

PATOGENESI DELLA MALATTIA DI HUNTINGTON

Huntington's disease pathogenesis

RENATA LONIGRO¹, ELISA BREGANT², GIUSEPPE DAMANTE³,
PAOLO BERGONZI⁴, BRUNO LUCCI⁵

1. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Udine Istituto di Genetica, A. O. U. di Udine; 2. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Udine; 3. Istituto di Genetica, A. O. U. di Udine; 4. Dipartimento Interaziendale di Neurologia, A. O. U. di Udine; 5. Primario Neurologo Emerito Pordenone

RIASSUNTO

La malattia di Huntington è una patologia ereditaria, a trasmissione autosomica dominante, progressivamente invalidante e caratterizzata da corea, movimenti involontari e disfunzioni cognitive. In questo articolo vengono riassunti i progressi fatti dalla ricerca dal 1993, anno della scoperta del gene responsabile, ad oggi, in termini di comprensione dei meccanismi patogenetici alla base della patologia. In questi anni di intensa ricerca sulla malattia di Huntington, considerevole è stato il contributo alla conoscenza apportato dai modelli animali e cellulari della patologia. Il loro studio infatti, coadiuvato dallo studio istopatologico di soggetti affetti dalla malattia, ha permesso il chiarimento di molteplici meccanismi di disfunzione cellulare neuronale che si instaurano nei soggetti portatori di mutazione ed evolvono fino alla morte. La review riassume le informazioni acquisite riguardo ai principali meccanismi di neurodegenerazione. La mutazione genica induce la produzione di una proteina mutante, l'Huntingtina, che innesca meccanismi di tossicità cellulare compromettendo processi vitali della cellula nervosa come: endocitosi, trasporto intraneurale, regolazione trascrizionale dei geni, segnalazione post-sinaptica, metabolismo energetico e funzione mitocondriale, omeostasi e segnalazione cellulare e subcellulare del calcio, danno ossidativo e cascata apoptotica. La review inoltre riassume i tentativi terapeutici farmacologici, effettuati per un controllo della sintomatologia e lo stato attuale dei trapianti di cellule staminali nell'encefalo di soggetti affetti dalla malattia, trattamenti che risultano oggi ancora insoddisfacenti. Da qui la necessità di ricercare nuovi target molecolari e diverse e più efficaci strategie di intervento precoce nella terapia dell'Huntington.

Parole chiave: Malattia di Huntington, Ereditarietà, Neurodegenerazione

SUMMARY

Huntington's disease is an autosomal, dominantly inherited neurodegenerative disorder characterized by distinctive progressive symptoms that include chorea, involuntary movements, and cognitive impairments. Affected subjects exhibit a selective neuronal disfunction and loss within the central nervous system. The principal site of neurodegeneration is the caudate and the putamen where the medium-spiny projection neurons, innervated by glutamatergic afferents from the cerebral cortex and dopaminergic input from the substantia nigra, are particularly vulnerable. In this review, we summarize the progresses that have been made, since the discovery of Huntington's gene in 1993, in terms of molecular mechanisms underlying the pathogenesis of Huntington's disease. The generation of genetic animal models of the human disease enabled the characterization of numerous cellular and systematic changes over disease etiology. The causative mutation consists in the expansion of a CAG tract in the IT-15 gene that is translated in a poly-Q expansion at the N-terminus of the Huntingtine proteine. Mutant Huntingtine induces defects in a number of vital cellular processes, including endocytosis, intraneuronal trafficking, transcriptional regulation, post-synaptic signalling, energy metabolism, mitochondrial function, calcium homeostasis and apoptotic cascades. Further, this review update the current prospects for therapeutic approaches, particularly the development of targeting drugs and their testing in clinical trials. The first drug approved by the US FDA in 2008 for Huntington's disease treatment was an anti-dopamine agent, tetrabenazine (TBZ). TBZ is a potent inhibitor of vesicular monoamine transporter and causes depletion of dopamine content in the presynaptic vesicles, so targeting the calcium signalling pathway of neurons. This drug reduces motor coordination deficits in patients, however, in some patients it causes severe depression. A final overview consider the neural transplants in patients with Huntington's disease and point out still an unfavourable risk-benefit profile of this therapeutic approach.

Key words: Huntington's disease, Inheritability, Neurodegeneration

Introduzione epidemiologica e anatomico-clinica della malattia di Huntington

La malattia di Huntington (HD) è un disordine neurodegenerativo ereditario del sistema extrapiramidale, a trasmissione autosomica dominante, che colpisce dalle 4 alle 10 persone ogni 100.000 nella popolazione cau-

casica. La malattia è stata riscontrata in tutti i più importanti gruppi etnici, benché con diversa frequenza. I primi dati epidemiologici, descrittivi della malattia nel nostro paese, sono stati eseguiti nel 1977 nella provincia di Reggio Emilia (Tesi di specialità in Neurologia, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, non pubblicata). Studi successivi, eseguiti in differenti aree geografiche dell'Italia, hanno stimato tassi variabili, compresi tra 2,3 e 4,8 per 100.000 individui. In alcune aree del mondo si registra una più eleva-

ta frequenza della malattia a causa del così detto "effetto fondatore". Ad esempio, nella regione del lago Maracaibo in Venezuela la prevalenza della malattia è di circa 7/1000 per effetto della migrazione di un singolo individuo affetto dal Nord dell'Europa che avrebbe diffuso la mutazione tra le popolazioni locali [1]. Analogamente, pazienti affetti di origine Sudafricana deriverebbero da un unico soggetto affetto Olandese che nel 1652 si trasferì a Città del Capo [1]. Altri studi genealogici in paesi come il Venezuela, l'Australia, il Canada e gli Stati Uniti indicano l'Europa nord-occidentale come il principale serbatoio di cromosomi mutati responsabili dell'HD. Una bassa prevalenza della malattia si registra invece nelle popolazioni Giapponesi, Cinesi e Nere d'Africa, probabilmente per i minori contatti occorsi nel tempo tra queste popolazioni e quelle Europee [1]. Un'altra suggestiva ipotesi vedrebbe invece nelle popolazioni dell'Europa Occidentale una maggiore predisposizione genetica all'insorgenza di mutazioni HD "ex-novo" rispetto alle popolazioni orientali [2].

I sintomi della malattia, descritti per la prima volta da George Huntington nel 1872 nel suo articolo "On Chorea", tipicamente insorgono tra la terza e la quinta decade di vita e si possono inquadrare in tre tipologie: sintomi motori, cognitivi e psichiatrici [3, 4].

I sintomi cognitivi includono un rallentamento dei processi di informazione al cervello, risultando in difficoltà di comunicazione e programmazione, mentre il sintomo psichiatrico più comune è la depressione. I sintomi motori includono perdita di coordinazione, spasmi muscolari e corea. Con il progredire della malattia, ogni funzione che richieda un controllo muscolare risulta affetta, portando il soggetto verso una disabilità severa e complicazioni progressivamente ingravescenti nel giro di 10-20 anni dall'insorgenza dei primi sintomi clinici. Alcuni casi meno frequenti di HD presentano una insorgenza estremamente precoce dei sintomi, intorno ai 2 anni di vita (HD giovanile) ed annoverano tra i vari sintomi anche l'epilessia. Altri casi meno frequenti di HD presentano una insorgen-

za molto tardiva, anche verso gli 80 anni di età [5]. Per questa patologia non sussiste a tutt'oggi un trattamento sicuro ed efficace per tutti i sintomi.

Studi di risonanza magnetica dei cervelli post mortem di pazienti HD e di soggetti di controllo sani di pari età hanno rivelato, in primis, atrofia dello striato negli HD [6, 7]. Successivamente è stata documentata atrofia del nucleo caudato, putamen, globo pallido e talamo ed ancora riduzione del volume della corteccia dei lobi frontale e temporale in soggetti con sintomatologia conclamata [8-10]. Il principale sito di neurodegenerazione nell'HD è, quindi, il caudato-putamen ed in particolare i neuroni di proiezione spicati di media taglia (MSNs) dello striato.

Questi neuroni, innervati dagli afferenti glutamatergici dalla corteccia cerebrale e riceventi gli input dopaminergici dalla sostanza nigra, sono particolarmente vulnerabili [11]. La perdita selettiva dei neuroni GABA (acido γ -aminobutirrico) dello striato, regione del cervello che controlla i movimenti, risulta nelle ipercinesie incontrollate caratteristiche dell'HD. I progressivi cambiamenti emozionali, comportamentali e cognitivi invece riflettono il coinvolgimento di altre regioni cerebrali, appunto la corteccia e il globo pallido, il talamo, i nuclei subtalami, la sostanza nigra la sostanza bianca e, nelle fasi più tardive della malattia, il cervelletto [11, 12].

