

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

XXII CICLO

TESI DI DOTTORATO

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI UN
MODELLO ANIMALE DI ADHD: I RATTI
"NAPLES HIGH-EXCITABILITY"

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Lucio Annunziato

Candidato:

Dr. Ugo Antonello Gironi Carnevale

TUTORE:

Chiar.mo Prof. Adolfo Sadile
Dip. Medicina Sperimentale S.U.N.

Anno accademico 2008-2009

Indice

Indice.....	2
INTRODUZIONE.....	3
Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)	3
Selezione Genetica dei ratti NHE	5
Istochimica e Biologia Molecolare dei ratti NHE.....	7
Scopo della ricerca	9
MATERIALI E METODI.....	11
Metodi generali	11
Animali.....	11
Apparato sperimentale – Labirinto di Låt	11
Analisi del comportamento	13
Analisi dei dati e metodi statistici	14
Studio di incroci di tipo mendeliano	14
Procedura di realizzazione degli incroci	14
Analisi degli incroci e calcolo dell'indice di ereditabilità	16
Analisi quantitativa e stima del modello genetico	16
Studio di proteomica cerebrale.....	19
Preparazione dei campioni	19
Elettroforesi bidimensionale	20
Analisi dei gel	22
RISULTATI	23
Incroci mendeliani.....	23
Ereditabilità	31
Analisi quantitativa del carattere ereditario	33
Studio di proteomica cerebrale.....	40
DISCUSSIONE.....	45
RINGRAZIAMENTI	50
RIASSUNTO	51
BIBLIOGRAFIA	53

INTRODUZIONE

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)

La sindrome da deficit di attenzione e iperattività (ADHD) è un disordine neuropsichiatrico che comporta l'incapacità di mantenere la concentrazione sull'esecuzione di specifici compiti e la comparsa di eccessi di attività a carattere impulsivo. Tale disfunzione colpisce soggetti in età prepuberale, fra i 6 e i 14 anni, con una prevalenza di maschi sulle femmine di 4 a 1 ed una diffusione nella popolazione compresa fra l'1 e il 3%. Nel 70% dei casi la sintomatologia regredisce con la pubertà mentre nel restante 30% tutti o alcuni sintomi persistono in età adulta (American Psychiatric Association, 1994;Solanto, 2002;Kieling et al., 2008).

Le cause della malattia sono principalmente di tipo genetico, ma molti fattori ambientali sembrano influenzarne l'espressione fenotipica sia a livello comportamentale che di sviluppo cerebrale come confermano anche numerosi studi eseguiti su modelli animali (Schmitz and Mrazek, 2001;Sadile et al., 1986;Wolfer and Lipp, 2000;Holmes et al., 2005). Infatti, fattori come la qualità e la quantità dell'alimentazione, il livello di cure parentali e la crescita in ambienti diversamente stimolanti insieme all'uso di alcool o droghe, incidono significativamente sull'intensità e l'estensione dei sintomi (vedere per es. (Fresiello et al., 2002)).

L'ADHD viene univocamente correlata con un'alterazione dei livelli di dopamina (DA) nel cervello (Sergeant et al., 2003;Faraone et al., 2003), un neurotrasmettitore che è presente nei sistemi cerebrali mesostriatale e meso-

cortic limbico e che controlla direttamente o indirettamente l'attenzione, i meccanismi di ricompensa (piacere), l'attività motoria e la secrezione ormonale (Missale et al., 1998; Bentivoglio and Morelli, 2005). La terapia è pertanto rivolta al ripristino dei corretti livelli di DA nel cervello ottenuto modificando i processi neuronali di produzione, ovvero la secrezione, il riassorbimento e la degradazione del neurotrasmettitore, o mediante apporto esogeno (Olanow et al., 2004; Solanto, 1998; Pisani et al., 2005). In particolare la concentrazione di DA è regolata nei neuroni sia da un meccanismo di diffusione passiva che da un trasporto attivo mediato da uno specifico trasportatore (DAT) (Viggiano et al., 2004). Quest'ultimo meccanismo può essere modificato utilizzando specifici farmaci quali il metilfenidato (MPH) che agiscono principalmente modificando l'attività del DAT. Inoltre è possibile incrementare i livelli di DA nei neuroni anche attraverso la somministrazione diretta di precursori del neurotrasmettitore quale L-DOPA che, sfruttando il sistema di trasporto cerebrale degli L-amminoacidi (Mercuri and Bernardi, 2005), riescono a superare la barriera ematoencefalica per poi essere successivamente metabolizzati.

L'ipotesi che l'ADHD sia legata a disfunzioni del sistema dopaminergico cerebrale è supportata da evidenze di tipo farmacologico, clinico e sperimentale (Solanto, 2002; Kieling et al., 2008). In particolare esistono due differenti alterazioni neurofunzionali delle branche del sistema dopaminergico mesocortic limbico che sono state associate alle variabili manifestazioni cliniche dell'ADHD: una che coinvolge la branca mesocorticale e che è caratterizzata da un'alterazione delle funzioni esecutive, ovvero del controllo

dell'attività; l'altra che riguarda quella mesolimbica e che comporta la cosiddetta avversione al ritardo, ovvero l'alterazione della percezione della sequenza temporale delle attività e produce l'incapacità emotiva di attendere gli esiti di azioni precedenti.

L'utilizzo di modelli animali rappresenta uno degli strumenti più potenti e flessibili a disposizione dei ricercatori per lo studio di disfunzioni di tale tipo in quanto rende possibile la suddivisione del complesso quadro sintomatologico in elementi semplici che possono essere studiati separatamente. Come modello animale dell'ADHD sono stati frequentemente utilizzati i ratti Naples ad alta eccitabilità (NHE) e i ratti spontaneamente ipertesi (SHR) che modellano rispettivamente la variante mesocorticale e quella mesolimbica della sindrome. In particolare i ratti NHE, che presentano evidenti alterazioni istologiche e neurochimiche della branca mesocorticale del sistema dopaminergico cerebrale e manifestano notevoli carenze dell'attenzione quando posti in un ambiente nuovo, possono essere considerati uno dei modelli più completi della variante mesocorticale dell'ADHD (Viggiano et al., 2003).

Selezione Genetica dei ratti NHE

La selezione della linea di ratti NHE è partita nel 1976 da una popolazione di ratti Sprague-Dawley e dura da oltre 100 generazioni. Tale linea è stata selezionata sulla base dell'elevata risposta comportamentale all'esposizione ad un ambiente nuovo dal punto di vista spaziale come il labirinto di Låt (Gironi Carnevale et al., 2007; Cerbone et al., 1993; Viggiano et al., 2002).

Parallelamente è stata anche ottenuta un'altra linea di ratti, denominata Naples Low Excitability (NLE) con profilo comportamentale diametralmente opposto. La selezione, basata sui punteggi di attività totale (orizzontale+verticale) ottenuti durante i test nel labirinto di Låt, è stata realizzata incrociando sistematicamente fra loro individui che presentavano valori di attività elevati nel caso degli NHE o molto bassi nel caso degli NLE. Il programma di incroci è stato curato in modo da ridurre al minimo il rischio di inincrocio e massimizzare la fitness e la fertilità degli individui.

La iper ed ipo-attività di queste due linee è stata anche verificata in altri tipi di apparato come la tavola a buchi, il labirinto radiale di Olton o il tunnel esagonale (Viggiano et al., 2002). La divergenza comportamentale fra le due linee di ratti sembra essere correlata con la complessità del test spaziale a cui sono state esposte (Viggiano et al., 2002) e ciò potrebbe indicare una possibile associazione con disfunzioni del sistema limbico piuttosto che dei sistemi motori. Inoltre poiché è risaputo che la risposta comportamentale conseguente all'esposizione ad un ambiente nuovo è legata all'ippocampo, ed in particolare alla sua integrità strutturale e funzionale (Chozick, 1983), i ratti NHE e NLE potrebbero rappresentare un utile strumento per lo studio di questa struttura cerebrale. Infatti, le due componenti dell'attività nel labirinto di Låt, ovvero quella orizzontale e quella verticale, sono correlate con onde ritmiche a bassa frequenza nell'ippocampo (Vanderwolf, 1969) (Whishaw and Vanderwolf, 1973) (Buzsaki, 2002). Si ritiene inoltre che tali due componenti dell'attività possano avere un differente significato: quella orizzontale di tipo prevalentemente cognitivo mentre quella verticale di tipo non cognitivo

(Gironi Carnevale et al., 1990) (Damasio, 1994). E' interessante notare come tali componenti siano controllate da geni diversi e siano state geneticamente dissociate nei topi (Van Abeelen, 1970) e nei ratti (Sanders, 1981).

Istochimica e Biologia Molecolare dei ratti NHE

Studi istochimici e di biologia molecolare sul cervello dei ratti NHE hanno messo in luce significative differenze della struttura funzionale dei sistemi dopaminergici cerebrali, ovvero quelli che più tipicamente sono correlati con le differenze comportamentali peculiari delle linee Naples (Viggiano et al., 2003).

E' stata riscontrata un'ipertrofia nell'area tegmentale ventrale del sistema dopaminergico mesocorticale evidenziata da:

1. un maggiore volume dei neuroni A10 mesencefalici (+30%)(Viggiano and Sadile, 2000);
2. una maggiore densità di fibre positive per la presenza di tirosina idrossilasi (TH);
3. un'elevata espressione di TH rilevata mediante western blot;
4. una sovraespressione della fosfoproteina DARP32.
5. nessuna significativa alterazione nel Nucleus Accumbens, bersaglio della branca dopaminergica mesolimbica .

Inoltre nell'area della corteccia prefrontale il sistema dopaminergico presenta:

1. un'elevata densità di varicosità assionali;
2. un'alta presenza della proteina di trasporto della dopamina (DAT);
3. una ridotta concentrazione di recettori per la dopamina di tipo D1 e D2.

Questo quadro fa ipotizzare che la branca dopaminergica mesocorticale dei ratti NHE si trovi in uno stato di elevata funzionalità. Infatti la somministrazione ripetuta di metilfenidato (MPH 3 mg/Kg per 14 giorni), normalizza l'iperattività riducendo il rilascio di DA e modificando la distribuzione dei recettori D1 e D2, e del DAT nella corteccia prefrontale (Oades et al., 2005).

Un ulteriore studio in vivo basato sulla microdialisi ha dimostrato come i ceppi NHE e NLE presentino nell'accumbens core, una particolare porzione dell'area tegmentale ventrale, livelli basali di DA significativamente più bassi rispetto a ratti di controllo. Un'iniezione di 1 mg/Kg di morfina solfato produce un notevole innalzamento della DA solo negli NHE (Ruocco L.A. et al., 2006). Sulla base di quest'ultimo studio sembra plausibile ipotizzare che i ceppi Naples presentino significative differenze relativamente alla sola branca mesocorticale e non a quella mesolimbica del sistema dopaminergico.

Scopo della ricerca

Il nostro lavoro di ricerca è partito dal presupposto che il fenotipo caratterizzante i due ceppi Naples, ovvero l'iperattività dei ratti NHE e l'ipoattività di quelli NLE quando vengono esposti ad un contesto spaziale nuovo come il labirinto di Làt, avesse una forte determinazione genetica. Pertanto la prima fase della ricerca è stata realizzata utilizzando un approccio di analisi genetica classica volto a verificare se il carattere selezionato fosse di tipo qualitativo o quantitativo e quale fosse il suo livello di ereditabilità. Per fare ciò sono stati analizzati i livelli di espressione fenotipica in 20 generazioni di selezione dei due ceppi e in ibridi ottenuti incrociando secondo uno schema mendeliano animali NHE ed NLE. In particolare questa ultima parte è stata realizzata in due fasi, una in cui non si è tenuto conto del sesso dei genitori nella realizzazione degli incroci ed una in cui invece sono stati analizzati i contributi parentali sulla base del sesso.

Nella seconda fase della ricerca si è quindi proceduto ad individuare i modelli genetici, ovvero il numero e il tipo di geni coinvolti, che meglio potevano spiegare la distribuzione del fenotipo comportamentale verificata negli incroci. Tale approccio è stato possibile in quanto, avendo accertato la natura quantitativa del carattere selezionato nelle due linee, abbiamo potuto analizzare i dati fenotipici con specifici metodi statistici e matematici di analisi genetica quantitativa.

La terza fase è stata condotta per individuare a livello cerebrale specifici indicatori molecolari selettivamente espressi per i due fenotipi estremi, ovvero quello degli NHE e degli NLE. Si è scelto quindi di utilizzare un approccio di

tipo proteomico per studiare la presenza ed il livello di espressione di peculiari specie proteiche nelle principali aree cerebrali del sistema dopaminergico mesocorticale ed in alcune aree esterne di riferimento. Sono stati selezionati e sacrificati alcuni animali rappresentativi delle due linee e i campioni di tessuto cerebrale di ogni area sono stati opportunamente preparati e sottoposti ad elettroforesi bidimensionale che ha consentito la separazione delle varie specie proteiche per punto isoelettrico e peso molecolare.

In sintesi con il nostro lavoro abbiamo indagato sulle basi genetiche di un fenotipo comportamentale correlabile con alterazioni neurali di particolari sistemi cerebrali. Si è inoltre cercato di individuare specifici marcatori molecolari che potessero essere univocamente legati a tale stato alterato. E' chiaro come, essendo ancora aperte significative controversie sulla diagnosi e la terapia di sindromi quale L'ADHD, l'obiettivo di ottenere criteri diagnostici sempre più oggettivi ed indiscutibili rappresenti un traguardo significativo per le ricerche nello specifico campo.

