

PROGRAMMA DI RICERCA

Richiesta di un assegno di ricerca finanziato su fondi PRIN 2022

TUTOR: PROF. STEFANO BASTIANINI

DIP. SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

Titolo Progetto:

Chemogenetic and Optgenetic Rescue of Sleep Apnea (CORSA) in mice

Il progetto CORSA

L'apnea ostruttiva del sonno (**OSA**) è un disturbo respiratorio caratterizzato dalla parziale o totale occlusione delle vie aeree con conseguente riduzione della ossigenazione del sangue (calo di saturazione dell'emoglobina). Questa condizione, ampiamente diffusa nella popolazione generale (6-17%) ed in particolare nei soggetti con sindrome di Down, si associa a frequenti risvegli notturni, frammentazione del sonno ed aumento del rischio cardiovascolare (PMID: 27583667). Tra le principali cause di OSA, ricopre un ruolo di rilievo la perdita di tonicità, durante il sonno, dei muscoli delle vie aeree superiori ed in particolare dei muscoli linguali. La lingua è un muscolo molto complesso e variegato ma il genioglosso (GG), il cui livello di contrazione è primariamente determinato dall'attività del XII nervo cranico (ipoglosso) ne rappresenta il principale componente. I motoneuroni del nervo ipoglosso sono situati nel tronco dell'encefalo a livello dei nuclei dell'ipoglosso (PMID: 33574581).

Il progetto **CORSA**, finanziato tramite il bando ministeriale PRIN2022, si pone l'obiettivo di fornire informazioni precliniche per nuove strategie terapeutiche nel trattamento dell'OSA. A questo scopo applicheremo le tecniche genetiche più recenti ed avanzate (in particolare con approcci di opto- e chemo-genetica) per modulare a distanza l'attività dei nuclei ipoglossi e, attraverso ciò, per contrarre i muscoli linguali nel tentativo di

prevenire l'ostruzione delle vie aeree superiori durante il sonno nei topi Ts65Dn, un modello murino di sindrome di Down con OSA.

Obiettivi CORSA

Il progetto CORSA, si avvarrà della stretta collaborazione tra fisiologi dell'Università di Bologna (UNIBO) e di Firenze (UNIFI) con i seguenti specifici obiettivi:

- UNIBO effettuerà studi in vivo sui topi ingegnerizzati con tecnologia di chemo- o optogenetica e registrerà il fenotipo ipnico e respiratorio in presenza o assenza di stimolazione dei nuclei ipoglossi;
- UNIFI effettuerà studi elettrofisiologici in vitro per caratterizzare e validare la stimolazione chemo- e optogenetica dei nuclei ipoglossi e, inoltre, sarà responsabile delle analisi istologiche di conferma post-mortem.

Le 2 unità del progetto CORSA, grazie alla loro competenza consolidata, applicheranno tecniche avanzate e golden standard per l'iniezione in vivo (intralinguale o nel tronco encefalico di vettori virali, impianto di fibre ottiche, pletismografia corporea totale con rilevazione del ciclo veglia-sonno), in vitro (registrazioni di patch clamp di cellule intere) e studi istologici post-mortem (colorazione immunofluorescente singola o doppia).

Attività sperimentale

Il progetto CORSA si compone di 2 esperimenti:

EXP1: Approccio Chemogenetico per la cura dell'OSA

Topi maschi adulti Ts65Dn verranno anestetizzati con isoflurano (2% in ossigeno puro) e verranno iniettati con costrutti virali (virus adeno-associati, AAV) contenenti le informazioni genetiche per codificare specifici recettori attivabili solo tramite somministrazione di CNO. Il gruppo di animali di controllo verrà iniettato con AAV senza tali informazioni genetiche. Le iniezioni verranno fatte bilateralmente nel segmento

dorso-caudale della lingua (10 microlitri in totale). Quattro settimane dopo le iniezioni, ogni topo verrà operato per applicare una serie di elettrodi utili per rilevare il profilo di sonno (EEG ed EMG nucale) e l'attività del muscolo diaframmatico (DIA) (PMID: 34509609). Una settimana dopo, i segnali elettrici di ciascun topo verranno registrati in 2 distinte sessioni (di 7 ore ciascuna) intervallate da 1 giorno di riposo. La mattina di ogni sessione, i topi saranno blandamente anestetizzati e si eseguirà una iniezione intraperitoneale di CNO (1 mg/kg) o di soluzione salina (come controllo). Successivamente il topo sarà alloggiato in una camera pletismografica dove sarà possibile monitorarne anche il fenotipo respiratorio (e dunque l'eventuale comparsa di OSA) (PMID: 34509609). Dopo aver completato le registrazioni in vivo, i topi verranno utilizzati per i controlli istologici.