Genetica della malattia di Huntington

A differenza di altre patologie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer (AD), il Parkinson (PD) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), l'HD è causata dalla mutazione di un singolo gene, presenta quindi una ereditarietà puramente mendeliana di tipo autosomico dominante. Nel 1983 la regione genica responsabile è stata localizzata sul braccio corto del cromosoma 4 [13] e, 10 anni dopo, il gene è stato identificato [14]. La mutazione causativa della malattia di HD consiste nell'amplificazione di una triplet-

ta CAG localizzata nel primo esone del gene. Il gene codifica per una proteina ad espressione ubiquitaria, di 350 kDa, detta Huntingtina (Htt la proteina umana, htt la proteina murina) nella cui regione N-terminale il tratto CAG polimorfico viene tradotto in un tratto di poli-glutamine (poly-Q) [15, 3, 16]. Nelle persone affette, il numero di glutamine varia da 36 a 120, mentre in quelle non affette varia da 6 a 35 [17]. 40 o più glutamine determinano penetranza completa della malattia mentre 36-39 glutamine determinano una penetranza incompleta, con alcuni soggetti che sviluppano l'HD ed altri no [18]. Studi epidemiologici e genetici suggeriscono l'esistenza di una correlazione inversa tra la lunghezza del tratto CAG espanso e l'età di insorgenza della malattia.

L'espansione CAG responsabile dell'HD è instabile nella linea germinale e, quindi, nella trasmissione intergenerazionale, quando il soggetto trasmittente è di sesso maschile; presenta inoltre mosaicismi nei tessuti somatici, ossia eterogeneità di lunghezza del tratto CAG espanso nei diversi tessuti dell'affetto. La prima delle due caratteristiche, indicata come instabilità meiotica della tripletta, è il meccanismo responsabile di un'ulteriore amplificazione del tratto CAG nella progenie di maschi affetti e si accompagna ad anticipazione dell'età di insorgenza dei sintomi ed all'aggravamento degli stessi [17]. La seconda caratteristica, indicata come instabilità mitotica, non risparmia il tessuto nervoso centrale di modelli murini dell'HD e di pazienti HD [19, 20]. L'instabilità mitotica fornisce una spiegazione per un aspetto dell'HD che ha interessato i ricercatori per lungo tempo, ossia perché l'insorgenza della malattia sia ritardata nel tempo nonostante la mutazione sia presente alla nascita. È stato dimostrato infatti che l'espansione somatica del tratto CAG ereditato si verifica con l'avanzare dell'età, ed il meccanismo responsabile risiede nell'attivazione dell'enzima OGG1 (7,8-diidro-8-oxoguanina-DNA glicosilasi 1) indotta dallo stress ossidativo. Dal momento che il danno ossidativo alle cellule incrementa con l'avanzare dell'età, l'espansione somatica del tratto CAG nel gene

dell'Htt si stabilisce ed implementa nel tempo, guidando l'insorgere della sintomatologia [21].

Gonitel e collaboratori hanno dimostrato che l'incremento di lunghezza del tratto espanso di poli-Q nell'Htt mutante dei neuroni postmitotici, ossia in neuroni terminalmente differenziati e non più in duplicazione, avviene in maniera sincrona in sottogruppi di cellule neuronali in modo da generare popolazioni neuronali geneticamente distinte nel cervello di pazienti HD. Hanno dimostrato inoltre che i neuroni striatali hanno un più alto tasso di tendenza all'espansione e più alti livelli di espressione dell'Htt mutante rispetto ai neuroni corticali, alle cellule staminali cerebrali ed alle cellule gliali [22]. Questa caratteristica dello striato lascia intuire una maggiore tossicità dell'Htt mutante in questo tessuto e fornisce una giustificazione del perché lo striato sia il sito di prima vulnerabilità e morte cellulare nella malattia di Huntington.

Patogenesi della malattia di Huntington: meccanismi di disfun- zione cellulare e neurodegenerazione

Modelli animali e cellulari di malattia

Per comprendere i meccanismi che sono alla base del fenotipo patologico nell'HD, l'Htt mutante è stata fatta esprimere in una varietà di animali, inclusi nematodi, moscerino della frutta, zebrafish, ratti, topi e pecore.

Negli ultimi 13 anni sono state generate diverse linee di topi modelli dell'HD che differiscono per l'approccio utilizzato dai ricercatori nell'incorporare la mutazione causativa dell'HD nel genoma murino. Alcuni modelli di topo (R6/1, R6/2, N171-82Q) sono transgenici per il solo frammento N-terminale (primo esone) dell'Htt mutante umana, con un tratto poly-Q variabile da 82 a 150 glutammine e la cui espressione dipende generalmente da un promotore

molto più forte di quello naturale. Questi topi presentano una insorgenza e progressione della patologia molto rapide rispetto all'uomo e con una vita media molto ridotta [23, 24]; inoltre, possono presentare sintomi atipici rispetto all'HD dell'uomo adulto, come difetti del miocardio ed una certa propensione all'epilessia [25]. Altri modelli transgenici consistono in topi esprimenti l'intero gene HD umano mutato, sotto il controllo dei propri naturali domini regolatori. Questi topi che, date le grandi dimensioni del gene umano, sono stati generati ricorrendo ai sistemi del cromosoma artificiale di lievito (YAC-72, YAC-128) o del cromosoma artificiale batterico (BAC-HD), sviluppano un fenotipo patologico e degenerazione neuronale selettiva più simile all'HD umano, anche se con tempi di insorgenza e progressione più lenti [26, 27]. Infine, il modello murino che meglio ricapitola i livelli di espressione dell'Htt mutante nell'HD umano e gli aspetti patologici cerebrali, come la riduzione dei recettori per la dopamina specifici dello striato e la perdita neuronale, è costituito dai topi "knockin". In questi topi, una ripetizione CAG espansa (dalle 92 alle 150 ripetizioni) è stata inserita nel gene endogeno murino, omologo dell'umano. Nei topi knockin quindi, non solo la mutazione è nel contesto del gene intero ed è sotto il controllo del suo promotore naturale, ma è anche nel sito genomico naturale, normalmente occupato dal gene per l'htt nel contesto dell'intero genoma murino [28-30].

Un altro grande contributo dato dai topi knockin alla ricerca sull'HD è stata la generazione di linee cellulari immortalizzate mutanti (STHdh^{Q111/Q111}) e wild-type (STHdh^{Q7/Q7}) derivate dai neuroni striatali di embrioni di topi, appunto knockin per un tratto di 111 e 7 poliglutammine, al locus genico per l'htt murina. Altre linee cellulari sono state generate da striato embrionale di ratto allo scopo di identificare eventi precoci di disfunzione nella malattia, in assenza di formazione di aggregati di Htt mutante [31]. Questo modello cellulare esprime i primi 548 aminoacidi dell'Htt umana, sotto il controllo di un sistema inducibile dipendente dalla pre-

senza di doxiciclina nel mezzo di coltura delle cellule. Con questo sistema sono stati generati diversi cloni cellulari con un numero di ripetizioni CAG wilde-type o mutante nel frammento di Htt transgenica la cui espressione, grazie al sistema inducibile, può essere facilmente controllata dallo sperimentatore.

Sia i modelli animali che cellulari di HD hanno contribuito grandemente a chiarire diversi meccanismi patogenetici che accompagnano l'insorgenza e l'evoluzione della malattia nell'uomo.

L'Huntingtina mutante

L'intensa ricerca dell'ultimo decennio ha dimostrato che l'Htt mutante innesca meccanismi di tossicità cellulare e può indurre difetti in un gran numero di processi vitali della cellula nervosa come: endocitosi [32], trasporto intraneurale [33-35], regolazione trascrizionale dei geni [36, 37], segnalazione post-sinaptica [38], difetti nel metabolismo energetico e funzione mitocondriale [39, 40], omeostasi cellulare e subcellulare del calcio, danno ossidativo e cascata apoptotica. Gli studi condotti non solo hanno permesso la caratterizzazione di numerosi cambiamenti cellulari e sistemici nell'eziologia dell'HD ma suggeriscono che alcuni di questi, come cambiamenti di trascrizione genica e delle vie bio-energetiche della cellula, siano tra i primi eventi di disfunzione indotti dall'Htt mutante e, quindi, probabili meccanismi di innesco della tossicità cellulare.

Con quali meccanismi molecolari l'Htt mutante può indurre tossicità cellulare?

Si tratta di un guadagno di funzione tossica o di perdita di funzione wilde-type?