MATERIALI E METODI

Metodi generali

Animali

Per la sperimentazione sono stati utilizzati ratti maschi e femmine di età compresa fra 60 e 80 giorni, provenienti dalle nostre colonie delle linee NHE ed NLE ottenute a partire da un ceppo di animali Sprague-Dawley. Coppie di animali dello stesso sesso e linea sono stati tenuti in gabbie tipo “Macrolon”, con il fondo coperto da materiale assorbente vegetale periodicamente ricambiato, in un ambiente a temperatura e rumorosità controllata. Hanno avuto continua disponibilità di cibo (Mucedola, Italia) ed acqua con un ciclo luce-buio con la fase luminosa impostata dalle ore 6.00 alle 18.00. Tutti gli altri parametri hanno soddisfatto gli standard previsti nella “guida per la cura e l’utilizzo degli animali da laboratorio” del N.I.H. integrati secondo la Direttiva EEC del 24 novembre 1986 (86/609/EEC).

Apparato sperimentale – Labirinto di Làt

Il labirinto di Làt, dettagliatamente descritto altrove (Viggiano et al., 2002), è un semplice apparato ideato per valutare la risposta motoria e la capacità di orientamento di ratti.

In sintesi è formato da una scatola quadrata di legno, con uno dei lati realizzato in plexiglass per poter osservare il comportamento dell’animale posto all’interno, con la base di 60 cm di lato ed un’altezza di 40 cm (Fig.1). All’interno è posta un’altra scatola realizzata in plexiglass trasparente con la base di 30 cm di lato ed

un'altezza di 40 cm. In tal modo il ratto ha disponibile un corridoio quadrato largo 15 cm per potersi muovere ed esplorare l'ambiente.

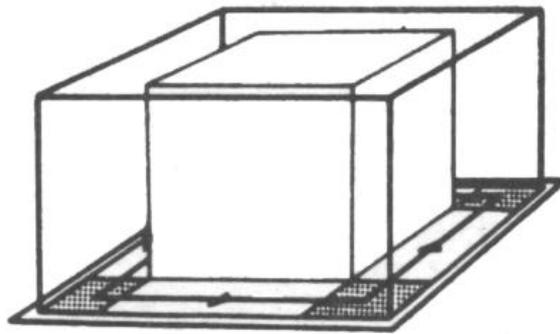


Figura 1. Il labirinto di Låt

La scatola è chiusa da un coperchio dotato di una lampada interna di 4 Watt che fornisce un'illuminazione di circa $0.1-0.2\mu\text{W}/\text{cm}^2$. La sperimentazione è stata condotta in una sala acusticamente isolata disponendo due labirinti affiancati su un banco da lavoro in modo da testare due animali contemporaneamente. In tal modo si è evitata l'interferenza sulla risposta comportamentale dell'animale che, restando in attesa nella gabbia da solo, sarebbe stato sottoposto a stimoli ambientali quali i richiami del compagno che stava eseguendo il test. Le prove nel labirinto hanno avuto una durata di 10 minuti e sono state eseguite all'inizio della fase di buio, ovvero dopo le ore 18.00, nel tipico periodo di massima attività del ratto. Il comportamento è stato registrato con una videocamera ad alta risoluzione su DVD e successivamente analizzato utilizzando uno specifico software.

Analisi del comportamento

La registrazione del comportamento dei singoli animali è stata analizzata a posteriori, dividendola in blocchi di 1 minuto, e prendendo in considerazione i seguenti parametri:

1. attività orizzontale (HA), calcolata contando il numero di passaggi degli animali da un angolo all'altro del labirinto nel tempo. Eventuali percorsi invertiti, ovvero quando il ratto interrompeva il movimento tornando sull'angolo di partenza, venivano conteggiati solo se l'animale aveva percorso almeno metà (30cm) del corridoio;
2. attività verticale (VA), calcolata contando il numero di alzate sulle zampe posteriori effettuate dal ratto per esplorare l'ambiente in direzione verticale. Tale parametro comprendeva sia le alzate libere che quelle con appoggio delle zampe anteriori sulla parete esplorata.

La somma dei due parametri rappresentava l'attività totale (HVA) espressa dall'animale durante i 10 minuti del test. In particolare la selezione dei due ceppi NHE e NLE è stata realizzata considerando il punteggio degli animali relativamente all'attività totale e ai singoli parametri nei primi 5 minuti del test, ovvero nella fase di massima risposta comportamentale. Infatti nei secondi 5 minuti di test si osserva generalmente un calo dell'attività, dovuto all'abitudine a breve termine (STH) dell'animale al nuovo contesto. Inoltre a distanza di 48 ore gli animali della seconda fase d'incroci mendeliani sono stati sottoposti ad un secondo test per verificare l'abitudine a lungo (LTH) termine, ovvero il calo della reattività comportamentale dovuto al ricordo della precedente esperienza.

Alla fine di ogni test venivano inoltre contati i boli fecali come indice rappresentativo dello stress subito dall'animale (Eysenck and Broadhurst, 1964).

Il pavimento dei labirinti veniva quindi pulito con un panno umido per rimuovere le eventuali tracce lasciate dai soggetti testati che avrebbero potuto alterare il comportamento dei successivi animali.

Analisi dei dati e metodi statistici

I valori dei parametri comportamentali relativi ad ogni animale sono stati inseriti in un database. Sono stati quindi calcolati la media e l'errore standard per le linee NHE , NLE e per tutti gli ibridi ottenuti e, per verificare l'opportunità di analizzare i dati con metodi di statistica parametrica, è stata valutata l'omogeneità delle varianze dei due gruppi secondo i metodi di Bartlett o Levene. I dati sono stati quindi sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) per dati indipendenti o per dati ripetuti. In particolare quest'ultima modalità è stata utilizzata per valutare la riduzione dell'attività degli animali a breve termine o a lungo termine.

Per confrontare gli score ottenuti da ogni gruppo nei diversi tempi del test è stato utilizzato anche il t-test di Student per dati appaiati dopo aver eseguito la correzione dell'alpha secondo la procedura di Hölm (Hölm, 1979). Quando i dati non soddisfacevano i criteri di omogeneità della varianza secondo i metodi precedentemente citati, si è proceduto alla loro analisi con test di tipo non parametrico come quello di Kruskal Wallis.

Studio di incroci di tipo mendeliano

Procedura di realizzazione degli incroci

In una prima fase, senza tenere conto del sesso dei genitori si è proceduto ad incrociare individui delle due linee parentali NHE (P1- n=26) e NLE (P2 – n=24) ottenendo ibridi di prima generazione F1(n=15). Questi sono stati a loro volta

incrociati fra loro per dare ibridi di seconda generazione F2 (n=28) oppure reincrociati con le linee parentali ottenendo rispettivamente i due retroincroci B1 (n=19) con gli NHE e B2 (n=14) con gli NLE. Tutti gli animali sono stati testati nel labirinto di Låt per misurarne le prestazioni comportamentali.

Per verificare un'eventuale influenza del sesso nell'ereditabilità del fenotipo si è proceduto a realizzare una seconda serie d'incroci mendeliani differenziando le possibili combinazioni parentali, ovvero padre NHE con madre NLE e viceversa (Schicknick et al., 1993). Sono stati quindi ottenuti due tipi di ibridi di prima generazione (F1A e F1B) che incrociati ognuno con se stesso hanno generato due tipologie di ibridi di seconda generazione (F2A e F2B). Gli ibridi di prima generazione sono stati anche reincrociati con le due linee parentali ottenendo 8 diversi tipi di retroincroci (B1A-B-C-D e B2A-B-C-D). Lo schema della seconda fase d'incroci è sintetizzato nella seguente tabella:

Generazione	Incrocio	♂	♀
P1	NHE x NHE	8	8
P2	NLE x NLE	8	8
F1A	P1♂ x P2♀	9	12
F1B	P1♀ x P2♂	8	8
F2A	F1A x F1A	9	12
F2B	F1B x F1B	9	6
B1A	F1A♂ x P1♀	6	5
B1B	F1A♀ x P1♂	12	1
B1C	F1B♂ x P1♀	8	12
B1D	F1B♀ x P1♂	12	9
B2A	F1B♂ x P2♀	9	9
B2B	F1B♀ x P2♂	7	12
B2C	F1A♂ x P2♀	9	9
B2D	F1A♀ x P2♂	10	6

Analisi degli incroci e calcolo dell'indice di ereditabilità

Le differenze fra gli ibridi ottenuti dagli incroci precedenti sono state valutate sottoponendo i relativi dati di comportamento, divisi per incrocio e/o sesso ad analisi della varianza univariata o bifattoriale (ANOVA) per dati indipendenti.

L'indice di ereditabilità (h^2) relativo al fenotipo in studio, ovvero l'attività totale (HVA) rilevata nei primi 5 minuti di test nel labirinto di Làt, è stato calcolato con il metodo della regressione discendenza/genitori (Falconer, 1960) considerando i valori medi rilevati in 20 generazioni di selezione delle linee NHE ed NLE e quelli di tutti gli ibridi ottenuti negli incroci mendeliani. Al fine di minimizzare l'errore dovuto alla differente numerosità delle diverse generazioni considerate, ovvero alla diversa rappresentatività dei valori medi calcolati, è stata definita la seguente funzione di normalizzazione:

(N° componenti generazione/Errore standard media della generazione) x K

dove K è una costante calcolata per riportare allo stesso numero di individui ogni generazione considerata.

Utilizzando la medesima procedura è stato anche calcolato l'indice di ereditabilità per le due singole componenti dell'attività nel labirinto di Làt, ovvero quella orizzontale (HA) e quella verticale (VA). In questo caso sono però stati utilizzati esclusivamente i dati provenienti dagli incroci mendeliani.

Analisi quantitativa e stima del modello genetico

Per poter stimare quale fosse il modello genetico più idoneo a spiegare la distribuzione del fenotipo evidenziata negli incroci mendeliani, è stato utilizzato un approccio di tipo statistico. Risultava importante pertanto poter eseguire questa stima sul maggior numero di dati possibile ed è stata quindi preliminarmente

accertata l'omogeneità dei risultati ottenuti nelle due serie d'incroci. Si è proceduto quindi all'unificazione dei dati delle generazioni corrispondenti, alla verifica della normalità delle nuove distribuzioni con il test di Kolmogorov-Smirnov e dell'omogeneità delle loro varianze con il test di Levene. Avendo le nuove serie di dati soddisfatto tutte le precedenti condizioni si è proceduto alle successive analisi senza sottoporli ad alcun tipo di trasformazione.

Le nuove serie di dati sono quindi state analizzate utilizzando inizialmente la procedura di "joint-scaling" secondo il modello di ereditabilità semplificato proposto da M. Lynch B. Walsh (Lynch and Walsh, 1998). Secondo questo modello il fenotipo, prendendo come riferimento l'espressione in generazione F2, è generato dalla contemporanea azione di effetti di additività, dominanza ed epistasi in un sistema genetico a due loci. Queste tre componenti contribuiscono all'espressione finale del carattere secondo i seguenti coefficienti:

Generazione	Media generale	Additività	Dominanza	Epistasi		
				Additività x additività	Additività x dominanza	Dominanza x dominanza
	μ_0	α_1	Δ_1	α_2	$\alpha_1\delta_1$	δ_2
P1	1	1	-1	1	-1	1
P2	1	-1	-1	1	1	1
F1	1	0	1	0	0	1
F2	1	0	0	0	0	0
B1	1	0,5	0	0,25	0	0
B2	1	-0,5	0	0,25	0	0

La procedura parte dal modello ad un parametro, quello con la sola componente di additività, stimando dei valori di espressione fenotipica che vengono confrontati con quelli ottenuti sperimentalmente attraverso un test del χ^2 modificato. Se il valore del χ^2 risulta abbastanza elevato da rigettare il modello proposto, considerando come gradi di libertà del sistema il numero delle

generazioni considerate meno il numero dei parametri stimati, si continua stimando i valori per un modello più complesso con un parametro aggiuntivo.

La procedura continua finché non si ottengono valori di χ^2 non significativi a conferma della buona corrispondenza fra i dati stimati per il modello e quelli sperimentali. La conferma finale della rispondenza del modello viene ottenuta verificando la significativa differenza tra il valore di χ^2 calcolato per l'ultima stima e quello della stima immediatamente precedente considerando come gradi di libertà la differenza fra il numero di parametri utilizzati nelle due stime. Nel nostro studio, avendo a disposizione solo sei generazioni (P1, P2, F1, F2, B1 e B2) abbiamo potuto applicare la suddetta procedura fino a modelli con massimo 5 parametri, ovvero quelli che prendevano in considerazione la seconda componente epistatica (additività x dominanza). L'analisi è stata ripetuta anche per le singole componenti HA e Va dell'attività nel labirinto di Låt.

I dati sono stati poi sottoposti ad un'ulteriore analisi, di nostra ideazione, basata sullo studio dei coefficienti di regressione fra i valori fenotipici sperimentali e quelli stimati per modelli ereditari semplici. Partendo dall'ipotesi che il fenotipo dei ratti NLE fosse correlato con una condizione di omozigosi recessiva e quello degli NHE con uno di omozigosi dominante e considerando assente qualsiasi legame del carattere selezionato con il sesso, abbiamo considerato i seguenti modelli:

1. un modello monogenico con 2 alleli a dominanza completa;
2. un modello monogenico con 2 alleli a dominanza incompleta o codominanti;

- alcuni semplici modelli poligenici additivi con o senza geni di controllo epistatico.

L'intervallo di espressione fenotipica è stato calcolato come la differenza fra i valori medi espressi nelle due linee parentali (P1 e P2). Tale intervallo è stato poi suddiviso in tante parti quanti erano i genotipi previsti per ogni modello considerato in modo da stimarne l'espressione fenotipica media. Si è quindi ricostruito per ogni generazione dell'incrocio mendeliano, considerando il relativo mix genotipico percentuale, un valore medio fenotipico. Tali valori fenotipici stimati sono stati messi in correlazione con quelli sperimentali di tutte le generazioni utilizzando il metodo parametrico di Pearson. In particolare il coefficiente di correlazione è stato calcolato considerando esclusivamente le generazioni ibride (F1, F2, B1 e B2) per evitare l'appiattimento dovuto alle due generazioni parentali (P1 e P2) che per definizione presentavano valori stimati/sperimentali sempre coincidenti. Anche in questo caso l'analisi è stata ripetuta considerando separatamente le due componenti comportamentali HA e VA. Sono stati presi in considerazione solo i modelli che presentavano elevati valori del coefficiente di correlazione.