EXP2: Approccio Optogenetico per la cura dell'OSA

Topi maschi adulti Ts65Dn verranno anestetizzati con isoflurano (2% in ossigeno puro) e verranno iniettati con AAV contenenti le informazioni genetiche per codificare specifici recettori attivabili solo tramite stimolazione luminosa. Il gruppo di animali di controllo verrà iniettato con AAV senza tali informazioni genetiche. Le iniezioni verranno fatte con uno stereotassico direttamente nei nuclei dell'ipoglosso. Quattro settimane dopo le iniezioni, ogni topo verrà operato per applicare una serie di elettrodi utili per rilevare il profilo di sonno (EEG ed EMG nucale), l'attività del muscolo diaframmatico (DIA). Verrà inoltre applicata una cannula a fibre ottiche direttamente sopra ai nuclei ipoglossi. Una settimana dopo, i segnali elettrici di ciascun topo verranno registrati in 2 distinte sessioni (di 7 ore ciascuna) intervallate da 1 giorno di riposo. La mattina di ogni sessione, i topi saranno blandamente anestetizzati e alloggiati singolarmente in una camera pletismografica dove sarà possibile monitorarne anche il fenotipo respiratorio (e dunque l'eventuale comparsa di OSA). Durante una delle 2 giornate, si procederà a stimolare otticamente i nuclei ipoglossi durante ogni fase di REM mentre nella restante

giornata, questa stimolazione non verrà applicata (condizione di controllo). Dopo aver completato le registrazioni in vivo, i topi verranno utilizzati per i controlli istologici.

PROGRAMMA DI FORMAZIONE DELL'ASSEGNISTA

Richiesta di un assegno di ricerca finanziato su fondi PRIN 2022

TUTOR: PROF. STEFANO BASTIANINI

DIP. SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

Titolo

Chemogenetic and Optgenetic Rescue of Sleep Apnea (CORSA) in mice

Piano di attività e formazione dell'Assegnista

Il o la titolare dell'assegno sarà costantemente supervisionato/a dal PI del progetto CORSA, Prof. Stefano Bastianini, e sarà prevalentemente coinvolto/a nelle seguenti attività:

- Gestione colonie di topi geneticamente modificati
- Chirurgia per impianto elettrodi, iniezioni AAV in lingua e tramite stereotassico, registrazioni in pletismografia
- Analisi dati e scrittura articoli scientifici

Il tutor e il PRISM Lab ha comprovata esperienza nei metodi sopramenzionati (PMID: 34509609).

Tali attività si svolgeranno primariamente presso il PRISM lab del Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, piazza di Porta San Donato 2, Bologna.

Il PRISM lab è totalmente attrezzato per svolgere le attività sopra-elencate ed è in grado di fornire al/alla titolare dell'assegno una formazione completa e personalizzata. In questo modo, il/la titolare dell'assegno potrà partecipare in maniera attiva sia agli aspetti pratici che teorici relativi alla fisiopatologia delle apnee ostruttive del sonno e su potenziali nuove vie curative per questa condizione.

Il/la titolare lavorerà interagendo strettamente con il tutor, che istruirà l'assegnista allo svolgimento e analisi di tutta l'attività proposta. L'assegnista inoltre parteciperà a

riunioni interne con il Pi ed i membri dello staff per la programmazione delle attività e l'analisi dei risultati ottenuti. Al termine dell'attività il/la titolare terrà un seminario per l'esposizione dei risultati conseguiti. Il/La titolare avrà modo di partecipare a congressi nazionali ed internazionali sul sonno e le neuroscienze (ad es., Società Italiana di Fisiologia, Società Italiana di Neuroscienze, Società Italiana di Neurologia, Associazione Italiana di Medicina del Sonno, European Sleep Research Society, Federation of European Neuroscience Societies).