Nonostante l'Htt sia una proteina ad espressione ubiquitaria, gli aspetti neuropatologici iniziali sono selettivi per i neuroni spinati di media taglia dello striato. L'Htt è una proteina di grosse dimensioni (350 kDa) che è substrato per vari enzimi proteolitici. Il frammento proteolitico N-terminale dell'Htt, rapidamente si destruttura ed aggrega, sia nel nucleo che nei processi neu-

ronali delle cellule nervose [41, 42]. La parte che si accumula nel nucleo cellulare può interagire con una serie di fattori di trascrizione differenti, determinando alterazione dell'espressione di molti geni [43]. Molti studi recenti inoltre riportano che una piccola porzione dell'Htt mutante si associa a diversi organelli subcellulari, oltre al nucleo, come i mitocondri, i lisosomi, il reticolo endoplasmatico e la membrana plasmatica, danneggiandone la funzionalità [44-49].

Nei cervelli post-mortem di pazienti HD l'Htt mutante si presenta con la formazione di inclusioni insolubili nucleari [50] le cui dimensioni e numero comunque non correlano con la citotossicità in modelli cellulari [51] né causano neurodegenerazione in modelli murini della malattia [52]. È piuttosto la degradazione proteolitica dell'Htt mutante, nelle cellule striatali dei soggetti affetti, a risultare cruciale per lo sviluppo della malattia. L'Htt infatti può essere tagliata in molti siti da proteasi come: caspasi [53, 54], calpaine [55, 56] ed aspartil-proteasi [57]. In particolare, il sito di consenso per la caspasi-6, all'aminoacido 586 dell'Htt mutante è risultato cruciale per l'espressione delle funzioni citotossiche nell'HD. Infatti, prevenendo la proteolisi al sito 586 della proteina, si previene lo sviluppo dei sintomi comportamentali e motori in modelli murini dell'HD. Recentemente, Warby e collaboratori [58] hanno dimostrato che il frammento 586 dell'Htt viene generato dalla caspasi-6 direttamente nel nucleo cellulare piuttosto che nel citoplasma e qui viene rapidamente tagliato in frammenti più piccoli da altre proteasi. Questi frammenti solubili e a localizzazione nucleare sembrano essere i veri artefici della tossicità e morte cellulare, piuttosto che le inclusioni macromolecolari. Anche in altre patologie neurodegenerative, come l'AD [59] e diverse atassie spino cerebellari [60, 61] risulta importante poter prevenire eventi specifici di taglio proteolitico. Ad esempio, nell'AD la prevenzione del taglio della proteina precursore β -amiloide, da parte delle caspasi, previene gli aspetti neuropatologici della malattia [62].

Da quanto è stato detto, sebbene la maggior

parte delle evidenze siano a sostegno di un guadagno di funzione tossica da parte dell'Htt mutante, ci sono anche prove che alla neurodegenerazione contribuiscono meccanismi di perdita di funzione dell'Htt mutante rispetto alla wild-type. Ad esempio, l'espressione ed il trasporto del BDNF (brain-derived neurotrophic factor), dalla corteccia cerebrale ai neuroni dello striato, dove svolge funzione neuroprotettiva, richiede Htt wild-type, ma l'Htt mutante inibisce sia l'espressione del gene per BDNF sia il trasporto vescicolare dello stesso [63]. Quindi, meccanismi di guadagno di funzione tossica e di perdita di funzione da parte dell'Htt mutante possono coesistere e non si escludono a vicenda.

Alterazione dell'espressione genica nella malattia di Huntington

L'Htt ha la capacità di entrare e uscire dal nucleo cellulare grazie a specifici segnali peptidici presenti nella sequenza proteica [64]. A causa della sua localizzazione nucleare, precoce e più marcata nello striato rispetto ad altre regioni cerebrali [27], un gran numero di eventi trascrizionali risultano modulati dall'Htt mutante, inclusa l'espressione di proteine coinvolte nella funzione mitocondriale e nel metabolismo energetico [65]. L'Htt mutante nel nucleo interagisce con una serie di fattori di trascrizione diversi [66, 67, 68]. Ad esempio, la sua interazione con CREB (cAMP response element-binding protein) è considerata responsabile della ridotta disponibilità della forma fosforilata di CREB, attiva dal punto di vista trascrizionale, nel cervello di modelli murini dell'HD [69]. Le principali conseguenze di questo sequestro di CREB da parte dell'Htt mutante sembrano consistere in una riduzione dell'espressione di BDNF, afferente allo striato dalla corteccia, ed in una riduzione di espressione di alcuni geni del DNA mitocondriale, normalmente attivati da CREB [70]. CREB regola anche l'espressione di PGC-1 α un coattivatore trascrizionale che normalmente

interagisce con diversi fattori di trascrizione implicati in una ampia varietà di risposte biologiche, come la termogenesi adattativa e la biogenesi dei mitocondri. Di particolare interesse è il ruolo neuroprotettivo svolto da PGC-1 α in quanto è in grado di sopprimere le specie reattive dell'ossigeno (ROS), probabilmente aumentando l'espressione di enzimi di difesa dai ROS come rame/zinco superossido dismutasi (SOD1), manganese SOD (SOD2), catalasi e glutatione perossidasi [71]. I livelli di mRNA di PGC-1 α risultano ridotti sia nello striato di cervelli post mortem di pazienti HD, sia nei tessuti cerebrali di modelli murini di HD e sia nelle linee cellulari striatali di topo esprimenti 111 glutamine [72]. Il sequestro di CREB da parte dell'Htt mutante e la conseguente riduzione dei livelli di PGC-1 α contribuisce a spiegare la maggiore vulnerabilità dei neuroni striatali ai ROS. Alle molteplici disfunzioni trascrizionali nell'HD contribuisce l'interazione dell'Htt mutante con p53. Questa proteina, meglio conosciuta per la sua funzione di oncosoppressore, ha in realtà funzioni multiple attraverso le quali influenza processi come l'angiogenesi, la chemotassi e la trascrizione genica. Inoltre, p53 è un fattore di trascrizione e controlla i livelli di espressione dell'Htt wild-type, oltre a legare l'Htt mutante. L'interazione p53/Htt mutante incrementa la localizzazione nucleare dell'Htt aumentandone l'attività trascrizionale [66]. Infine, i livelli di p53 risultano aumentati sia nel cervello di pazienti HD sintomatici che nei modelli murini e cellulari di HD. L'inibizione dell'attività di questa proteina si correla alla prevenzione dei difetti mitocondriali normalmente osservati nella patologia [66, 73]; p53, quindi, può rappresentare un link cruciale tra l'azione nucleare dell'Htt mutante e la disfunzione mitocondriale.

Segnalazione del calcio nella malattia di HD

Lavori recenti indicano una alterata omeostasi del calcio (Ca²⁺), quindi una anomala segnala-

zione intracellulare mediata da questo ione, come causa patogenetica in diverse malattie neurodegenerative come l'AD, il PD, la SLA e l'HD. Nell'HD una delle funzioni tossiche svolte dall'Htt mutante consiste nella destabilizzazione della segnalazione del Ca²⁺ neuronale [74].

Studi di espressione genica (microarray) comparativa, condotti su cervelli di pazienti HD e di modelli murini della patologia, hanno evidenziato una comune alterazione dei livelli di espressione di proteine coinvolte nelle vie di segnalazione del Ca²⁺ [75].

L'Htt mutante inoltre può interferire direttamente con le vie di segnalazione del Ca²⁺ nei neuroni spinati dello striato, attraverso diversi meccanismi che agiscono sinergicamente e che generano un complessivo aumento della concentrazione intracitoplasmatica del Ca²⁺. Precisamente, l'Htt mutante esaspera l'attività di canali di flusso del Ca²⁺ che rispondono al glutammato rilasciato dai neuroni di proiezione cortico-striatali. Infatti, si associa e stimola la funzione dei recettori NMDAR (N-methyl D-aspartate receptor) della membrana plasmatica che mediano l'influsso di Ca²⁺ dallo spazio extracellulare al citoplasma; si lega fortemente alla regione C-terminale dei recettori R1 per l'inositolo trifosfato (InsP₃R1), presenti sulla membrana del reticolo endoplasmatico (ER), inducendo rilascio di Ca²⁺ dalle cisterne dell'ER. Sui recettori NMDAR ed InsP₃R1 vanno a convergere le vie attivate dalla dopamina rilasciata dai neuroni dopaminergici del midbrain. I recettori per la dopamina di classe D1 e D2 infatti sono espressi abbondantemente sulla membrana dei neuroni striatali. I recettori di classe D1 attivano l'enzima adenilciclastasi che porta ad un aumento dei livelli di cAMP e, quindi, all'attivazione della PKA. La PKA va a potenziare la segnalazione del Ca²⁺ mediata dal glutammato attraverso gli specifici recettori di cui sopra. L'attivazione dei recettori di classe D2 invece porta direttamente alla sintesi dell'InsP₃ ed alla attivazione dei recettori InsP₃R1 del reticolo endoplasmatico. Un ulteriore influsso di Ca²⁺ dallo spazio extracellulare avviene attraverso i

canali di membrana VGCCs (L-type voltage-gated calcium channels).