Studio di proteomica cerebrale

Preparazione dei campioni

Per questo studio sono stati selezionati sei animali rappresentativi delle due linee NHE e NLE che sono stati preventivamente sottoposti ad una sessione di 10 minuti nel labirinto di Låt secondo le modalità precedentemente descritte. Sono stati quindi sacrificati e si è proceduto al prelievo dei loro cervelli dai quali sono

state sezionate le seguenti aree basandosi su specifici riferimenti anatomici (Paxinos and Watson, 2007): corteccia prefrontale (PFC), striato (STR), ippocampo (HPC), mesencefalo (MES), ipotalamo (HYP) e cervelletto (CER).

I campioni prelevati sono stati conservati a -80°C fino all'esecuzione delle successive analisi.

Elettroforesi bidimensionale

Una volta scongelati i campioni sono stati suddivisi in due pool per ogni linea ognuno dei quali era composto dalla miscela del tessuto della medesima area cerebrale proveniente da 3 diversi animali. Sono stati quindi omogeneizzati manualmente in TRIS-HCl 1,5M (pH 8,8) e trattati con inibitori delle proteasi (Sodio vanadato, 1mM), delle fosfatasi (Sodio fluoruro, 40mM) e delle chinasi (Sodiopirofosfato, 1mM). Le concentrazioni delle proteine sono state determinate spettrofotometricamente a 750nm (Lowry et al., 1951). Sono state poi precipitate mediante addizione del 10% di acido tricloroacetico (TCA, 100%) e centrifugazione a freddo a 15000 r.p.m. per 15'. Si è quindi proceduto al lavaggio del precipitato in etere 80% + H₂O 20%, alla sua risospensione in soluzione (urea 9M + 0,015% di anfoline + 2% CIAPS + 5Mm DTT) ed alla conservazione a 4°C.

I campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide per ottenere la separazione dei vari polipeptidi. In particolare tale tecnica consente di separare efficacemente sulle due dimensioni del gel di supporto migliaia di prodotti genici contemporaneamente. La prima dimensione consiste in una focalizzazione isoelettrica (IEF), in cui le proteine vengono separate in un gradiente di pH, fino a quando non raggiungono uno stato

d'equilibrio dove la loro carica netta è uguale a zero (punto isoelettrico). Nella seconda dimensione i polipeptidi, separati dalla IEF, vengono separati ortogonalmente da una elettroforesi in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE). Il surfattante SDS si lega alle proteine, coprendo la loro carica intrinseca, cosicché ogni proteina ha la stessa densità di carica. Quando le proteine rivestite di SDS migrano in un gel di poliacrilammide esse si separano per il loro diverso peso molecolare, sfruttando l'effetto setaccio offerto dalla struttura tridimensionale del gel stesso (Herbert, 1999).

Per l'elettroforesi bidimensionale è stato approntato un gel al 10% (Acrilammide stock, 33,28% + Tris-HCl 1,5M, 25,07% + H₂O, 39,49% + 10%-SDS, 1% + 10%-persolfato di ammonio, 1% + 10%TEMED, 0,17%) con spessore 1,0 mm. Sono stati seminati 300µg di campione sul gel con un range non lineare di pH da 3 a 10 e sottoposti a focalizzazione isoelettrica per 18 h (1^a dimensione) applicando una potenza di 40 watt. In tale fase i gel sono stati ricoperti da olio minerale sterile per evitare bruciature della preparazione. Si è quindi proceduto alla separazione per massa (2^a dimensione) ruotando i gel di 90° ed inserendoli in una camera elettroforetica Pharmacia con potenza di 20 Watt dotata di 6 celle in cui è stato possibile trattare contemporaneamente 3 coppie di campioni in modo da garantire la massima confrontabilità delle separazioni. Tale seconda fase è stata condotta fino a fine corsa (5-6 h ca.) con una struttura-setaccio del gel che ha consentito la separazione di proteine con p.m. compreso fra 10 a 120 kDa .

I gel bidimensionali sono stati poi trattati con una soluzione di fissaggio (metanolo, 50%+acido acetico, 12% + formalina, 0,05%) per 2 ore, lavati con etanolo (35%) per un'ora, trattati con solfato di sodio (0,02%) per 2 minuti e

quindi rilavati per 15 minuti con H₂O. Si è proceduto alla loro colorazione utilizzando una soluzione di nitrato d'argento (AgNO₃ 0,2% + formalina 0,2%) con una sensibilità di 0,1 ng di proteina per spot. Sono stati quindi rilavati con H₂O per 2 minuti, sviluppati (Na₂CO₃ 6%+ formalina 0,05% + Na₂S₂O₃ 0,0004%) e bloccata la colorazione (metanolo 50%+ acido acetico 12% per 5 minuti). I gel sono stati poi conservati a 4°C in una soluzione al 1% di acido acetico.

Analisi dei gel

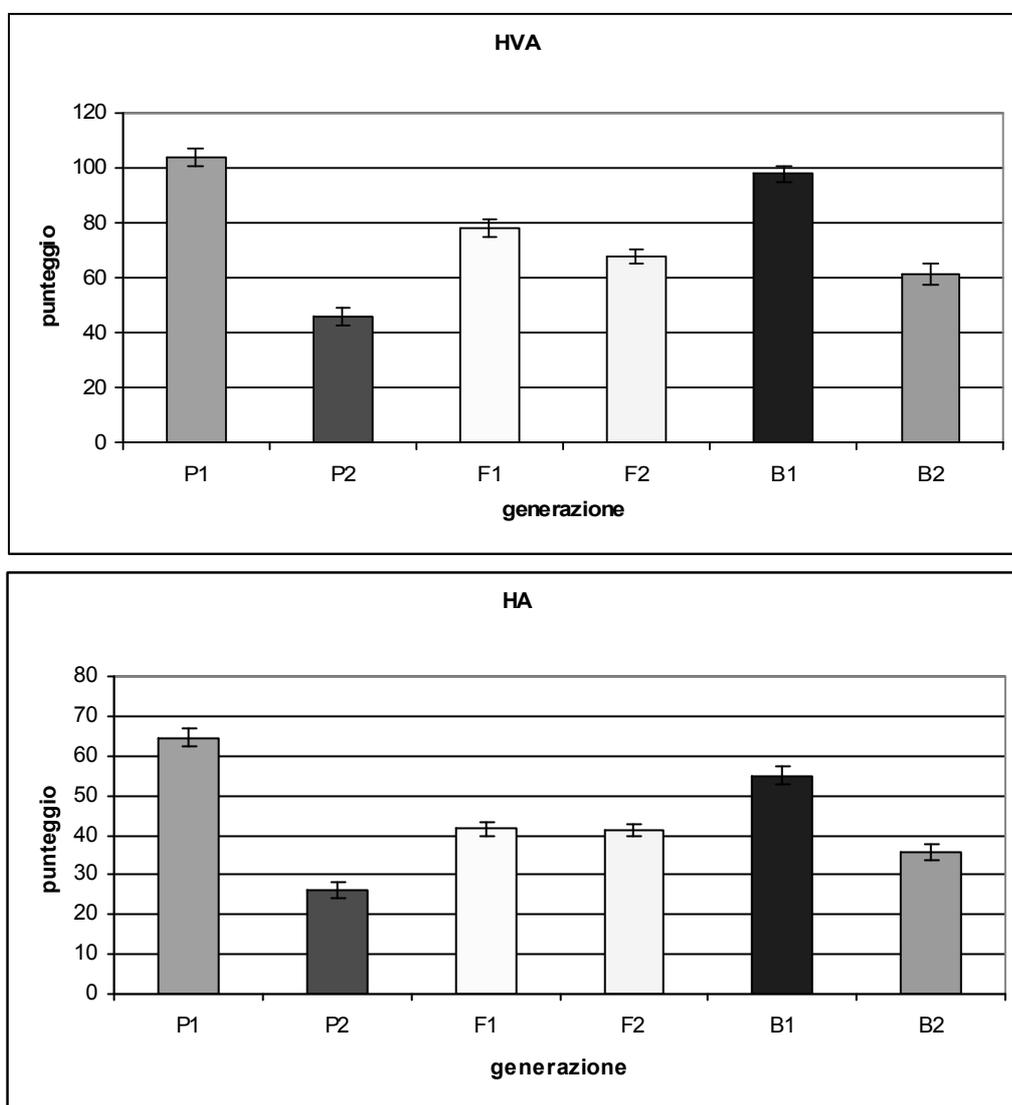
La lettura dei gel è stata eseguita con un sistema Fluore-S Biorad dotato di software specifico per la comparazione di preparati elettroforetici. In particolare l'analisi, realizzata confrontando coppie di gel provenienti dalla medesima area cerebrale delle due linee NHE ed NLE, ha consentito di mettere in evidenza specifici spot proteici presenti esclusivamente in uno solo dei due campioni posti a confronto.

RISULTATI

Incroci mendeliani

Negli ibridi della prima fase dell'esperimento d'incroci mendeliani, ottenuti senza tenere in considerazione il sesso delle due linee parentali NHE (P1) ed NLE (P2), sia il livello di attività totale (HVA) che le sue componenti orizzontale (HA) e verticale (VA) hanno presentato valori intermedi rispetto a quelli dei genitori (Fig.2).

Figura 2



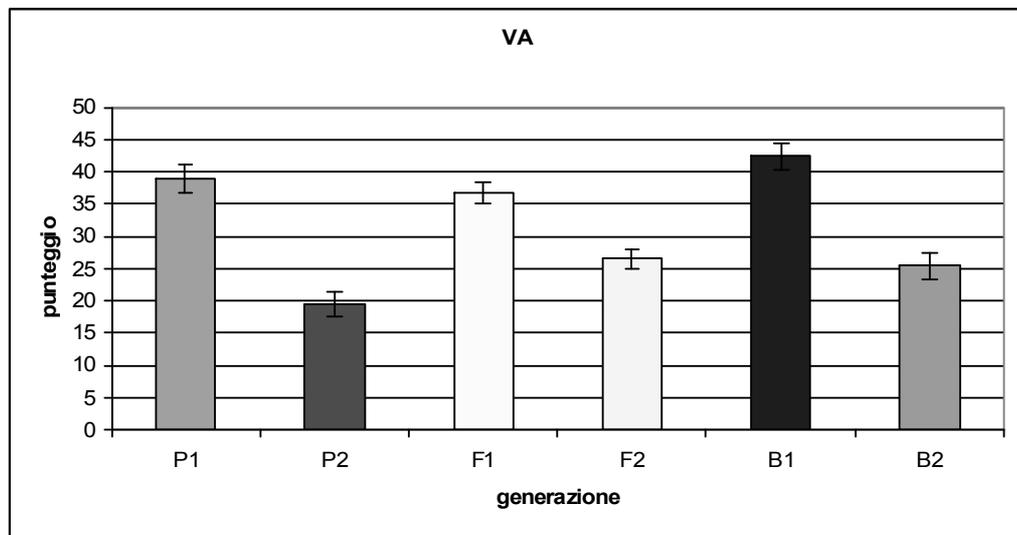


Figura 2. Valori di attività totale (HVA) e sue componenti orizzontale (HA) e verticale (VA) ottenuti nel labirinto di Låt dai ratti della prima fase dell'esperimento d'incroci mendeliani . I dati rappresentano il valore di attività (media \pm err. std della media) registrati per ogni generazione (maschi+femmine) nei primi cinque minuti del test. Per l'analisi statistica relativa fare riferimento al testo.

L'analisi dei dati mediante ANOVA a due fattori (generazione x sesso) evidenziava solo un effetto significativo del fattore generazione (HVA: $F=49.23$, $d.f=5/114$, $p<0.000$; HA: $F=48.17$, $df=5/114$, $p<0.000$; VA: $F=22.50$, $df=5/114$, $p<0.000$) senza effetto d'interazione fra i due fattori. Nessuna differenza significativa veniva evidenziata relativamente al numero di feci emesse dagli animali (indice di stress).

Nella seconda fase dell'esperimento, condotto tenendo questa volta separate le generazioni provenienti dalle diverse combinazioni parentali per evidenziare eventuali coinvolgimenti del sesso nella trasmissione fenotipica, è stata confermata la gradualità di espressione del carattere selezionato e delle sue due componenti (Fig.3).

