Rothstein, J. D., 1995. Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurosci.* 3, 348-359.

- Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O. and Klionsky, D. J., 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 304-312.
- Saint, D. A., 2008. The cardiac persistent sodium current: an appealing therapeutic target? *Br J Pharmacol.* 153, 1133-1142.
- Sansom, M. S., Shrivastava, I. H., Ranatunga, K. M. and Smith, G. R., 2000. Simulations of ion channels--watching ions and water move. *Trends Biochem Sci.* 25, 368-374.
- Sarkar, S., Perlstein, E. O., Imarisio, S., Pineau, S., Cordenier, A., Maglathlin, R. L., Webster, J. A., Lewis, T. A., O'Kane, C. J., Schreiber, S. L. and Rubinsztein, D. C., 2007. Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat Chem Biol.* 3, 331-338.
- Scamps, F., Valentin, S., Dayanithi, G. and Valmier, J., 1998. Calcium channel subtypes responsible for voltage-gated intracellular calcium elevations in embryonic rat motoneurons. *Neuroscience.* 87, 719-730.
- Scarmeas, N., Shih, T., Stern, Y., Ottman, R. and Rowland, L. P., 2002. Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. *Neurology.* 59, 773-775.
- Schmelzle, T. and Hall, M. N., 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 103, 253-262.
- Schwenk, T. L. and Costley, C. D., 2002. When food becomes a drug: nonanabolic nutritional supplement use in athletes. *Am J Sports Med.* 30, 907-916.
- Sekulic, A., Hudson, C. C., Homme, J. L., Yin, P., Otterness, D. M., Karnitz, L. M. and Abraham, R. T., 2000. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.* 60, 3504-3513.
- Shaw, P. J. and Eggett, C. J., 2000. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 247 Suppl 1, I17-27.
- Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S. and Kobayashi, M., 2001. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* 917, 97-104.
- Shimomura, Y., Murakami, T., Nakai, N., Nagasaki, M. and Harris, R. A., 2004. Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J Nutr.* 134, 1583S-1587S.

- Smith, Q. R., 2000. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr.* 130, 1016S-1022S.
- Montine, T. J., Li, K., Perl, D. P. and Galasko, D., 2005. Lack of beta-methylamino-L-alanine in brain from controls, AD, or Chamorro with PDC. *Neurology.* 65, 768-769.
- Song, J. H., Huang, C. S., Nagata, K., Yeh, J. Z. and Narahashi, T., 1997. Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 282, 707-714.
- Soriani, M. H. and Desnuelle, C., 2009. [Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol (Paris).* 165, 627-640.
- Spalloni, A., Albo, F., Ferrari, F., Mercuri, N., Bernardi, G., Zona, C. and Longone, P., 2004. Cu/Zn-superoxide dismutase (GLY93-->ALA) mutation alters AMPA receptor subunit expression and function and potentiates kainate-mediated toxicity in motor neurons in culture. *Neurobiol Dis.* 15, 340-350.
- Stipa, G., Taiuti, R., de Scisciolo, G., Arnetoli, G., Tredici, M. R., Biondi, N., Barsanti, L. and Lolli, F., 2006. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis as an infectious disease: a possible role of cyanobacteria? *Med Hypotheses.* 67, 1363-1371.
- Struzynska, L., 2009. A glutamatergic component of lead toxicity in adult brain: the role of astrocytic glutamate transporters. *Neurochem Int.* 55, 151-156.
- Svoboda, K. and Mainen, Z. F., 1999. Synaptic [Ca²⁺]: intracellular stores spill their guts. *Neuron.* 22, 427-430.
- Taglietti, V. a. C., C., 1991. *Elementi di Fisiologia e Biofisica della cellula.* La Goliardica Pavese, Pavia.
- Taioli, E., 2007a. All causes of mortality in male professional soccer players. *Eur J Public Health.* 17, 600-604.
- Taioli, E., 2007b. Use of permitted drugs in Italian professional soccer players. *Br J Sports Med.* 41, 439-441.
- Takada, T., Komatsu, Y., Watakabe, A., Hashikawa, T., Tochtani, S. and Yamamori, T., 2005. Activity-dependent Expression of *occl1* in Excitatory Neurons Is a Characteristic Feature of the Primate Visual Cortex. *Cereb Cortex.*
- Takanaga, H., Mackenzie, B., Peng, J. B. and Hediger, M. A., 2005. Characterization of a branched-chain amino-acid transporter SBAT1 (SLC6A15) that is expressed in human brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 337, 892-900.
- Tamura, N., Kuwabara, S., Misawa, S., Kanai, K., Nakata, M., Sawai, S. and Hattori, T., 2006. Increased nodal persistent Na⁺ currents in human