Disfunzione mitocondriale nell'HD

Alterazione del metabolismo energetico cellulare

Una funzione cruciale dei mitocondri consiste nella conversione dei nutrienti pervenuti alla cellula in energia o calore attraverso il processo di fosforilazione ossidativa. Le cellule nervose hanno una intensa richiesta energetica, che i mitocondri devono largamente soddisfare, per lo svolgimento di processi come: il mantenimento del potenziale della membrana plasmatica e il rilascio e riassorbimento di neurotrasmettitori alle sinapsi. I mitocondri hanno anche l'importante ruolo di tamponare il calcio, controllandone la concentrazione nel citosol dopo il processo di neurotrasmissione [76].

Una morfologia aberrante dei mitocondri è stata dimostrata nei tessuti cerebrali postmortem di pazienti HD sintomatici ed anche nei tessuti periferici e nei linfoblasti. Analogamente all'uomo, mitocondri in degenerazione sono stati identificati nel cervello, nel fegato e nel muscolo scheletrico di diversi modelli mutanti di topo e ratto in fase sintomatica.

Le modificazioni mitocondriali, che si traducono in alterazione del metabolismo energetico cellulare, da lungo tempo sono state implicate nell'eziologia dell'HD, basandosi inizialmente sull'osservazione che la perdita di peso corporeo da parte dei soggetti con sintomatologia conclamata è un elemento cardinale della malattia. Modificazioni nella funzionalità mitocondriale hanno un forte impatto sul metabolismo energetico cerebrale. Infatti, nei gangli della base e nel talamo di soggetti HD è stata osservata riduzione di N-acetilspartato, molecola normalmente abbondante nelle cellule cerebrali e che riflette la funzionalità metabolica mitocondriale.

Contemporaneamente, un abnorme incremento dei livelli di lattato si registra nella corteccia e nei gangli della base, ancora ad indicare una ridotta efficienza mitocondriale e/o elevata glicolisi [77].

Studi di imaging cerebrale (tomografia ad emissione di positroni) condotti al fine di evidenziare variazioni funzionali nel cervello di soggetti sintomatici, hanno rivelato una riduzione dell'utilizzo di glucosio, quindi ipometabolismo, nel caudato, putamen e corteccia cerebrale di soggetti HD sintomatici ed anche di soggetti asintomatici, portatori di mutazione, diversi anni prima dell'insorgenza clinica dei sintomi. In tutti gli studi condotti ad oggi su soggetti HD in fase preclinica l'ipometabolismo dei gangli della base si accompagna ad una ridotta densità dei recettori D1 e D2 per la dopamina e ad una riduzione di volume della sostanza bianca cerebrale, come pure, in molti casi, ad atrofia striatale. Per contro, un significativo aumento del metabolismo del glucosio si osserva nel cervelletto sia di presintomatici che di sintomatici conclamati, a sostegno del coinvolgimento tardivo di questa regione dell'encefalo nella patogenesi dell'HD. Modelli animali e cellulari di HD hanno sottolineato altre alterazioni associate al processo di fosforilazione ossidativa della cellula, come la riduzione dei livelli di cAMP nello striato, diversi mesi prima della comparsa dei cambiamenti patologici ed un ridotto consumo di O₂ e di produzione di ATP rispetto alle controparti wild-type.

Una glicolisi meno efficiente ed una minore produzione di ATP nei mitocondri può solo suggerire una disfunzione mitocondriale, ma ancora non prova un coinvolgimento diretto di questi organelli nell'eziologia dell'HD [77].

Funzione respiratoria mitocondriale

Molti gruppi di ricerca hanno saggiato la funzionalità degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale nel caudato e putamen di pazienti HD con sintomatologia severa. Questi studi hanno dimostrato una ridotta funzionalità di diversi enzimi mitocondriali appartenenti ai complessi II, III e IV della catena respiratoria ed anche una ridotta espressione di almeno 2 pro-

teine componenti il complesso II. Per contro, nessun difetto funzionale di questi enzimi o del metabolismo ossidativo in genere è stato trovato nel cervello di pazienti HD allo stadio iniziale della malattia. Inoltre, è necessario sottolineare che nessuno dei modelli murini studiati, né la linea cellulare striatale *STHdh^{Q111/Q111}* hanno mostrato una qualche alterazione funzionale degli enzimi respiratori del complesso II mitocondriale, neanche in fase sintomatica. Solo la linea di topi R6/2 ha mostrato un 30% di riduzione dell'attività del complesso IV nei mitocondri dello striato e della corteccia cerebrale. Dall'insieme di questi dati si fa strada la convinzione che, almeno nei tessuti cerebrali, una disfunzione degli enzimi respiratori mitocondriali sia secondaria ad altri processi di danno cellulare piuttosto che evento primario nell'eziologia della malattia [77].

Motilità mitocondriale e migrazione distrettuale

In studi condotti su topi e ratti transgenici, è stata dimostrata l'associazione della Htt mutante con la membrana mitocondriale esterna. Precisamente, un frammento N-terminale dell'Htt mutante, probabilmente più piccolo dei primi 500 aminoacidi ma contenente il dominio espanso di poliglutamine, si associa alla membrana mitocondriale esterna. Se questa associazione Htt mutante/mitocondri abbia un ruolo diretto nell'alterazione strutturale e funzionale dei mitocondri non è ancora chiaro. Quel che sembra molto probabile invece è l'induzione di un rallentamento della motilità mitocondriale all'interno della cellula sino ad impedire la veicolazione di questi organelli, generatori primari di ATP, nei siti appropriati all'interno del citoplasma cellulare [78]. Normalmente i mitocondri vengono attivamente trasportati lungo i processi neuronali (assoni e dendriti) per fornire energia alle terminazioni nervose e mantenere la normale funzione neuronale. Il movimento dei mitocondri è un processo complesso e dinamico che vede implicate diversi componenti cellulari come i microtubuli del citoscheletro e i filamen-

ti di actina, elementi cargo, motori e adattatori [78]. La stessa Htt wilde-type sembra essere implicata nel traffico anterogrado e retrogrado di questi organelli e nel trasporto vescicolare in genere della cellula. Questa funzione dell'Htt è mediata dall'associazione con diverse proteine che interagiscono con i microtubuli di trasporto del citoscheletro ed in particolare con HAP1. È plausibile ritenere che l'Htt mutante possa avere una interazione alterata con le proteine di trasporto e/o sequestrarle in macroaggregati, compresa l'Htt wilde-type. Una ulteriore ipotesi vede gli aggregati di Htt mutante come blocchi di ostruzione dei processi neuronali che impediscono il flusso di organelli [78]. Infatti, mitocondri di modelli murini in fase sintomatica risultano distribuiti in tutto il citoplasma cellulare, alle terminazioni sinaptiche e nei dendriti, ma risultano spesso circondati da aggregati di grosso calibro di Htt mutante. Alcuni lavori suggeriscono che l'associazione dell'Htt con i mitocondri si verifichi diversi mesi prima dell'insorgenza dei sintomi. Questa ipotesi sembra trovare sostegno nel fatto che anche in cloni cellulari striatali *STHdh^{Q111/Q111}* è stata dimostrata una associazione dell'htt mutante murina con i mitocondri [77] e, data l'origine da neuroni embrionali di questi cloni cellulari, l'interazione htt/mitocondri potrebbe essere considerato un evento pre-sintomatico.