Figura 3

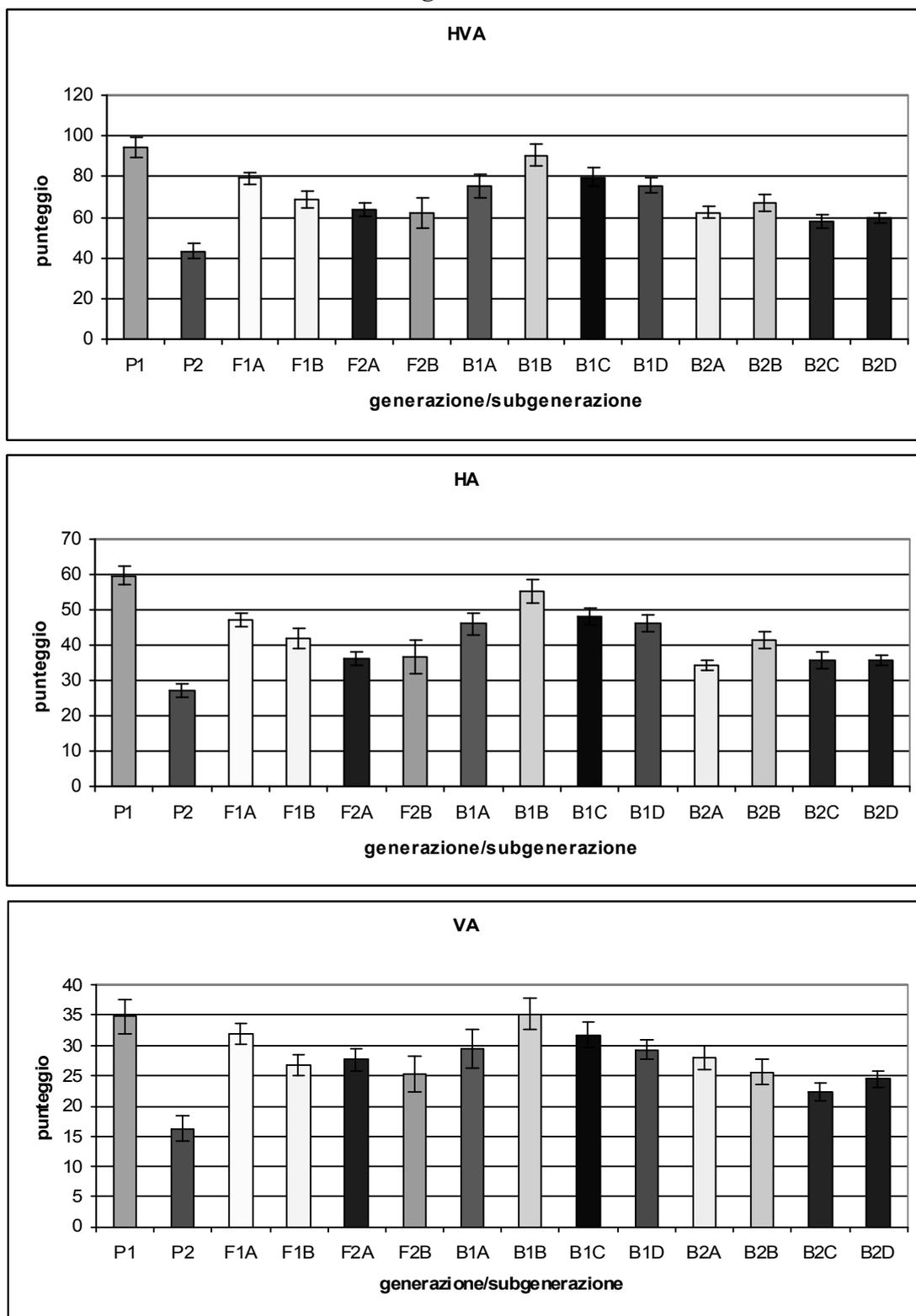


Figura 3. Valori di attività totale (HVA) e sue componenti orizzontale (HA) e verticale (VA) ottenuti nel labirinto di Låt dai ratti della seconda fase dell'esperimento d'incroci mendeliani . Per l'analisi statistica relativa fare riferimento al testo.

Relativamente ai dati di HVA ed HA il test di Levene risultava significativo indicando una disomogeneità delle varianze dei valori delle singole generazioni e pertanto la non applicabilità dei test di statistica parametrica per il loro confronto. Si è proceduto pertanto ad eseguire una serie di confronti mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis che ha confermato la significativa differenza dei punteggi fra le varie generazioni (HVA: $H=88.05$, $df=13$, $p<0.000$; HA: $H=93.84$, $df=13$, $p<0.000$; VA: $H=50.07$, $df=13$, $p<0.000$).

Inoltre è stato rilevato un generalizzato effetto del sesso con le femmine che presentavano generalmente punteggi significativamente superiori ai maschi (Fig.4). Anche in questo caso il test non parametrico di Kruskal-Wallis ha confermato la significativa differenza fra i due sessi (HVA: $H=10.36$, $df=1$, $p<0.002$; HA: $H=7.68$, $df=1$, $p<0.006$; VA: $H=8.42$, $df=1$, $p<0.004$).

Figura 4

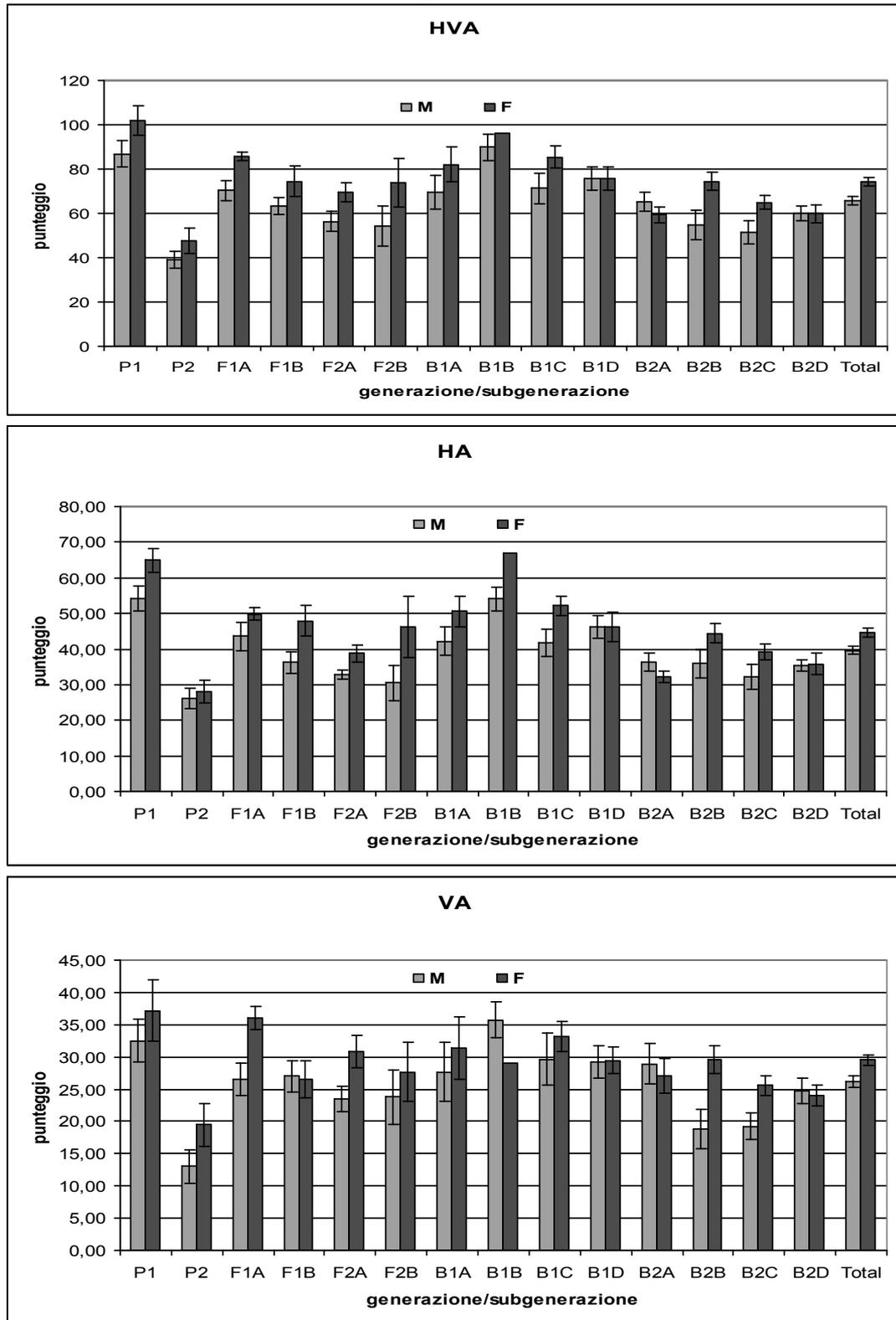


Figura 4. Valori di attività totale (HVA) e sue componenti orizzontale (HA) e verticale (VA), divisi per maschi(M) e femmine(F), ottenuti nel labirinto di Lât dai ratti della seconda fase dell'esperimento d'incroci mendeliani. Per l'analisi statistica relativa fare riferimento al testo.

In questo secondo esperimento l'indice di emozionalità, ovvero il numero delle feci emesse durante il test, risultava significativamente più elevato solo per gli ibridi delle generazioni F2 ($H=55.21$, $df=13$, $p<0.000$; Kruskal-Wallis).

La verifica degli eventuali effetti del sesso dei genitori sulla trasmissione del fenotipo è stata eseguita confrontando fra loro i punteggi all'interno delle differenti subgenerazioni (es. B1A, B1B, B1C e B1D) relativi all'attività totale e alle sue due componenti orizzontale e verticale. E' stata rilevata solo una minima differenza fra le due generazioni F1A e F1B, dove la prima presentava valori di HVA superiori di circa il 10% ($F=4.79$, $df= 1/35$, $p<0.035$; ANOVA), mentre in tutti gli altri casi le diverse subgenerazioni non hanno presentato differenze significative.

L'abitudine a breve termine (STH), ovvero la riduzione percentuale dell'attività degli animali fra i primi ed i successivi 5 minuti di test nel labirinto di Låt, è risultata significativa per tutti i parametri comportamentali considerati in entrambe le fasi dell'esperimento (Fig.5 - HVA: $t = 11.68$, $df=366$, $p<0.000$; HA: $t = 15.00$, $df=366$, $p<0.000$; VA: $t = 3.80$, $df=366$, $p<0.000$; t-test a due code per dati appaiati).

Figura 5

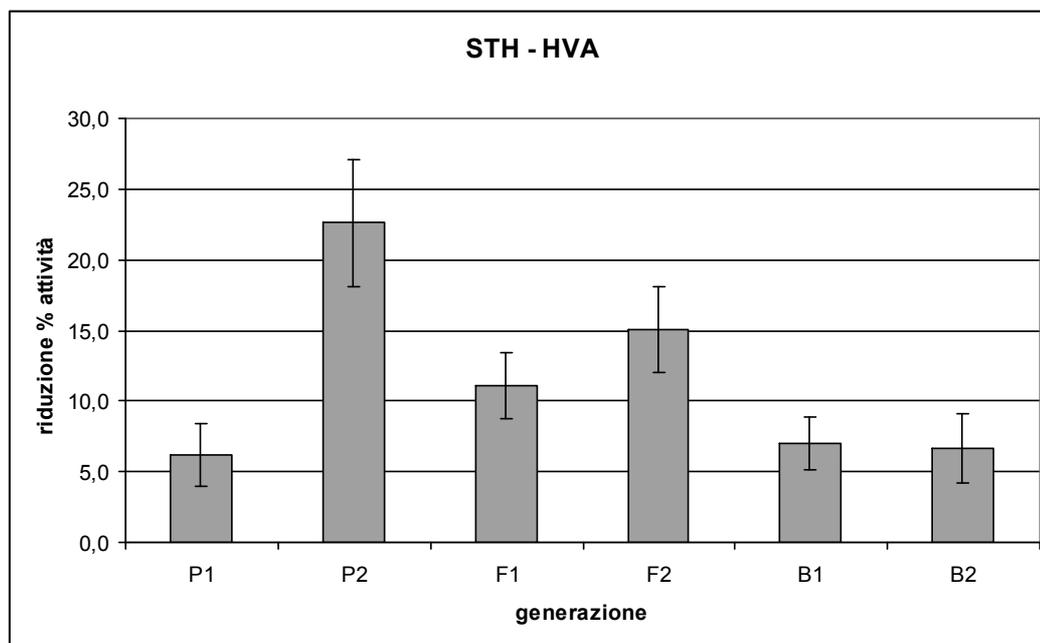


Figura 5. Abitudine a breve termine (STH) misurata nel labirinto di Låt. I dati sono espressi per ogni generazione come riduzione percentuale media dell'attività totale misurata nella seconda parte del test (6-10 min.) vs. quella della prima parte (0-5 min.) . Per l'analisi statistica relativa fare riferimento al testo.

Anche l'abitudine a lungo termine (LTH), ovvero la riduzione dell'attività percentuale degli animali rilevata nei primi 5 minuti fra i due test nel labirinto di Låt eseguiti a distanza di 48 ore, è risultata significativa per tutti i parametri comportamentali considerati per gli animali della seconda fase di incroci mendeliani (Fig.6 - HVA: $t = 7.68$, $df=203$, $p<0.000$; HA: $t = 8.70$; $df=203$, $p<0.000$; VA: $t = 4.67$, $df=203$, $p<0.000$; t-test a due code per dati appaiati).

Figura 6

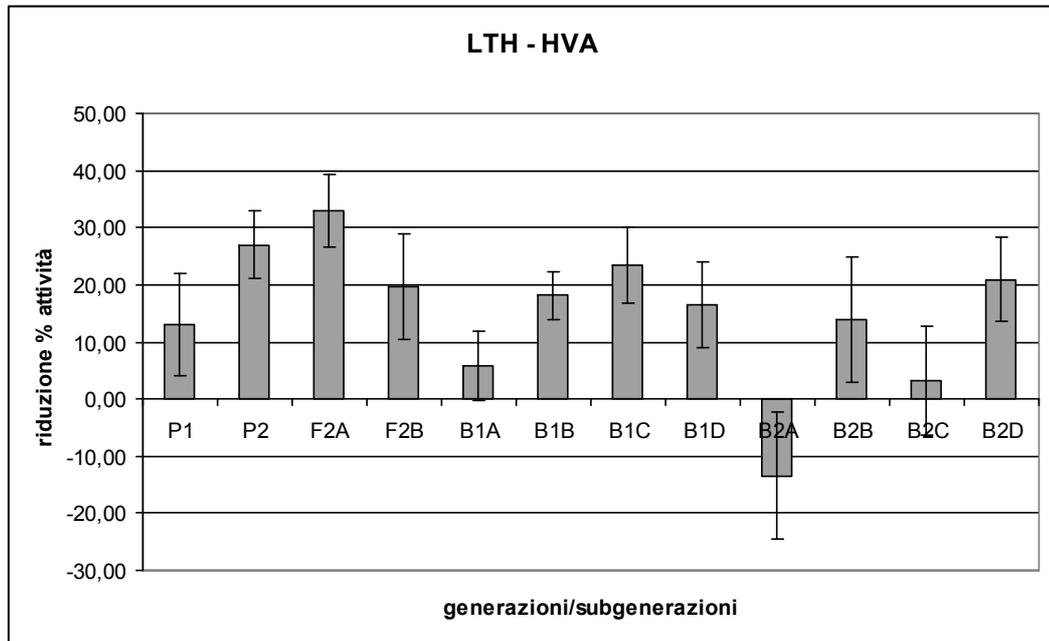


Figura 6. Abitudine a lungo termine (LTH) misurata nel labirinto di Låt. I dati sono espressi per ogni generazione come riduzione percentuale media dell'attività totale misurata nel secondo test (dopo 48 h) vs. quella del primo. Per l'analisi statistica relativa fare riferimento al testo.