- neuropathy and motor neuron disease estimated by latent addition. *Clin Neurophysiol.* 117, 2451-2458.
- Tateno, T., Harsch, A. and Robinson, H. P., 2004. Threshold firing frequency-current relationships of neurons in rat somatosensory cortex: type 1 and type 2 dynamics. *J Neurophysiol.* 92, 2283-2294.
- Testa, D., Caraceni, T. and Fetoni, V., 1989. Branched-chain amino acids in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 236, 445-447.
- Tokunaga, C., Yoshino, K. and Yonezawa, K., 2004. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 313, 443-446.
- Tortarolo, M., Veglianesi, P., Calvaresi, N., Botturi, A., Rossi, C., Giorgini, A., Migheli, A. and Bendotti, C., 2003. Persistent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis correlates with disease progression. *Mol Cell Neurosci.* 23, 180-192.
- Trotti, D., Aoki, M., Pasinelli, P., Berger, U. V., Danbolt, N. C., Brown, R. H., Jr. and Hediger, M. A., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J Biol Chem.* 276, 576-582.
- Tsang, C. K., Qi, H., Liu, L. F. and Zheng, X. F., 2007. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today.* 12, 112-124.
- Turner, M. R., Osei-Lah, A. D., Hammers, A., Al-Chalabi, A., Shaw, C. E., Andersen, P. M., Brooks, D. J., Leigh, P. N. and Mills, K. R., 2005. Abnormal cortical excitability in sporadic but not homozygous D90A SOD1 ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 76, 1279-1285.
- Urbani, A. and Belluzzi, O., 2000. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur J Neurosci.* 12, 3567-3574.
- Valenti, M., Pontieri, F. E., Conti, F., Altobelli, E., Manzoni, T. and Frati, L., 2005. Amyotrophic lateral sclerosis and sports: a case-control study. *Eur J Neurol.* 12, 223-225.
- Valentine, J. S. and Hart, P. J., 2003. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 3617-3622.
- Van Den Bosch, L. and Robberecht, W., 2008. Crosstalk between astrocytes and motor neurons: what is the message? *Exp Neurol.* 211, 1-6.
- van Hall, G., Raaymakers, J. S., Saris, W. H. and Wagenmakers, A. J., 1995a. Ingestion of branched-chain amino acids and tryptophan during sustained exercise in man: failure to affect performance. *J Physiol.* 486 (Pt 3), 789-794.
- van Hall, G., van der Vusse, G. J., Soderlund, K. and Wagenmakers, A. J., 1995b. Deamination of amino acids as a source for ammonia

- production in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Physiol.* 489 (Pt 1), 251-261.
- van Zundert, B., Peuscher, M. H., Hynynen, M., Chen, A., Neve, R. L., Brown, R. H., Jr., Constantine-Paton, M. and Bellingham, M. C., 2008. Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 28, 10864-10874.
- Vanacore, N., Binazzi, A., Bottazzi, M. and Belli, S., 2006. Amyotrophic lateral sclerosis in an Italian professional soccer player. *Parkinsonism Relat Disord.* 12, 327-329.
- Varnier, M., Sarto, P., Martines, D., Lora, L., Carmignoto, F., Leese, G. P. and Naccarato, R., 1994. Effect of infusing branched-chain amino acid during incremental exercise with reduced muscle glycogen content. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 69, 26-31.
- Veldink, J. H., Kalmijn, S., Groeneveld, G. J., Titulaer, M. J., Wokke, J. H. and van den Berg, L. H., 2005. Physical activity and the association with sporadic ALS. *Neurology.* 64, 241-245.
- Verger, P., Aymard, P., Cynobert, L., Anton, G. and Luigi, R., 1994. Effects of administration of branched-chain amino acids vs. glucose during acute exercise in the rat. *Physiol Behav.* 55, 523-526.
- von Lewinski, F. and Keller, B. U., 2005. Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci.* 28, 494-500.
- Vucic, S. and Kiernan, M. C., 2006. Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 117, 1458-1466.
- Vucic, S. and Kiernan, M. C., 2008. Cortical excitability testing distinguishes Kennedy's disease from amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 119, 1088-1096.
- Vucic, S., Nicholson, G. A. and Kiernan, M. C., 2008. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 131, 1540-1550.
- Wang, M. Y., Lu, K. V., Zhu, S., Dia, E. Q., Vivanco, I., Shackelford, G. M., Cavenee, W. K., Mellinghoff, I. K., Cloughesy, T. F., Sawyers, C. L. and Mischel, P. S., 2006. Mammalian target of rapamycin inhibition promotes response to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in PTEN-deficient and PTEN-intact glioblastoma cells. *Cancer Res.* 66, 7864-7869.
- Wang, X., Fonseca, B. D., Tang, H., Liu, R., Elia, A., Clemens, M. J., Bommer, U. A. and Proud, C. G., 2008. Re-evaluating the roles of proposed modulators of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. *J Biol Chem.* 283, 30482-30492.