La gestione del calcio mitocondriale

Risulta sempre più evidente che una disfunzione nel controllo del calcio mitocondriale contribuisce alla patogenesi dell'HD. Mitocondri provenienti da linfoblasti di pazienti HD, depolarizzano ad una concentrazione più bassa di calcio di quanto non facciano i mitocondri da linfoblasti di soggetti di controllo [79]. Difetti simili sono stati riscontrati nei mitocondri cerebrali di topi transgenici esprimenti l'Htt mutante full-length e questi difetti precedono l'insorgere delle anomalie patologiche e comportamentali. In topi transgenici R6/2 è stata dimostrata una maggiore vulnerabilità dei mitocondri muscolari allo stress indotto dal calcio, il che determina

depressione energetica ed atrofia del muscolo. Inoltre, sia in ratti transgenici che esprimono una ripetizione di 51 glutamine sia in linee cellulari striatali derivate da topi HD si osserva una ridotta capacità dei mitocondri di trasportare il calcio e una ridotta soglia di calcio a cui si verifica l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP) e, in conseguenza depolarizzazione del mitocondrio. Il trattamento di cellule murine che esprimono l'htt mutante con inibitori HDAC (inibitori delle deacetilasi istoniche) come la tricostatina A e il butirrato di sodio, induce un miglioramento nella risposta dei mitocondri all'aumento di concentrazione del calcio [79]. Questa osservazione sta ad implicare l'alterazione dell'espressione genica, indotta dall'htt mutante, tra i meccanismi che inducono maggiore sensibilità dei mitocondri alla depolarizzazione mediata dal calcio. Oltre che dalla deregolazione dei processi trascrizionali della cellula, la funzione mitocondriale potrebbe essere alterata anche dall'interazione diretta dell'htt mutante con i mitocondri. Il dato sperimentale più forte a sostegno di questa ipotesi consiste nell'osservazione che:

1. sia l'htt wild-type che quella mutante con un tratto espanso di poly-Q sono in grado di interagire con la membrana mitocondriale esterna;
2. una forma troncata di Htt mutante, ma non l'htt wild-type, è in grado di indurre l'apertura del mPTP di mitocondri isolati da cellule di fegato di topo, quindi anche al di fuori del contesto cellulare [79].

Morte neuronale nella malattia di HD: vie apoptotiche e non-apoptotiche

Una funzione putativa attribuita alla proteina Htt wild-type è la regolazione dell'apoptosi durante lo sviluppo ed è stato suggerito che la mutazione dell'htt possa influire negativamente sullo svolgimento di questa funzione [77]. La

progressiva morte neuronale, prima nello striato e poi nella corteccia cerebrale dei pazienti HD, ha portato diversi ricercatori ad indagare le vie di attivazione dell'apoptosi in questa malattia. Ad esempio, nei mioblasti di soggetti sintomatici per HD ed anche in quelli di presintomatici, portatori della mutazione, è stata osservata l'attivazione di mediatori apoptotici, come le caspasi-3, -8 e -9, in concomitanza con la depolarizzazione della membrana mitocondriale, il rilascio di citocromo c e difetti nel differenziamento cellulare. Modelli murini dell'HD inoltre hanno mostrato, nello striato di topi sintomatici, un incremento dei livelli dell'RNA messaggero per la caspasi-9 ed un aumento di attività della caspasi-3. Una plausibile spiegazione del pathway di attivazione della cascata apoptotica nelle cellule HD, parte dall'osservazione che l'htt wild-type esercita una azione anti-apoptotica. È stato dimostrato infatti che l'htt wild-type è in grado di attivare l'espressione di geni di sopravvivenza cellulare (come Bcl-xL e BDNF) e di reprimere l'espressione di geni favorevoli alla morte cellulare (come BAX e Bcl-2). È in grado inoltre di interagire, quindi sequestrare, la proteina H1P1 pro-apoptotica. La proteina H1P1 infatti, se libera dall'interazione con l'htt, attiva processi cellulari apoptotici in particolare attraverso la cascata di eventi che succede all'attivazione della caspasi-8 e che porta al rilascio del citocromo c e di altri fattori pro-apoptotici dai mitocondri, all'attivazione delle caspasi-9 e -6 ed alla frammentazione nucleare [77].

L'htt mutante nell'HD, con un tratto di poliglutamina espanso, ha una capacità ridotta di legare la proteina H1P1 e questo probabilmente contribuisce all'innescare dei meccanismi di morte cellulare per apoptosi. Ruan e collaboratori tuttavia, hanno dimostrato che la morte neuronale nell'HD, in seguito ad inibizione del complesso II della catena respiratoria mediante acido 3-nitropropionico, può verificarsi in seguito all'innescare, da parte dell'htt mutante, di processi non-apoptotici e quindi senza rilascio di citocromo c dai mitocondri [80]. Questo tipo di morte cellulare può essere addirittura preferenziale rispetto a

quella per apoptosi, in modelli cellulari striatali knockin per htt-Q111. Queste cellule infatti presentano una disfunzione dell'attività del complesso II della catena respiratoria mitocondriale e, come conseguenza, livelli ridotti di produzione di ATP. La combinazione della minore disponibilità energetica della cellula con l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP), causata da un massiccio ingresso di Ca^{2+} nel mitocondrio e la conseguente perdita del potenziale di membrana mitocondriale risulterebbe nell'innescare di meccanismi non-apoptotici di morte cellulare [80].

Approcci terapeutici nella malattia di Huntington

Il trattamento oggi dei pazienti HD, si basa meramente sul controllo dei sintomi, ma in nessun caso può ripristinare la funzione neuronale né porre fine alla progressiva perdita di neuroni.

Interventi terapeutici farmacologici

Data l'importanza che riveste la disfunzione delle vie di segnalazione del Ca^{2+} nella patogenesi dell'HD, molti degli interventi farmacologici sperimentati, o in via di sperimentazione, si rivolgono al ripristino della funzionalità di queste vie [74].

Due inibitori dei recettori NMDAR, memantina e riluzolo, hanno mostrato effetto neuroprotettivo in esperimenti condotti con colture cellulari striatali modelli di HD [81, 82]. La memantina si è dimostrata più efficace del riluzolo [83] ed è risultata parzialmente efficace in una sperimentazione pilota, in piccola scala, condotta su pazienti HD [84]. L'efficacia della memantina verrà testata a breve in un trial clinico condotto con pazienti HD in fase IV della malattia. Il riluzolo è un agente antiglutammato approvato dalla US FDA per il trattamento della SLA ma, testato in un trial clinico della durata di 3 anni, con pazienti HD in fase III, si è dimostrato inefficace [85]. Una recente pubblicazione riporta i risulta-

ti di uno studio clinico durato 2 anni, condotto con pazienti in parte trattati con riluzolo ed in parte trattati con placebo [86]. Questo studio ha dimostrato che il riluzolo protegge i soggetti HD dall'ipometabolismo del glucosio e dalla riduzione di volume della sostanza grigia in tutte le aree corticali. Inoltre, i livelli sierici delle neurotrofine BDNF e TGF beta-1 (transforming growth factor beta-1) risultano significativamente aumentati nei pazienti trattati con riluzolo rispetto ai pazienti di controllo.

Il primo farmaco approvato dalla US FDA nel 2008 per il trattamento dell'HD è la tetrabenazina, un potente inibitore del traffico vescicolare delle monoamine che causa deplezione del contenuto di dopamina dalle vescicole presinaptiche. Nei trials clinici condotti con questo farmaco si è osservata una riduzione significativa dei sintomi coreici nei pazienti HD [87] e, il trattamento precoce di modelli murini della malattia protegge i neuroni striatali dalla degenerazione [88]. La tetrabenazina quindi si propone non solo per il trattamento sintomatico negli stadi avanzati della malattia ma anche per un trattamento presintomatico dei portatori di mutazione.

Comunque, in alcuni pazienti la tetrabenazina può causare severa depressione [87] suggerendo la necessità di ricercare agenti antidopamina alternativi oppure sostanze inibitorie dei recettori D1 e D2. Un agente antiossidante ed antinvecchiamento come il resveratrolo è stato testato su nematodi modelli dell'HD e su linee cellulari striatali di topi knockin per l'HD, dimostrandosi efficace nel prolungare la sopravvivenza neuronale [89, 90]. Comunque, non ci sono dati di trial clinici su pazienti riguardanti questo farmaco.

Considerando il ruolo chiave rivestito dai mitocondri nella patogenesi dell'HD e delle malattie neurodegenerative in genere, sono stati condotti trials clinici con farmaci stabilizzanti dei mitocondri ed energizzanti come la creatina e il CoQ10. La creatina è una sostanza naturale che fornisce alle cellule muscolari e nervose una riserva di fosfati ad alto contenuto energetico; il CoQ10 è un co-fattore biologico essenziale per la

catena mitocondriale di trasporto degli elettroni. Ad oggi, i benefici osservati nell'HD con questa classe di farmaci risulta molto modesta [91].