Da rilevare l'inversione del profilo rilevata solo nella subgenerazione B2A riconducibile ad un significativo incremento nel secondo test dell'attività dei ratti femmina (+31%).

Ereditabilità

Il grado di ereditabilità del carattere selezionato (HVA) è stato calcolato determinando la regressione fra i valori fenotipici medi dei genitori e quelli della progenie normalizzati secondo il metodo descritto nella sezione materiali e metodi (Fig.7).

Figura 7

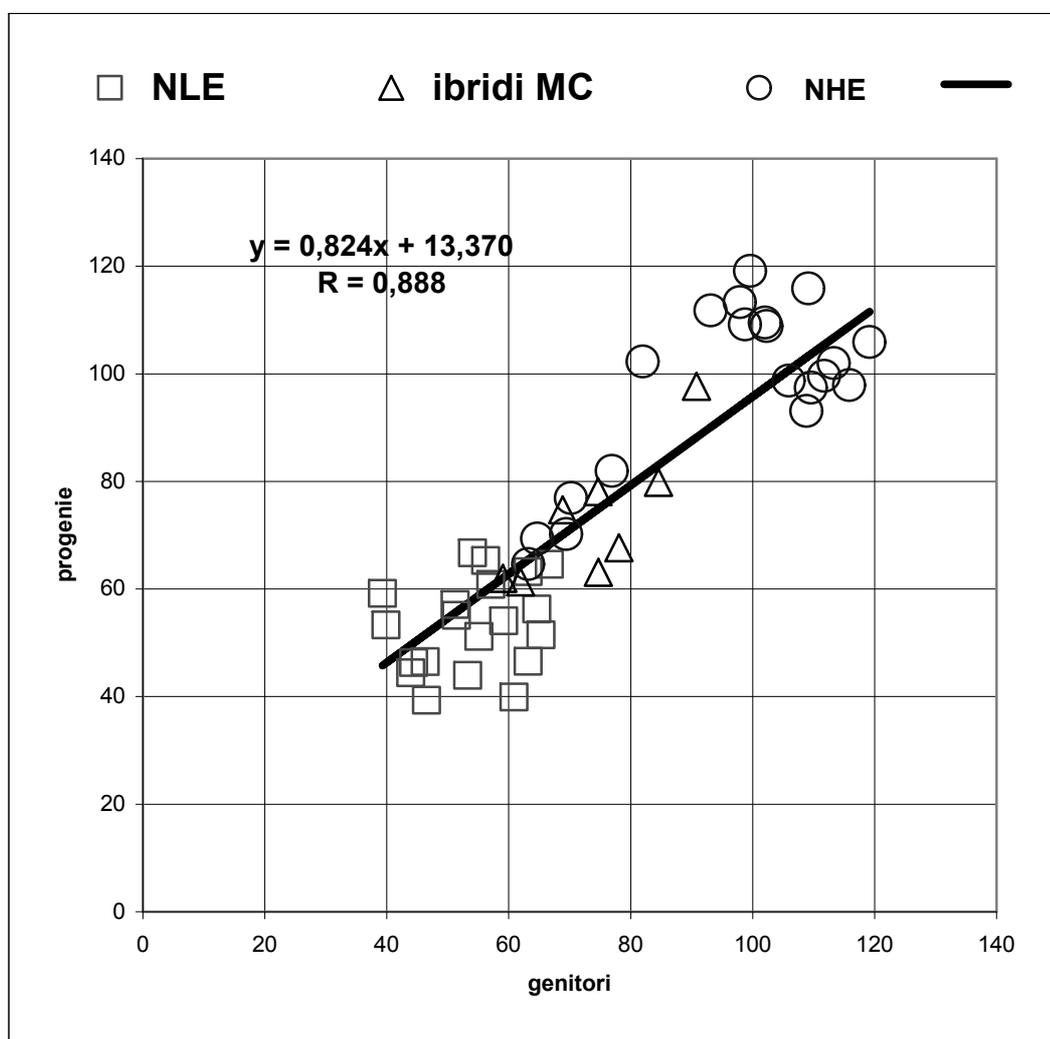


Figure 7. Regressione progenie-genitori calcolata su 20 generazioni di selezione (NLE e NHE) e sugli ibridi degli incroci mendeliani. Nel riquadro è riportata l'equazione della retta d'interpolazione della regressione (il coefficiente angolare rappresenta l'indice di ereditabilità) e il coefficiente di regressione (R). Per l'analisi statistica relativa fare riferimento al testo.

L'indice di ereditabilità calcolato, ovvero il livello di determinazione genetica del carattere, è stato di 0,824, valore molto elevato ed altamente significativo ($p < 0.000$), con un coefficiente di correlazione di 0,888 ($F=5681.9$, $df=1/1528$, $p < 0.000$, coefficiente di Pearson prodotto x momento).

Nella regressione i valori delle due linee parentali si trovano agli estremi della retta d'interpolazione dell'espressione fenotipica mentre quelli degli ibridi provenienti dagli incroci mendeliani si posizionano coerentemente nella parte centrale congiungendo i due estremi.

Ad ulteriore conferma dell'indipendenza dell'ereditabilità del carattere dal sesso, è stata ripetuta la medesima procedura di regressione fra fenotipo parentale e quello della progenie considerando separatamente i maschi e le femmine. Gli indici di ereditabilità così ottenuti sono risultati molto vicini e presentano il medesimo livello di significatività statistica (0.857, $p < 0.000$ per i maschi e 0.808, $p < 0.000$ per le femmine).

Inoltre, utilizzando esclusivamente i dati degli animali degli incroci mendeliani è stato anche calcolato con il medesimo metodo l'indice di ereditabilità relativo alle due componenti dell'attività ottenendo un valore di 0.747 per HA ($p < 0.000$) e di 0.508 per VA ($p < 0.000$).

Analisi quantitativa del carattere ereditario

Prima di procedere con l'analisi quantitativa su tutti i dati provenienti dalle due fasi di incroci mendeliani, come indicato nella sezione materiali e metodi, è stato necessario verificarne l'omogeneità. I dati sono stati innanzitutto confrontati con un'ANOVA fattoriale a due vie (fase sperimentale x generazione) che non ha evidenziato alcuna differenza significativa fra le due serie di dati (assenza di effetti d'interazione fase x generazione). I dati sono stati anche analizzati mettendoli in correlazione per verificare la linearità delle loro distribuzioni ottenendo un valore altamente significativo ($R=0.970$, $df=4$, $p<0.002$ - coefficiente di Pearson prodotto x momento). Questo risultato è stato confermato anche ripetendo l'analisi sulle due singole componenti comportamentali HA e VA ($R=0.965$, $df=4$, $p<0.002$ and $R=0.902$, $df=4$, $p<0.014$ rispettivamente). Le due serie di dati sono state quindi unificate ricalcolando per ogni generazione i valori medi ed i relativi errori standard come riportato in fig. 8.

La normalità e l'omogeneità delle varianze di queste nuove distribuzioni di dati sono state verificate come descritto in precedenza rilevando solo una minima deviazione per i valori di normalità della P1 relativi al HVA e quelli della P2 relativi alla VA.

Figura 8

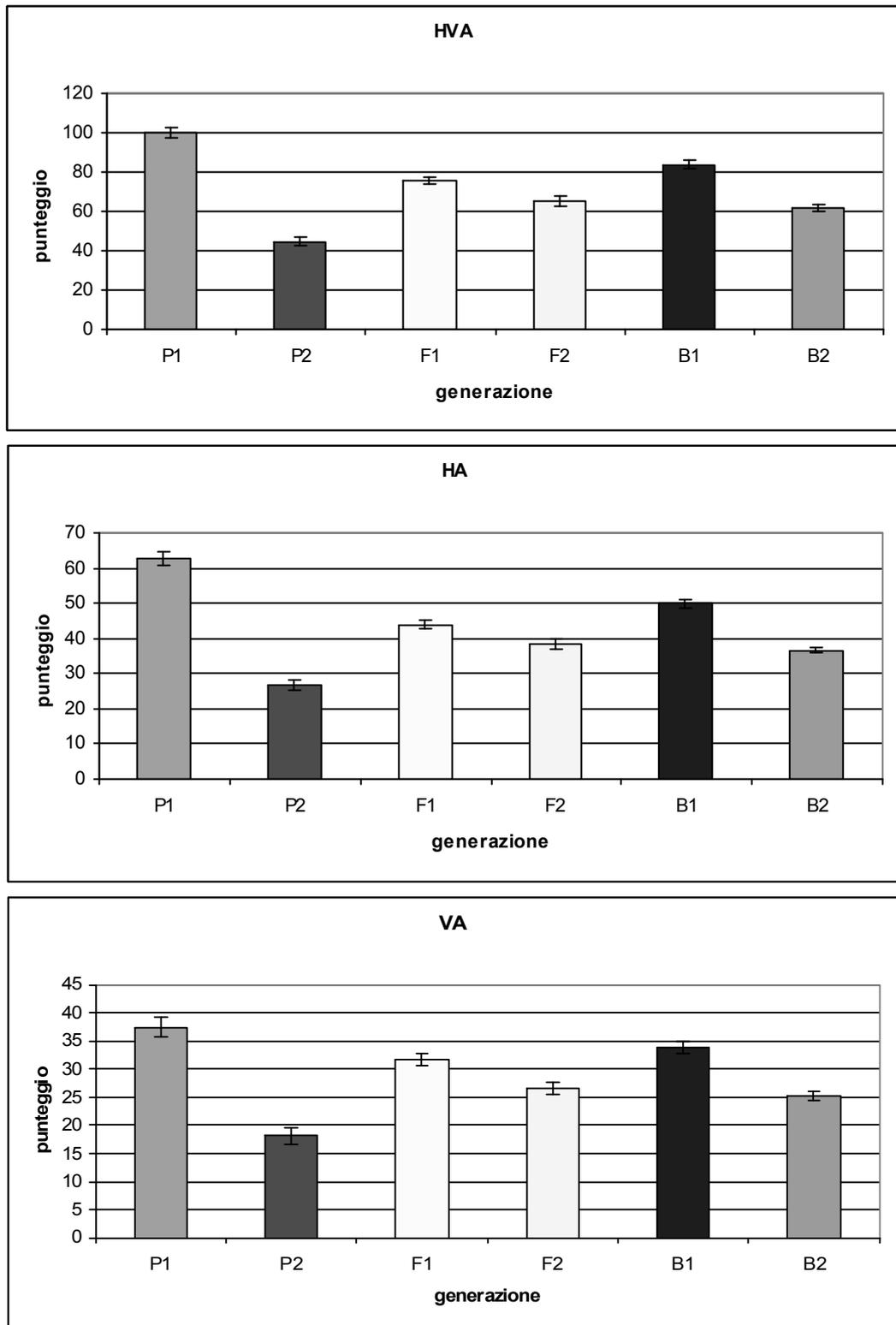


Figura 8. Valori di attività totale (HVA) e sue componenti orizzontale (HA) e verticale (VA) ottenuti combinando insieme le due fasi d'incroci mendeliani. Per l'analisi statistica relativa fare riferimento al testo.

L'analisi eseguita secondo il metodo di "joint-scaling" descritto nella sezione materiali e metodi sui valori di HVA, ha indicato un modello a cinque fattori, ovvero comprensivo di media generale, additività, dominanza e primi due componenti dell'effetto epistatico, come quello che spiega al meglio lo schema di ereditabilità ottenuto negli incroci. I valori così stimati sono riportati nella seguente tabella:

Generazione		P1	P2	F1	F2	B1	B2
Valori sperimentali	Media	100.02	44.78	75.67	65.11	83.83	61.87
	Err. Std.	2.79	2.48	1.97	2.33	2.07	1.50
Valori stimati	Media	100.95	45.50	76.60	67.69	81.80	60.80
	Err. Std.	2.74	2.44	1.90	1.81	1.72	1.37

Per questo modello il valore di χ^2 ottenuto è stato di 3.12, ovvero non significativo, a dimostrazione dell'allineamento fra i dati stimati e quelli reali. Inoltre il decremento del valore χ^2 rispetto al modello precedentemente considerato risultava significativo ($\Delta\chi^2=4.68$, $df=1$, $p<0.05$).

La medesima analisi, ripetuta per i valori di HA, ha confermato il modello a 5 fattori come quello più attendibile ($\Delta\chi^2=7.87$, $df=1$, $p<0.01$) come evidenziato dai valori stimati di seguito riportati:

Generazione		P1	P2	F1	F2	B1	B2
Valori sperimentali	Media	62.67	26.63	43.96	38.52	49.99	36.65
	Err. Std.	1.79	1.41	1.38	1.52	1.24	0.91
Valori stimati	Media	63.22	26.97	44.62	40.12	48.92	36.07
	Err. Std.	1.75	1.39	1.32	1.15	1.05	0.84

Nel caso dell'attività verticale VA la procedura ha invece dato come attendibile un modello più semplice a 3 fattori, ovvero media generale, additività e dominanza ($\Delta\chi^2=6.37$, $df=1$, $p<0.025$):

Generazione		P1	P2	F1	F2	B1	B2
Valori sperimentali	Media	37.40	18.15	31.73	26.59	33.79	25.19
	Err. Std.	1.72	1.42	1.14	1.11	1.12	0.83
Valori stimati	Media	36.12	18.04	31.09	29.09	33.61	24.57
	Err. Std.	1,38	1,14	0,93	0,47	0,70	0,58

I dati sono stati quindi ulteriormente analizzati per individuare dei modelli che fornissero indicazioni anche sul possibile numero di geni coinvolti nella trasmissione del fenotipo. Sulla base dei precedenti risultati è stato deciso di non considerare modelli di trasmissione legati al sesso. Pertanto sono state eseguite analisi di correlazione, secondo la modalità descritta nella sezione materiali e metodi, fra i valori sperimentali di ogni generazione e quelli stimati per ognuno dei 10 modelli presi in considerazione (vedere sez. metodi).