- Watanabe, A., Shiota, T., Takei, N., Fujiwara, M. and Nagashima, H., 1986. Ammonia detoxification by accelerated oxidation of branched chain amino acids in brains of acute hepatic failure rats. *Biochem Med Metab Biol.* 35, 367-375.
- Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V. C., Price, D. L., Wong, P. C. and Rothstein, J. D., 2001. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis.* 8, 933-941.
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N. and Rubinsztein, D. C., 2003. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem.* 278, 25009-25013.
- Wicks, P., Ganesalingham, J., Collin, C., Prevett, M., Leigh, N. P. and Al-Chalabi, A., 2007. Three soccer playing friends with simultaneous amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 8, 177-179.
- Wilson, R. I., Kunos, G. and Nicoll, R. A., 2001. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron.* 31, 453-462.
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W. and Price, D. L., 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron.* 14, 1105-1116.
- Wood, J. D., Beaujeux, T. P. and Shaw, P. J., 2003. Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 29, 529-545.
- Worms, P. M., 2001. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci.* 191, 3-9.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W. and Hall, M. N., 2005. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem.* 280, 30697-30704.
- Xu, G., Kwon, G., Cruz, W. S., Marshall, C. A. and McDaniel, M. L., 2001. Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 50, 353-360.
- Xu, G., Kwon, G., Marshall, C. A., Lin, T. A., Lawrence, J. C., Jr. and McDaniel, M. L., 1998. Branched-chain amino acids are essential in the regulation of PHAS-I and p70 S6 kinase by pancreatic beta-cells. A possible role in protein translation and mitogenic signaling. *J Biol Chem.* 273, 28178-28184.
- Yielding, K. L. and Tomkins, G. M., 1961. An effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamic dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 47, 983-989.
- Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J., 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2, 1542-1552.

- Yu, F. H. and Catterall, W. A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4, 207.
- Yudkoff, M., 1997. Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia.* 21, 92-98.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Lin, Z. P., Nissim, I., Stern, J., Pleasure, D. and Nissim, I., 1994. Interrelationships of leucine and glutamate metabolism in cultured astrocytes. *J Neurochem.* 62, 1192-1202.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Horyn, O., Luhovyy, B., Lazarow, A. and Nissim, I., 2005. Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. *J Nutr.* 135, 1531S-1538S.
- Zeng, L. H., Xu, L., Gutmann, D. H. and Wong, M., 2008. Rapamycin prevents epilepsy in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Ann Neurol.* 63, 444-453.
- Zhang, B., Kuntz, M. J., Goodwin, G. W., Edenberg, H. J., Crabb, D. W. and Harris, R. A., 1989. cDNA cloning of the E1 alpha subunit of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. *Ann N Y Acad Sci.* 573, 130-136.
- Zona, C., Cavalcanti, S., De Sarro, G., Siniscalchi, A., Marchetti, C., Gaetti, C., Costa, N., Mercuri, N. and Bernardi, G., 2002. Kainate-induced currents in rat cortical neurons in culture are modulated by riluzole. *Synapse.* 43, 244-251.
- Zona, C., Ferri, A., Gabbianelli, R., Mercuri, N. B., Bernardi, G., Rotilio, G. and Carri, M. T., 1998. Voltage-activated sodium currents in a cell line expressing a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial ALS. *Neuroreport.* 9, 3515-3518.
- Zona, C., Pieri, M. and Carunchio, I., 2006. Voltage-dependent sodium channels in spinal cord motor neurons display rapid recovery from fast inactivation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurophysiol.* 96, 3314-3322.