Un altro agente chimico, il dimebon, era stato dichiarato neuroprotettivo per le sue potenzialità di preservare la struttura dei mitocondri e di inibire l'apertura del poro di permeabilità mitocondriale, a basse concentrazioni (picomoli) [92]. In realtà si tratta di un agente anti-istaminico utilizzato in passato in Russia per ridurre il deficit cognitivo dei pazienti affetti da AD [93]. Il dimebon è in grado di inibire i recettori alfa-adrenergici, i recettori per l'istamina e quelli per la serotonina ma, testato per la terapia dell'HD, ha mostrato una certa efficacia solo a concentrazioni micromolecolari e soltanto su linee cellulari striatali in coltura, agendo come inibitore dei recettori NMDA e VGCC [94]. L'efficacia di questo farmaco non è mai stata testata in vivo su pazienti HD. Un approccio sperimentale diverso nel trattamento dell'HD mira a correggere le alterazioni di espressione genica che si accompagnano all'insorgenza e progressione della malattia.

Nel settembre 2008, su *Proceedings of the National Academy of Sciences* sono stati pubblicati i risultati di uno studio preclinico, condotto su un modello murino transgenico per la malattia di Huntington [95]. Come precedentemente riportato, sia nei modelli murini di Huntington che nei pazienti affetti dalla malattia l'espressione di molti geni risulta deregolata in aree differenti del cervello. In questo studio gli scienziati hanno dimostrato l'efficacia terapeutica per la malattia di Huntington di un nuovo inibitore delle deacetilasi istoniche (HDAC inhibitor 4b), sviluppato in un programma di ricerca della Repligen Corporation, una compagnia biofarmaceutica attiva nel campo della terapia delle malattie neurodegenerative. Il farmaco, somministrato oralmente agli animali sintomatici per la malattia, ripristina i corretti livelli di espressione genica di molti dei geni alterati e ne migliora le performance motorie, riduce la perdita di peso corporeo e riduce il grado di atrofia cerebrale. La marcata riduzione dei sintomi ottenuta con questo nuovo farmaco, senza che si registrasse una qualunque

tossicità dello stesso, lo propone come candidato per lo sviluppo di trials clinici sull'uomo.

Trapianti neuronali

La valutazione clinica del trapianto neuronale come trattamento potenziale dell'HD è iniziata con il tentativo di rimpiazzare i neuroni perduti e migliorare gli aspetti patologici dei pazienti [96-98]. Studi preclinici condotti su roditori e primati modello della malattia e che hanno utilizzato cellule embrionali striatali hanno dimostrato la fattibilità di questo approccio terapeutico. Trapianti di striato fetale sopravvivono, inducono recupero del fenotipo e stabiliscono connessioni con il cervello del roditore o primato trapiantato [99-101]. Alla luce di questi dati preliminari, Cicchetti et al. [102] hanno trapiantato, nel caudato e nel putamen di 3 pazienti HD sintomatici, dai 5 agli 8 primordi striatali, di 0.5-1.0 mm³ ciascuno. I pazienti trapiantati sono stati monitorati nel tempo e, a 10 anni di distanza dal trapianto, si è comunque osservata la degenerazione preferenziale dei neuroni striatali medi spinati rispetto agli interneuroni. Questa degenerazione neuronale specifica avviene anche a carico delle cellule trapiantate, nonostante non siano geneticamente relate all'organismo ospite, in un pattern simile alla perdita dei neuroni striatali endogeni del soggetto HD sottoposto a trapianto. Questo risultato può rivestire grande importanza scientifica in quanto dimostra che la presenza del gene mutante per l'Htt non è richiesta all'interno dei neuroni striatali per determinare la loro degenerazione. Piuttosto la degenerazione dei trapianti striatali è la conseguenza dell'espressione del gene mutante in altre regioni cerebrali. Oltre agli input glutamatergici, le proiezioni cortico-striatali forniscono anche supporto trofico ai neuroni striatali quindi, la degenerazione dei neuroni trapiantati può essere il risultato della combinazione di effetti excitotossici glutamatergici provenienti dalla corteccia e la perdita di adeguato supporto trofico. In questo studio, le componenti cellulari derivate dal trapianto risultano addirittura più affette dai processi patologici di quanto non lo siano quelle

dello striato ospite, nonostante le proiezioni cortico-striatali raggiungano le componenti del trapianto. Inoltre, la perdita di volume striatale registrata a carico dei pazienti trapiantati risulta simile a quanto descritto per altri pazienti con HD [103]. Piuttosto che una influenza positiva del trapianto sulla corteccia cerebrale dell'ospite, sembra che sia la patologia nella corteccia dell'ospite ad indurre degenerazione neuronale nel trapianto. Gli autori concludono dicendo che, da questo loro studio, il tentativo di dimostrare che nella malattia di HD i trapianti di striato embrionale possano rallentare la degenerazione dello striato ospite circostante è fallito e, dato il rapporto sfavorevole rischi/benefici, non raccomandano trials futuri in cui si adotti nuovamente la tecnica di trapianto di cellule fetali da loro sperimentata.

Conclusioni e prospettive

Da quanto sopra esposto, emerge chiaramente che il trattamento farmacologico dell'HD è ad oggi ancora insoddisfacente, da qui la necessità di ricercare nuovi targets molecolari e diversi e più efficaci farmaci di intervento precoce nella terapia dell'HD.

Addirittura il trapianto di cellule striatali embrionali, senza la mutazione congenita, non pare essere utile a migliorare la sopravvivenza neuronale negli affetti HD, almeno quando la sintomatologia è ormai conclamata. Le indicazioni che si ricavano suggerirebbero che nella malattia di Huntington si innescano meccanismi degenerativi irreversibili rispetto a tessuti e sistemi cellulari interagenti.

Da qui la necessità di intervenire precocemente, prima che le disfunzioni cellulari si siano rese ormai evidenti con l'insorgere della sintomatologia. Un intervento precoce può essere disegnato solo se si dipanano, nella molteplicità di eventi di disfunzione neuronale riportati, i reciproci rapporti di causa ed effetto, ad oggi ben lontani dall'essere chiariti.

La destabilizzazione del sistema di segnalazione neuronale mediata dal Ca^{2+} è una delle principali funzioni tossiche esercitata dall'Htt mutante e si propone quindi come ipotesi primaria di patogenesi nell'HD. Alcuni dei recettori e canali, preposti al controllo dell'omeostasi del calcio intracitoplasmatico, sono stati considerati come bersaglio di terapia farmacologica, ma molte altre proteine e sistemi proteici intervengono nella fine regolazione delle vie di segnalazione di questo ione [74] e non sono ancora state indagate per un loro eventuale ruolo nella patogenesi della malattia di HD. In fine, una delle mete più ambite che i ricercatori sulla malattia di HD oggi si propongono di raggiungere consiste nell'identificazione di traccianti molecolari periferici di malattia, ossia marcatori di HD riconoscibili nelle cellule nucleate del sangue periferico. I marcatori eventualmente identificati, da un lato saranno utili al clinico per il monitoraggio non invasivo della malattia negli affetti e per essere traccianti di progressione nei presintomatici, dall'altro si potranno essi stessi come target/s di terapia, in quanto segnalatori precoci di disfunzione cellulare.

Utilizzando piattaforme di microarrays, due lavori ad oggi si sono cimentati nell'impresa riportando i dati di una analisi complessiva dei profili di espressione genica nel sangue periferico di presintomatici HD, sintomatici HD e controlli normali di pari sesso ed età [104, 105]. I due gruppi di ricerca hanno riportato dati parzialmente contrastanti, forse a causa delle differenti piattaforme di microarrays utilizzate, sottolineando sia l'importanza dell'accuratezza del disegno sperimentale, sia come eventuali dati falsamente positivi o falsamente negativi possano derivare dall'enorme diversità biologica degli individui analizzati.