I risultati ottenuti considerando l'attività totale HVA sono riportati nella seguente tabella:

Generazione Valori sperimentali		HVA - Valori stimati per ogni modello									
		1 gene – domin. completa.	1gene – codom.	2geni additivi	3geni additivi	4geni additivi	5geni additivi	1gene additivo+1 epistatico	2 geni additivi+1 epistatico	3 geni additivi+1 epistatico	4 geni additivi+1 epistatico
P1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
P2	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8
F1	75.7	100.0	72.4	72.4	72.4	72.4	72.4	81.6	77.9	76.3	75.5
F2	65.1	86.2	72.4	72.4	72.4	72.4	72.4	72.4	69.6	68.5	67.8
B1	83.8	100.0	86.2	86.2	86.2	86.2	86.2	90.8	89.0	88.2	87.7
B2	61.9	72.4	58.6	58.6	58.6	58.6	58.6	58.6	55.8	54.6	54.0
Coeff. di correlazione		0.901	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.957	0.959	0.9602	0.9601
Livello di significatività		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p>0.040	p>0.040	p<0.040	p<0.040

I modelli con completa dominanza o codominanza e quelli poligenici additivi semplici non hanno evidenziato significativi valori di correlazione con i dati sperimentali. Invece tutti quelli poligenici con controllo epistatico hanno raggiunto livelli di significatività statistica, ed in particolare quello con 3 geni + 1 ha presentato il livello di correlazione maggiore (R=0.960, df=2, p<0.04; coefficiente di Pearson prodotto x momento).

Prendendo in considerazione le singole componenti comportamentali si è confermato un quadro poligenico con controllo epistatico del carattere. Nel caso del HA il modello a 4 geni + 1 che ha fornito il livello di correlazione più elevata (R=0.960, df=2, p<0.04 - coefficiente di Pearson prodotto x momento).

Generazione Valori sperimentali		HA - Valori stimati per ogni modello			
		1gene additivo+ 1epistatico	2 geni additivi+ 1epistatico	3 geni additivi+ 1epistatico	4 geni additivi+ 1epistatico
P1	62.7	62.7	62.7	62.7	62.7
P2	26.6	26.6	26.6	26.6	26.6
F1	44.0	50.7	48.3	47.2	46.6
F2	38.5	44.6	42.8	42.1	41.6
B1	50.0	56.7	55.5	54.9	54.7
B2	36.6	35.6	33.8	33.1	32.6
Coeff. di correlazione		0.950	0.957	0.959	0.960
Livello di significatività		p<0.050	p<0.043	p<0.041	p<0.040

Per l'attività verticale VA il modello meglio correlato è stato quello con 1 gene + 1 di controllo epistatico (R=0.956, df=2, p<0.05, coefficiente di Pearson prodotto x momento).

Generazione Valori sperimentali		VA - Valori stimati per ogni modello				
		1 gene – domin. completa	1gene additivo+ 1epistatico	2 geni additivi+ 1epistatico	3 geni additivi+ 1epistatico	4 geni additivi+ 1epistatico
P1	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4
P2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2
F1	31.7	37.4	31.0	29.7	29.2	28.8
F2	26.6	32.6	27.8	26.8	26.4	26.2
B1	33.8	37.4	34.2	33.6	33.3	33.1
B2	25.2	27.8	23.0	22.0	21.6	21.4
Coeff. di correlazione		0.936	0.956	0.952	0.950	0.948
Livello di significatività		p>0.050	p<0.044	p>0.045	p>0.050	p>0.050

Studio di proteomica cerebrale

Le analisi per elettroforesi bidimensionale, eseguite su pool omogenei di tessuto cerebrale provenienti dalle diverse aree considerate (vedere sezione materiali e metodi) hanno consentito di evidenziare specifiche differenze fra le due linee NHE e NLE. In particolare le differenze di espressione proteica sono state rilevate nella PFC, nello STR, nel HPC e nel MES ma non nel CER e nel HYP come evidenziato nelle figure 9,10,11 e 12 di seguito riportate.

In sintesi nella PFC è stata evidenziata per gli NHE una proteina con punto isoelettrico (p.i). 4.7 e peso molecolare (p.m.) 27 kDa e per gli NLE 4 proteine con p.i. tra 6.4 e 7.4 e p.m. tra 51 e 61 kDa. Nello STR è risultata presente una proteina con p.i. 6.1 e p.m. 73 kDa per gli NHE e 2 proteine con p.i. 7.1 e p.m. da 74 e 81 kDa per gli NLE. Nel HPC si evidenziava una proteina con p.i. 8.0 e p.m.27 kDa per gli NHE e 6 diverse proteine con p.i. da 5.4 a 8.0 con p.m. da 53 a 73 kDa negli NLE. Infine nel MES erano presenti solo per gli NHE 6 proteine con p.i. tra 5.9 e 7.2 p.m.tra 44 e 65 kDa . La sintesi di tali differenze è riportata nella seguente tabella:

	PFC	STR	HPC	MES
NHE	27 kDa pI 4.7	73 kDa pI 6.1	27 kDa pI 8.0	65 kDa pI 7.2 62 kDa pI 6.9 57 kDa pI 6.3 57 kDa pI 5.9 44 kDa pI 6.9 44 kDa pI 6.3
NLE	61 kDa pI 7.4 57 kDa pI 6.7 51 kDa pI 6.7 51 kDa pI 6.4	81 kDa pI 7.1 74 kDa pI 7.1	73 kDa pI 8.0 73 kDa pI 7.1 70 kDa pI 7.7 70 kDa pI 6.5 54 kDa pI 5.4 53 kDa pI 6.5	

Figura 9

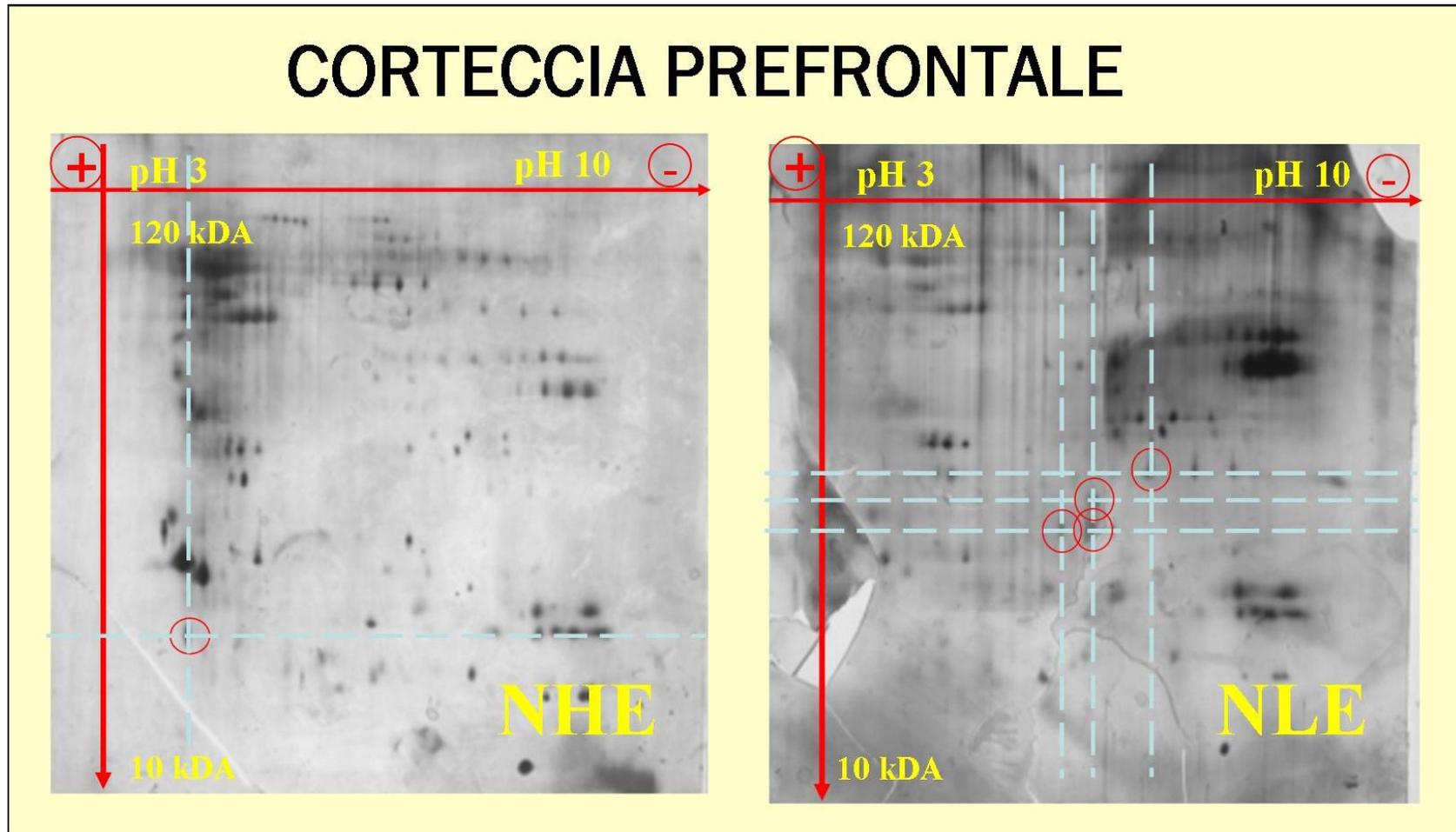


Figura 9. Confronto delle mappe proteiche per elettroforesi bidimensionale ottenute da campioni di corteccia prefrontale di ratti NHE (sx) e NLE (dx). Le proteine sono state separate prima in gradiente di pH (asse ascisse- intervallo 3-10) e quindi per peso molecolare (asse ordinate – range 10-120 kDa). I cerchi rossi evidenziano le principali differenze riscontrate.

Figura 10

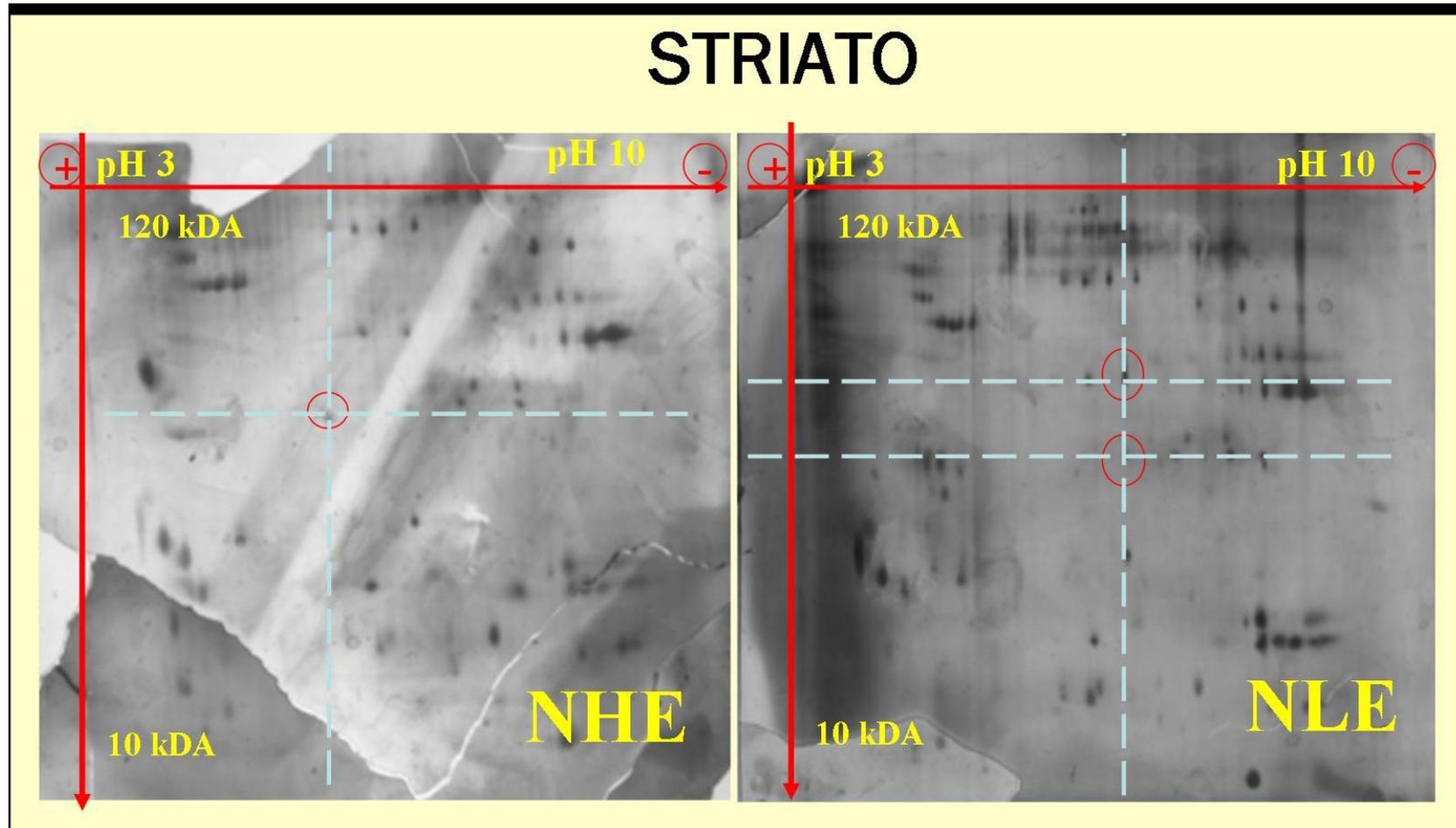


Figura 10. Confronto delle mappe proteiche ottenute per elettroforesi bidimensionale da campioni di striato di ratti NHE (sx) e NLE (dx). Le proteine sono state separate prima in gradiente di pH (asse ascisse- intervallo 3-10) e quindi per peso molecolare (asse ordinate – range 10-120 kDa). I cerchi rossi evidenziano le principali differenze riscontrate.

Figura 11

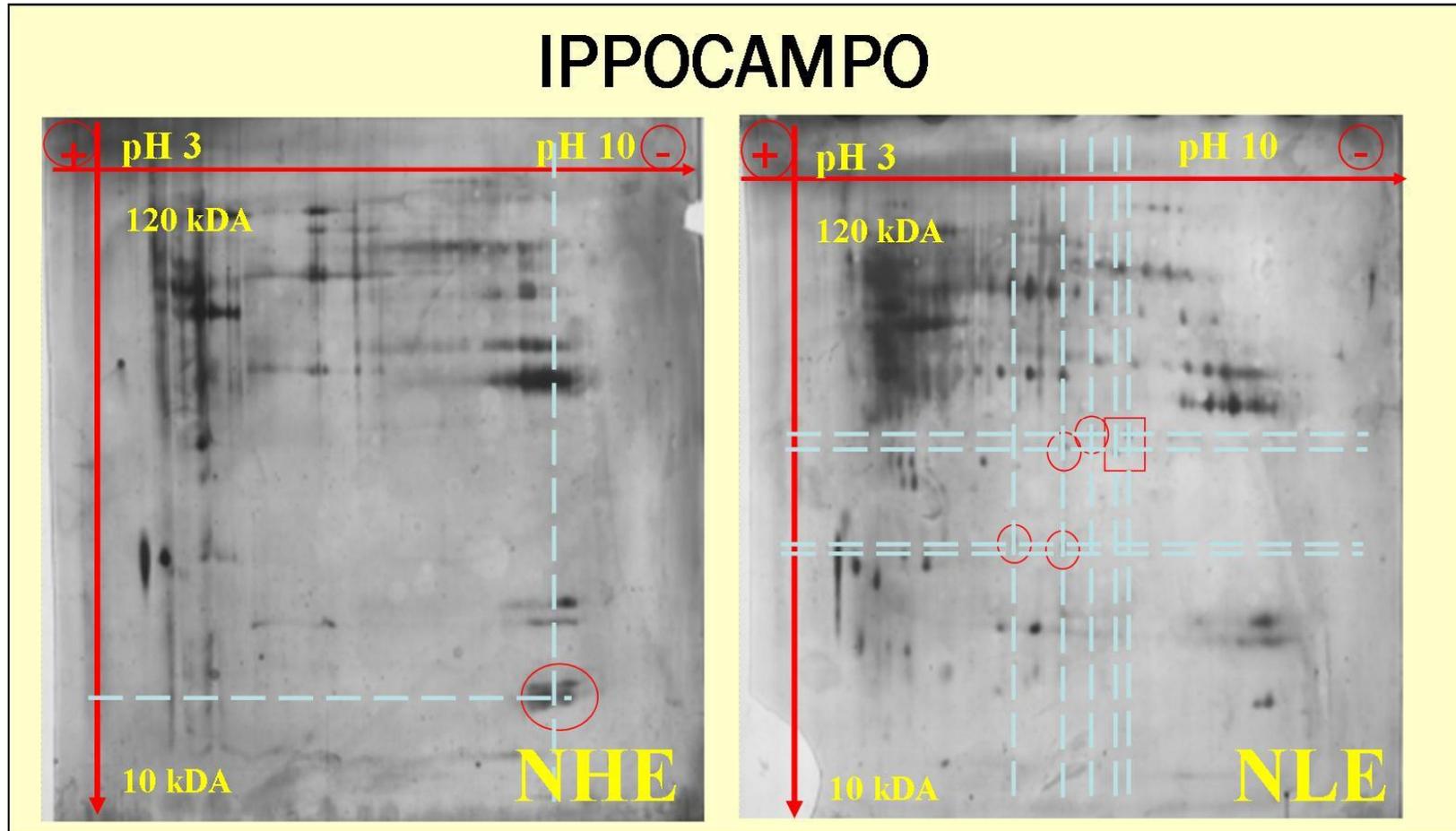


Figura 11. Confronto delle mappe proteiche ottenute per elettroforesi bidimensionale da campioni di ippocampo di ratti NHE (sx) e NLE (dx). Le proteine sono state separate prima in gradiente di pH (asse ascisse- intervallo 3-10) e quindi per peso molecolare (asse ordinate – range 10-120 kDa). I cerchi rossi evidenziano le principali differenze riscontrate.

Figura 12

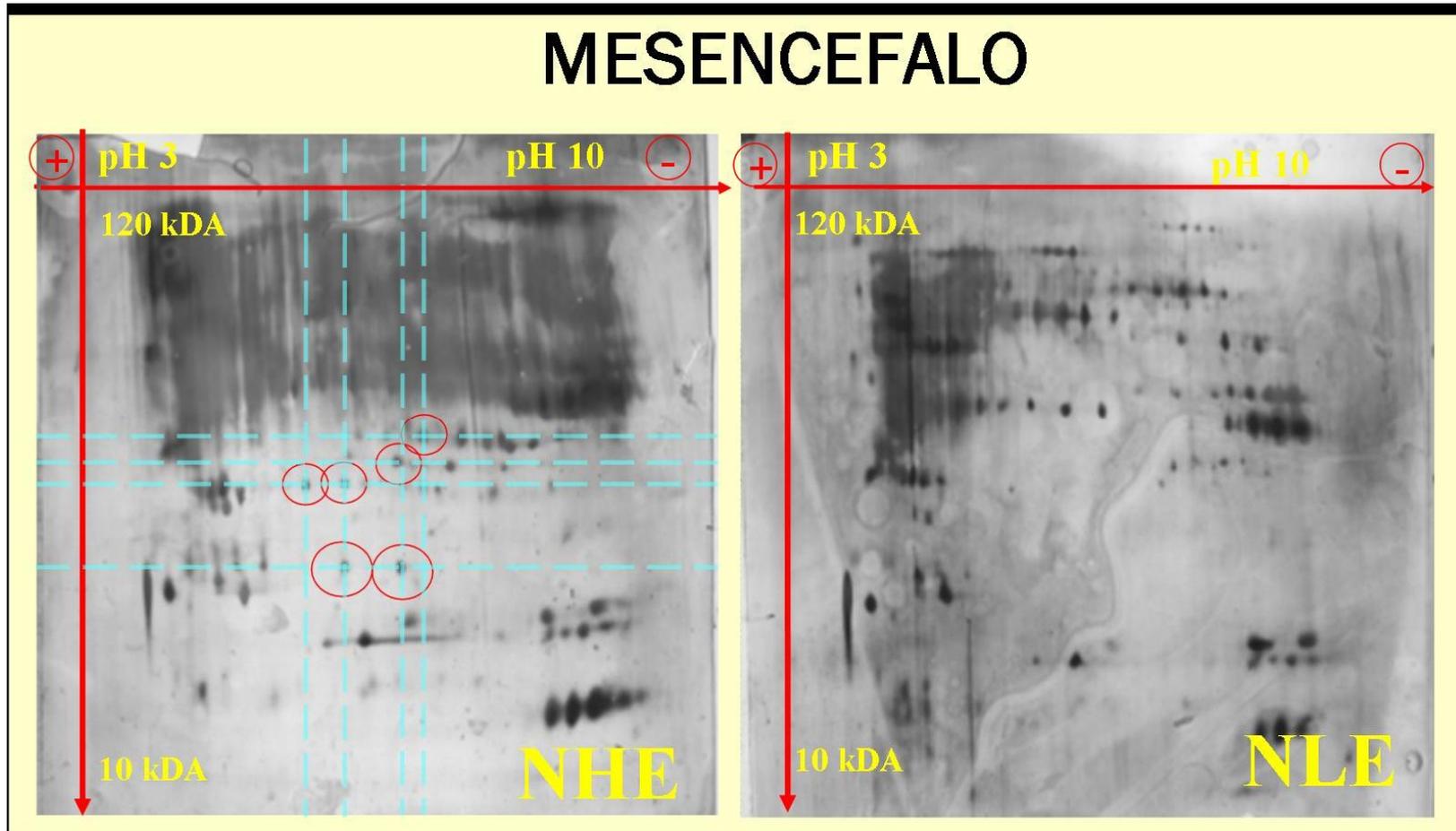


Figura 12. Confronto delle mappe proteiche ottenute per elettroforesi bidimensionale da campioni di mesencefalo di ratti NHE (sx) e NLE (dx). Le proteine sono state separate prima in gradiente di pH (asse ascisse- intervallo 3-10) e quindi per peso molecolare (asse ordinate – range 10-120 kDa). I cerchi rossi evidenziano le principali differenze riscontrate.

DISCUSSIONE

Il primo obiettivo della nostra ricerca era quello di studiare gli schemi ereditari di un carattere comportamentale alterato, quale l'iperattività dei ratti NHE, e definirne il relativo grado di ereditabilità. Partendo dall'ipotesi più semplice, ovvero che il carattere selezionato fosse ereditabile senza influenze dirette del sesso, è stata realizzata la prima fase di incroci mendeliani dalla quale è emersa la distribuzione continua del tratto a testimonianza della determinazione quantitativa del fenotipo comportamentale analizzato. Con la seconda fase d'incroci mendeliani è stato poi possibile escludere il coinvolgimento del sesso nel meccanismo di trasmissione del carattere. Infatti l'assenza di significative differenze fra le subgenerazioni ottenute dalle diverse combinazioni linea-sesso dei genitori e la confrontabilità degli indici di ereditabilità calcolati separatamente per i due sessi rappresentano una significativa conferma dell'indipendenza del fenotipo dal sesso. Tale risultato potrebbe sembrare in contrasto con la distribuzione maschi-femmine di 4 a 1, tipicamente riscontrata per l'ADHD nell'uomo. Va tenuto conto però che i ratti NHE sono un modello semplificato di tale sindrome nei quali, contrariamente all'uomo, lo stato di alterazione comportamentale permane nell'età adulta.

Nelle femmine, tuttavia, è stato riscontrato un livello di attività esplorativa più elevato rispetto a quello dei maschi, indipendentemente dalla generazione di appartenenza. Inoltre, considerando le minori dimensioni corporee delle femmine rispetto ai maschi, le distanze relative percorse dalle femmine nel labirinto di Làt,

sono da considerarsi ancora maggiori di quanto evidenziato con il semplice conteggio dell'attività HA in termini di numero di angoli attraversati. Questo fenomeno potrebbe essere in relazione per esempio con il livello di estrogeni che può modificare il comportamento come già rilevato da altri studi (Papalexi et al., 2005) (Tropp et al., 2005).

La determinazione genetica del carattere selezionato risulta molto elevata come dimostrato dal valore di 0.824 del coefficiente di ereditabilità h^2 (Falconer, 1960) determinato utilizzando i valori di attività totale HVA rilevati nel labirinto di Låt. Da notare come tale livello di ereditabilità, pari al 82,4%, ricada nell'intervallo di determinazione genetica stimato per l'ADHD nell'uomo (Waldman I and Rhee S, 2002).

L'indice HVA rappresenta la somma delle due componenti comportamentali orizzontale (HA) e verticale (VA) alle quali viene attribuito un significato rispettivamente cognitivo e non-cognitivo (Gironi Carnevale et al., 1990; Damasio, 1994). E' quindi interessante sottolineare come i coefficienti di ereditabilità, calcolati separatamente per le due componenti utilizzando esclusivamente i dati degli ibridi mendeliani, risultino diversi con quello relativo ad HA nettamente superiore all'altro.

In sintesi, considerando il comportamento come il risultato dell'attività di circuiti cerebrali sottoposti a continui rimodellamenti da parte di fattori epigenetici (Sadile et al., 1986), possiamo ritenere che le linee di ratti NHE e NLE presentino una forte predeterminazione genetica per interagire con gli stimoli ambientali realizzando differenti circuiti cerebrali e quindi diverse risposte comportamentali.

Tale predeterminazione sarebbe più evidente per quelle componenti a carattere cognitivo e meno per quelle non cognitive più influenzate dall'emozione.

Il nostro secondo obiettivo era quello di stimare con la maggiore approssimazione possibile un modello genico a supporto dello schema ereditario precedentemente evidenziato. A tal scopo si è proceduto all'analisi dei dati complessivi delle due fasi d'incroci mendeliani utilizzando due approcci differenti: la procedura di "joint-scaling" messa a punto da Lynch e Walsh (Lynch and Walsh, 1998) e un'analisi dei coefficienti di regressione tra dati sperimentali e valori teorici calcolati per alcuni modelli genetici di base. Questi ultimi includevano modelli semplici monogenici con dominanza o codominanza e poligenici con e senza controllo epistatico.