Bibliografia

1. Hayden MR Huntington's chorea. Springer-Verlag, New York 1981.
2. Squitieri F., Andrew SE, Goldberg YP, et al. DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and

- mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. *Hum Mol Genet* 3, 2103-2114, 1994.
3. Bates G. P. History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington's disease: a history. *Nat.Rev.Genet.* 6, 766-773, 2005.
 4. Montoya A., Price B. H., Menear M., Lepage M. Brain imaging and cognitive dysfunctions in huntington's disease. *J.Psychiatry Neurosci.* 31, 21-29, 2006.
 5. Kremer B. Clinical neurology of Huntington's disease, in Huntington's disease. 3rd ed. Edited by Gillian Bates, Peter Harper, and Lesley Jones 2002.
 6. Bamford K.A., Caine E.D., Kido D.K., Plassche W.M., Shoulson I. Clinical-pathologic correlation in Huntington's disease: a neuropsychological and computed tomography study. *Neurology* 39, 796-801, 1989.
 7. Aylward E.H., Brandt J., Codori A.M., Mangus R.S., Barta P.E., Harris G.J. Reduced basal ganglia volume associated with the gene for Huntington's disease in asymptomatic at-risk persons. *Neurology* 44, 823-828, 1994.
 8. Bäckman L, Robins-Wahlin TB, Lundin A, Ginovart N, Farde L. Cognitive deficits in Huntington's disease are predicted by dopaminergic PET markers and brain volumes. *Brain* 120, 2207-2217, 1997.
 9. Aylward E. H., Li Q., Stine O., et al. Longitudinal change in basal ganglia volume in patients with Huntington's disease. *Neurology* 48, 394-399, 1997.
 10. Fennema-Notestine C., Archibald S. L., Jacobson M. W. et al. In vivo evidence of cerebellar atrophy and cerebral white matter loss in Huntington' disease. *Neurology* 63, 989-995, 2004.
 11. Vonsattel J. P. G., DiFiglia M. Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57: 369-384, 1998.
 12. Duff K., Paulsen J.S., Beglinger LJ, Langbehn DR, Stout JC Predict-HD Investigators of the Huntington Study Group Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study. *Biol. Psychiatry* 62: 1341-1346, 2007.
 13. Gusella J. F., Wexler N S, Conneally P M, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234-238, 1983.
 14. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-983, 1993.
 15. Li S., Li X. J. Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington's disease. *Mol. Neurodegener.* 1, 19, 2006.
 16. Orr H. T., Zoghbi H. Y. Trinucleotide repeat disorders. *Ann. Rev. Neurosci.* 30, 575-621, 2007.
 17. Reddy P.H., Williams M., Tagle D.A. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci.* 22, 248-255, 1999b.
 18. Myers R.H. Huntington's disease genetics. *NeuroRx* 1, 255-262, 2004.
 19. Wheeler VC, Lebel LA, Vrbanac V, Teed A, te Riele H, MacDonald ME Mismatch repair gene Msh2 modifies the timing of early disease in Hdh(Q111) striatum. *Hum Mol Genet* 12: 273-281, 2003.
 20. Kennedy L, Evans E, Chen CM, Craven L, Detloff PJ, Ennis M, Shelbourne PF Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 12: 3359-3367, 2003.
 21. Kovtun IV, Liu Y, Bjoras M, Klungland A, Wilson SH, McMurray CT OGG1 initiated age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* 447, 447- 452, 2007.
 22. R. Gonitel, H. Moffitt, K. Sathasivam, B. Woodman, P. J. Detloff, R. L. M. Faull, and G. P. Bates. DNA instability in postmitotic neurons. *PNAS* 105 (9), 3467-3472, 2008.
 23. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87: 493-506, 1996.
 24. Schilling G, Becher MW, Sharp AH et al. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 8: 397-407, 1999.
 25. Mihm MJ, Amann DM, Schanbacher BL, Altschuld RA, Bauer JA, Hoyt KR. Cardiac dysfunction in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis* 25: 297-308, 2007.
 26. Van Raamsdonk JM, Pearson J, Slow EJ, Hossain SM, Leavitt BR, Hayden MR Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *J. Neurosci.* 25: 4169-4180, 2005.
 27. Shirasaki D.I., Gray M., Murphy T.K., et al. A proteomic probing of the full-length huntingtin interactome based on a novel BAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Soc. Neurosci. Abstracts* 764.5, 2007.
 28. Menalled L.B. Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx.* 2: 465-470, 2005.
 29. White JK, Auerbach W, Duyao MP et al. Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat. Genet.* 17: 404-410, 1997.
 30. Wheeler V.C., Gutekunst C.A., Vrbanac V., et al. Early phenotypes that presage late-onset neurodegenerative disease allow testing of modifiers in Hdh CAG knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* 11: 633-640, 2002.
 31. Sipione S, Rigamonti D, Valenza M, Zuccato C, Conti L, Pritchard J, Kooperberg C, Olson JM, Cattaneo E. Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses *Hum Mol Genet.* 11(17): 1953-65, 2002.
 32. Pal A, Severin F, Lommer B, Shevchenko A, Zerial M. Huntingtin-HAP40 complex is a novel mRab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *J. Cell Biol.* 172: 605-618, 2006.
 33. Gunawardena S., Her L.S., Brush R.G. et al. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in Drosophila. *Neuron* 40: 25-40, 2003.
 34. Rong J., McGuire J.R., Fang Z.H., et al. Regulation of intracellular trafficking of huntingtin-associated protein-1 is critical for TrkA protein levels and neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 26: 6019-6030, 2006.
 35. Trushina E., Dyer R.B., Badger J.D., et al. Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.* 24: 8195-8209, 2004.
 36. Ross C.A., Thompson L.M. Transcription meets metabolism in neurodegeneration. *Nat. Med.* 12: 1239-1241, 2006.
 37. Zucher B., Luthi-Carter R., Kama J.A. et al. Transcriptional dysregulation in striatal projection-and interneurons in a mouse model of Huntington's disease: neuronal selectivity and potential neuroprotective role of HAP1. *Hum. Mol. Genet.* 14: 179-189, 2005.
 38. Milnerwood A. J., Raymond L.A. Corticostriatal synaptic function in mouse models of Huntington's disease: Early effects of huntingtin repeat length and protein load. *J. Physiol.* 585: 817-831, 2007.
 39. Browne S.E., Beal M.F. The energetics of Huntington's disease. *Neurochem. Res.* 29: 531-546, 2004.
 40. Rego A.C., De Almeida L.P. Molecular targets and therapeutic strategies in Huntington's disease. *Curr. Drug Target CNS Neurol. Disord.* 4: 361-381, 2005.
 41. Gutekunst C.A., Li S.H., Yi H et al. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J. Neurosci.* 19: 2522-2534, 1999.
 42. Zhou H., Cao F, Wang Z et al. Huntingtin forms toxic NH2-terminal fragment complexes that are promoted by the age-dependent decrease in proteasome activity. *J. Cell Biol.* 163: 109-118, 2003.
 43. Li S.H., Li X.J. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trend Genet.* 20: 146-154, 2004.
 44. Kegel K.B., Meloni A.R., Yi Y et al. Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J. Biol. Chem.* 277: 7466-7476, 2002.
 45. Kegel K.B., Sapp E., Yoder J et al. Huntingtin associated with acidic phospholipids at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 280: 36464-36473, 2005.
 46. Truant R., Atwal R., Burtnik A. Hypothesis: Huntingtin may function in membrane association and vesicular trafficking. *Biochem. Cell. Biol.* 84(6): 912-917 Dec. 2006.
 47. Strehlow A. N., Li J. Z., Myers R. M. Wild-type huntingtin par-