Entrambi gli approcci hanno indicato un modello poligenico con controllo epistatico come quello che meglio spiegava l'ereditabilità del tratto HVA oggetto della selezione. Questo risultato è coerente con altre ricerche che hanno messo in luce il controllo di tipo poligenico di caratteri di tipo comportamentale nell'uomo (Lander and Schork, 1994) ed in modelli animali (Mormede et al., 2002) (Wright et al., 2006). Inoltre le medesime analisi, ripetute per le singole componenti comportamentali HA e VA, hanno evidenziato come la trasmissione ereditaria della prima sia legata a modelli complessi, simili a quelli individuati per HVA, mentre la seconda può essere spiegata con modelli relativamente più semplici. Questo ha confermato il diverso controllo genetico delle due componenti legate rispettivamente ad aspetti cognitivi e non-cognitivi del comportamento già

evidenziato da altri studi (Van Abeelen, 1970) (Sanders, 1981) (Gironi Carnevale et al., 1990) (Damasio, 1994).

Infine nella terza fase del nostro studio abbiamo cercato d'individuare nel cervello degli animali degli indicatori molecolari correlabili con il tratto comportamentale ereditato. E' stata così evidenziata, mediante elettroforesi bidimensionale, l'espressione selettiva di specifiche sequenze proteiche in diverse regioni cerebrali delle due linee di ratti Naples. Tali differenze, coerentemente con quanto trovato in precedenti studi di istochimica e biologia molecolare eseguiti prevalentemente sulla linea NHE (Viggiano et al., 2003), sono presenti nelle principali regioni coinvolte nel controllo del comportamento in generale e di suoi specifici aspetti quali l'orientamento e la memoria spaziale. Inoltre i valori di peso molecolare evidenziati dalla nostra analisi coincidono in molti casi con quelli di alcuni componenti del sistema dopaminergico, quali DAT e recettori per DA (Rajput et al., 2009; Ciliax et al., 1995), il cui coinvolgimento risulta già noto in sindromi comportamentali come l'ADHD (vedere per una review (Gizer et al., 2009)) e più in generale nell'iperattività in vari modelli animali (Giros et al., 1996; Rubinstein et al., 1997). In generale il quadro che emerge sembra coerente con quanto già noto relativamente all'alterazione della branca mesocorticale dopaminergica dei ratti NHE sia in termini di localizzazioni che di componenti interessate. L'estensione di tali differenze anche allo striato potrebbe essere legata ad un'alterazione di tipo secondario indotta dalla disfunzione mesocorticale. Sarà comunque opportuno approfondire la caratterizzazione di tali proteine mediante

successive analisi (spettrometria di massa per es.) per consentirne l'univoca caratterizzazione.

In conclusione i risultati confermano l'attendibilità e la stabilità genetica dei ratti Naples High-Excitability come modello animale della variante mesocorticale dell'ADHD e rendono plausibile la futura identificazione di specifici markers molecolari cerebrali correlati con l'alterazione comportamentale tipica di questa linea di ratti.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la Dott.ssa Lucia Ruocco per il costante e significativo contributo alla conservazione delle linee di ratti Naples e il Prof. Bruno Variale e la Dott.ssa Teresa Esposito per il significativo contributo alla fase di preparazione ed analisi mediante elettroforesi bidimensionale dei campioni di tessuto cerebrale.

RIASSUNTO

I ratti Naples High Excitability (NHE) sono uno dei modelli animali ad oggi disponibili per studiare patologie neuropsichiatriche quali la sindrome da deficit di attenzione e iperattività (ADHD). In questo studio sono stati utilizzati ratti delle linee NHE ed NLE (Low Excitability), che presentano rispettivamente un fenotipo iper ed ipo attivo quando posti in un ambiente nuovo, per evidenziare i meccanismi di controllo genetico del relativo tratto comportamentale. Una serie di incroci mendeliani fra le due linee NHE ed NLE ha evidenziato che il carattere comportamentale selezionato si distribuisce con continuità nella discendenza e presenta un'elevata determinazione genetica. In particolare è stato dimostrato che:

1. il fenotipo selezionato (iperattività) è un carattere di tipo quantitativo che varia con continuità negli ibridi ottenuti dai vari incroci;
2. mediante incroci selettivi per sesso/linea è stata esclusa una trasmissione del carattere legata al sesso;
3. le femmine presentano, indipendentemente dal genotipo, livelli di attività superiori;
4. il coefficiente di ereditabilità del carattere è dell' 82,4% ;
5. utilizzando due diversi metodi di analisi quantitativa si è arrivati a definire per il tratto selezionato (attività totale) e per la sua componente di attività orizzontale (HA) un modello poligenico con controllo epistatico , mentre per la componente di attività verticale (VA) è stato evidenziato un modello più semplice.

Inoltre, allo scopo di verificare se la differenza fenotipica fosse correlata con una diversa distribuzione delle proteine nelle principali aree cerebrali coinvolte nel tratto comportamentale considerato, si è proceduto ad uno studio di proteomica cerebrale. A tale scopo, sono stati prelevati cervelli da ratti delle due linee studiate isolando la corteccia prefrontale (PFC), lo striato (STR), l'ippocampo (HPC), il mesencefalo (MES), l'ipotalamo (HYP) e il cervelletto (CE) ed eseguendo sui relativi campioni un'analisi di distribuzione proteica per elettroforesi bidimensionale. In particolare tale analisi ha evidenziato nella PFC per gli NHE una proteina con punto isoelettrico (p.i). 4.7 e peso molecolare (p.m.) 27 kDa e per gli NLE 4 proteine con p.i. tra 6.4 e 7.4 e

p.m. tra 51 e 61 kDa. Nel STR è risultata presente una proteina con p.i. 6.1 e p.m. 73 kDa per gli NHE e 2 proteine con p.i. 7.1 e p.m. da 74 e 81 kDa per gli NLE. Nel HPC si evidenziava una proteina con p.i. 8.0 e p.m. 27 kDa per gli NHE e 6 diverse proteine con p.i. da 5.4 a 8.0 con p.m. da 53 a 73 kDa negli NLE. Infine nel MES erano presenti solo per gli NHE 6 proteine con p.i. tra 5.9 e 7.2 p.m. tra 44 e 65 kDa. Nessuna differenza è stata invece riscontrata nel HYP e nel CE.

In sintesi, sulla base dei risultati ottenuti, si è arrivati alle seguenti considerazioni:

1. L'elevato indice di ereditabilità del fenotipo iperattivo riscontrato nei ratti (82.4%) è coerente con quello stimato per l'uomo relativamente all'ADHD
2. Il controllo poligenico del tratto comportamentale coincide con quanto già noto relativamente all'ereditabilità di caratteri di tipo comportamentale nell'uomo ed in altri modelli animali.
3. Molti dei pesi molecolari delle proteine selettivamente espresse nelle due linee di ratti ed evidenziate dall'analisi per elettroforesi bidimensionale coincidono con quelli dei principali componenti del sistema dopaminergico mesocorticale, ovvero i recettori per la dopamina e il suo trasportatore DAT. Questo sembrerebbe coerente con quanto già noto relativamente alle alterazioni funzionali di tale sistema nei ratti NHE. Inoltre alterazioni dei recettori per la dopamina e del DAT sono già state messe in relazione con l'ADHD nell'uomo e più in generale con l'iperattività in vari modelli animali.

In conclusione i risultati confermano l'attendibilità e la stabilità genetica dei Naples High-Excitability come modello animale dell'ADHD e rendono plausibile la futura identificazione di specifici markers molecolari cerebrali correlati con l'alterazione comportamentale tipica di questa linea di ratti.

BIBLIOGRAFIA

1. American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Health, Fourth Edition. Washington, DC.
2. Bentivoglio M, Morelli M (2005) The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. In: Handbook of chemical neuroanatomy (Dunnett SB, Bentivoglio M, Bjorklund A, Hokfelt T, eds), pp 1-107. Elsevier.
3. Buzsaki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325-340.
4. Cerbone A, Pellicano MP, Sadile AG (1993) Evidence for and against the Naples high- and low-excitability rats as genetic model to study hippocampal functions. *Neurosci Biobehav Rev* 17:295-303.
5. Chozick BS (1983) The behavioral effects of lesions of the hippocampus: a review. *Int J Neurosci* 22:63-80.
6. Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, Niznik HB, Levey AI (1995) The dopamine transporter: Immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci* 15:1714-1723.
7. Damasio AR (1994) *Descartes'error - Emotion, reason, and human brain*. Putnam Publishing.
8. Eysenck HJ, Broadhurst PL (1964) Experiments with animals: Introduction. In: *Experiments in motivation* (Eysenck HJ, ed), pp 285. Oxford: Pergamon Press.
9. Falconer DS (1960) *Introduction to Quantitative Genetics*. Edinburgh: Oliver & Boyd.
10. Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J (2003) The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2:104-113.
11. Fresiello A, Grammatikopolus G, Pignatelli M, Sadile AG (2002) Environmental factors during post natal period modify activity and non selective attention in the Naples high excitability rat. *Behavioral Brain Research* 130 :111-115.

12. Gironi Carnevale UA, Vitullo E, Sadile AG (1990) Post-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioral responses to novelty in the rat. *Behav Brain Res* 39(2):187-195.
13. Gironi Carnevale UA, Vitullo E, Varriale B, Ruocco LA, Sadile AG (2007) A classical mendelian cross-breeding study of the Naples high and low excitability rat lines. *Behav Brain Res* 183:130-140.
14. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. pp 606-612.
15. Gizer IR, Ficks C, Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126:51-90.
16. Herbert B (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20:660-663.
17. Hölm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6:65-70.
18. Holmes A, le Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C (2005) Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1335-1346.
19. Kieling C, Goncalves RR, Tannock R, Castellanos FX (2008) Neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17:285-307, viii.
20. Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-2048.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Pholin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
22. Lynch M, Walsh B (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland (USA): Sinauer Associates Inc.
23. Mercuri NB, Bernardi G (2005) The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci* 26:341-344.
24. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
25. Mormede P, Moneva E, Bruneval C, Chaouloff F, Moisan MP (2002) Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. *Genes Brain Behav* 1:111-116.

26. Oades RD, Sadile AG, Sagvolden T, Viggiano D, Zuddas A, Devoto P, Aase H, Johansen EB, Ruocco LA, Russell VA (2005) The control of responsiveness in ADHD by catecholamines: evidence for dopaminergic, noradrenergic and interactive roles. *Dev Sci* 8:122-131.
27. Olanow CW, et al. (2004) Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov Disord* 19:997-1005.
28. Papalexi E, Antoniou K, Kitraki E (2005) Estrogens influence behavioral responses in a kainic acid model of neurotoxicity. *Horm Behav* 48:291-302.
29. Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press.
30. Pisani A, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2005) Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease. *Mov Disord* 20:395-402.
31. Rajput PS, Kharmate G, Somvanshi RK, Kumar U (2009) Colocalization of dopamine receptor subtypes with dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) in rat brain. *Neurosci Res* 65:53-63.
32. Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, Grandy DK (1997) Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90:991-1001.
33. Ruocco L.A., Gironi Carnevale U.A., Sadile A., Valentini V., Di Chiara G (2006) Differential Opioid Mediated DA Release in the N. Accumbens Core and Shell of the Naples Rat Lines: a Behavioural and Microdialysis Study. *Monitoring Molecules In Neuroscience - 11th International Conference on In Vivo Methods - May 19-22 2006*.
34. Sadile AG, Cerbone A, Grimaldi A, Manzi G, Cioffi LA (1986) Postnatal brain growth and behavior: evaluation of environmental factors. *Bibl Nutr Diet* 38:194-205.
35. Sanders DC (1981) The Bethlem lines: genetic selection for high and low rearing activity in rats. *Behav Genet* 11:491-503.
36. Schicknick H, Hoffmann HJ, Schneider R, Crusio WE (1993) Genetic analysis of isolation-induced aggression in the mouse. III. Classical cross-breeding analysis of differences between two closely related inbred strains. *Behav Neural Biol* 59:242-248.
37. Schmitz S, Mrazek DA (2001) Genetic and environmental influences on the associations between attention problems and other problem behaviors. *Twin Res* 4:453-458.

38. Sergeant JA, Geurts H, Huijbregts S, Scheres A, Oosterlaan J (2003) The top and the bottom of ADHD: a neuropsychological perspective. *Neurosci Biobehav Rev* 27:583-592.
39. Solanto MV (1998) Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behavioral Brain Research* 94:127-152.
40. Solanto MV (2002) Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res* 130:65-71.
41. Tropp J, Figueiredo CM, Markus EJ (2005) Stability of hippocampal place cell activity across the rat estrous cycle. *Hippocampus* 15:154-165.
42. Van Abeelen JHF (1970) Genetics of rearing behavior in mice. *Behav Genet* 1:71-76.
43. Vanderwolf CH (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movements in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26:407-418.
44. Viggiano D, Sadile AG (2000) Hypertrophic A10 dopamine neurons in a rat model of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Neurorep* 11:3677-3680.
45. Viggiano D, Vallone D, Welzl H, Sadile AG (2002) The Naples high-and low excitability rats: selective breeding, behavioral profile, morphometry and molecular biology of the mesocortical dopamine system. *Behav Genet* 32:315-333.
46. Viggiano D, Vallone D, Ruocco LA, Sadile AG (2003) Behavioural, pharmacological, morpho-functional molecular studies reveal a hyperfunctioning mesocortical dopamine system in an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 27:683-689.
47. Viggiano D, Vallone D, Sadile AG (2004) Dysfunctions in the dopamine systems and ADHD: evidences from animals and modeling. *Neural Plast* 11:93-116.
48. Waldman I, Rhee S (2002) Behavioral and molecular genetic studies. In: *Hyperactivity and Attention Disorders of childhood*, 2nd edn. (Sandberg S, ed), pp 290-335. New York: Wiley.
49. Whishaw IQ, Vanderwolf CH (1973) Hippocampal EEG and behavior: changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav Biol* 8:461-484.

50. Wolfer DP, Lipp HP (2000) Dissecting the behaviour of transgenic mice: is it the mutation, the genetic background, or the environment? *Exp Physiol* 85:627-634.
51. Wright D, Nakamichi R, Krause J, Butlin RK (2006) QTL analysis of behavioral and morphological differentiation between wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Genet* 36:271-284.