- icipates in protein trafficking between the Golgi and the extracellular space. *Hum. Mol. Genet.* 16(4): 391-409, 2007.
48. Atwal R.S., Xia J., Pinchev D., Taylor J., Epanand R.M., Truant R. Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 16: 2600-2615, 2007.
 49. Orr A.L., Li S., Wang C.E et al. N-terminal mutant huntingtin associateds with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J.Neurosci.* 28. 2783-2792, 2008.
 50. Becher M. W., Kotzduk J. A., Sharp A. H et al. Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet reapeat length. *Neurobiol. Dis.* 4: 387-397, 1998.
 51. Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E.S., Segal M.R., Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431: 805-810, 2004.
 52. Slow E.J., Graham R.K., Osmand A.P et al. Absence of behavioural abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widwspread neuronal huntingtin inclusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11402-11407,2005.
 53. Wellington C.L., Singaraja R., Ellerby L et al. Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduced toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J. Biol.Chem.* 275: 19831-19838, 2000.
 54. Kim Y.J., Yi Y., Sapp E., Wang Y., Cuiffo B., Kegel K.B., Quin Z.H., Aronin N. and DiFiglia M.Caspase-3 cleavage N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associated with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12784-12789, 2001.
 55. Gafni J. and Ellerby L.M. Calpain activation in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 22, 4842-4849, 2002.
 56. Gafni J., Hermel E., Young J.E., Wellington C.L., Hayden M.R. and Ellerby L.M. Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J.Biol. Chem.* 279: 20211-20220, 2004.
 57. Lunke A., Lindenberg K. S., Ben Haiem L et al. Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol. Cell* 10: 259-269, 2002.
 58. Warby SC, Doty CN, Graham RK et al. Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically colocalize in the nucleus. *Hum Mol Genet.* 17(15):2390-404,2008.
 59. Cribbs D.H., Poon W.W., Rissman R.A. and Blurton-Jones M. Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease. *Am J. Pathol.* 165: 535-355, 2004.
 60. Haacke A., Broadley S. A., Boteva R., Tzvetkov N., Hartl F. U. and Breuer P. Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum. Mol.Genet.* 15: 555-568, 2006.
 61. Young J.E., Gouw L., Propp S et al. Proteolytic cleavage of ataxin-7 by caspase-7 modulates cellular taxicity and transcriptional dysregulation. *J.Biol.Chem.* 282: 30150-30160, 2007.
 62. Galvan V., Gorostiza O.F., Banwait S et al. Reversal of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:7130-7135. 2006.
 63. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293 (5529): 445-6, 2001.
 64. Xia J, Lee DH, Taylor J, Vandelft M, Truant R Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum.Mol. Genet.* 12: 1393-1403, 2003.
 65. Kuhn, A., D.R. Goldstein, A. Hodges, et al. Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum. Mol. Genet.* 16: 1845-1861, 2007.
 66. Bae, B.I., H. Xu, S. Igarashi, et al. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* 47: 29-41, 2005.
 67. Chen-Plotkin, A. S., G. Sadri-Vakili, G. J. Yohrling, et al. Decreased association of the transcription factor Sp1 with genes downregulated in Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 22: 233-241, 2006.
 68. Steffan, J.S., A.Kazantsev,O. Spasic-Boskovic, et al. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6763-6768, 2000.
 69. Gines, S., I.S. Seong, E. Fossale, et al. Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* 12: 497-508, 2003.
 70. Lee, J., C.H. Kim, D.K. Simon, et al. Mitochondrial cyclic AMP response element- binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *J. Biol. Chem.* 280: 40398-40401, 2005.
 71. St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397-408, 2006.
 72. Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N., Krainc,D. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127, 59-69, 2006.
 73. Ryan, A.B., S.O. Zeitlin and H. Scrabble. Genetic interaction between expanded murine Hdh alleles and p53 reveal deleterious effects of p53 on Huntington's disease pathogenesis. *Neurobiol. Dis.* 24, 419-427, 2006.
 74. Bezprozvanny I. Calcium signalling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* 15(3), 89-100, 2009.
 75. Kuhn A, Goldstein DR, Hodges A et al. Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet.* Aug 1; 16 (15): 1845-61, 2007.
 76. Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 31 (12): 609-16, 2008.
 77. Browne SE. Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: insight from genetic and chemical models. *Ann N Y Acad Sci.* 1147: 358-82, 2008.
 78. Li XJ, Orr AL, Li S. Impaired mitochondrial trafficking in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009, in press.
 79. Quintanilla RA, Johnson GV. Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. *Brain Res Bull.* 80 (4-5): 242-7, 2009.
 80. Qingmin Ruan, Mathieu Lesort, Marcy E. MacDonald and Gail V.W. Johnson. Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway. *Human Molecular Genetics*,13, No. 7 669-681, 2004.
 81. Tang TS, Slow E, Lupu V et al. Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2602-2607, 2005.
 82. Shehadeh J, Fernandes HB, Zeron Mullins MM et al. Striatal neuronal apoptosis is preferentially enhanced by NMDA receptor activation in YAC transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* 21, 392-403, 2006.
 83. Wu J, Tang T, Bezprozvanny I. Evaluation of clinically-relevant glutamate pathway inhibitors in in vitro model of Huntington's disease. *Neurosci. Lett.* 407, 219-223, 2006.
 84. Ondo WG, Mejia NI, Hunter CB A pilot study of the clinical efficacy and safety of memantine for Huntington's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*13, 453-454, 2007.
 85. Landwehrmeyer GB, Dubois B, de Yébenes JG et al. Riluzole in Huntington's disease: a 3-year, randomized controlled study. *Ann. Neurol.* 62, 262-272, 2007.
 86. Squitieri F, Orobello S, Cannella M, Martino T, Romanelli P, Giovacchini G, Frati L, Mansi L, Ciarmiello A. Riluzole protects Huntington disease patients from brain glucose hypometabolism and grey matter volume loss and increases production of neurotrophins. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 36 (7): 1113-20, 2009.
 87. Savani AA, Login IS. Tetrabenazine as antichorea therapy in

- Huntington disease: a randomized controlled trial. *Neurology* 68 (10): 797, 2007.
88. Tang TS, Chen X, Liu J, Bezprozvanny I. Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 27, 7899-7910, 2007.
89. Parker J. A., Arango M., Abderrahmane S et al. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet* 37, 349-350, 2005.
90. Anekonda T S, Reddy P H Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 96, 305-313, 2006.
91. Chaturvedi, R. K. and Beal, M. F. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 395-412, 2008.
92. Bachurin, S. O., Shevtsova, E. P., Kireeva, E. G., Oxenkrug, G. F., Sablin, S. O. Mitochondria as a target for neurotoxins and neuroprotective agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 993, 334-344, 2003.
93. Doody, R.S., Gavrilova, S.I., Sano, M et al. Effect of Dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* 372, 207-215, 2008.
94. Wu J, Li Q, Bezprozvanny I. Evaluation of Dimebon in cellular model of Huntington's disease. *Mol. Neurodegener.* 3, 15, 2008.
95. Thomas EA, Coppola G, Desplats PA, Tang B, Soragni E, Burnett R, Gao F, Fitzgerald KM, Borok JF, Herman D, Geschwind DH, Gottesfeld JM. The HDAC inhibitor 4b ameliorates the disease phenotype and transcriptional abnormalities in Huntington's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7; 105 (40): 15564-9, 2008.
96. Freeman TB, Hauser RA, Sanberg PR, Saporta S. Neural transplantation for the treatment of Huntington's disease. *Prog Brain Res* 127:405-411, 2000.
97. Freeman TB, et al. Transplantation of human fetal striatal tissue in Huntington's disease: rationale for clinical studies. Neural transplantation in neurodegenerative disease: current status and new directions. *Novartis Found Symp* 231: 129-144, 2000.
98. Peschanski M, Cesaro P, Hantraye P. Rationale for intrastriatal grafting of striatal neuroblasts in patients with Huntington's disease. *Neuroscience* 68: 273-285, 1995.
99. Victorin K Anatomy and connectivity of intrastriatal striatal transplants. *Prog Neurobiol* 38: 611-639, 1992.
100. Norman AB, Lehman MN, Sanberg PR. Functional effects of fetal striatal transplants. *Brain Res Bull* 22: 163-172, 1989.
101. Sanberg PR, Koutouzis TK, Freeman TB, Cahill DW, Norman AB. Behavioral effects of fetal neural transplants: relevance to Huntington's disease. *Brain Res Bull* 32: 493-496, 1993.
102. F. Cicchetti, Saporta S., Hauser R. A., Parent M., Saint-Pierre M., Sanberg P. R., Li X. J., Parker J. R., Y. Chu, E. J. Mufson, J. H. Kordower, and T. B. Freemanh. Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration. *PNAS* 106, 12483-12488, 2009.
103. Mann DM, Oliver R, Snowden JS. The topographic distribution of brain atrophy in Huntington's disease and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 85: 553-559, 1993.
104. Borovecki F, Lovrecic L, Zhou J. et al. Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *PNAS* 102 (31), 11023-11028, 2005.
105. Runne H., Kuhn A., Wild E.J. et al. Analysis of potential transcriptomic biomarkers for Huntington's disease in peripheral blood. *Medical Sciences*, 104, 14424-14429, 2007.

Gruppo Huntington udinese

Dr. Renata Lonigro

Responsabile per la Neurogenetica, responsabile del Progetto udinese sull' Huntington, Istituto di Genetica, A. O. U. di Udine

Dr. Elisa Bregant

Borsista titolare del Progetto udinese sulla malattia di Huntington

Dr. Nadia Passon

Dottoranda, Istituto di Genetica A. O. U. di Udine

Dr. Lorenzo Verriello

Neurologo, Dipartimento Interaziendale di Neurologia, A. O. U. di Udine

Dr. Giada Paoletto

Neurologo, Dipartimento Interaziendale di Neurologia, A. O. U. di Udine

Dr. Samanta Serpentine

Psicologa, Istituto di Genetica A. O. U. di Udine

Dr. Sergio Zanini

Neuropsicologo - Primario del DH-IRCCS E. Medea

Prof. Giuseppe Damante

Direttore dell'Istituto di Genetica A. O. U. di Udine

Prof. Paolo Bergonzi

Direttore del Dipartimento Interaziendale di Neurologia, A. O. U. di Udine

Dr. Bruno Lucci

Primario Neurologo Emerito Pordenone - Coordinatore unico del Progetto Gobessi-Huntington-SNO

Indirizzo:

Bruno Lucci

Via Trentino, 3

33015 Moggio Udinese (UD)

email: bruno.lucci@alice.it