

# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA**

**Dottorato di Ricerca in**  
**Morfologia e funzione normale e patologica di cellule e tessuti**

***MECCANISMI COINVOLTI NELLA FORMAZIONE DEGLI***  
***INCLUSI NEURONALI NELLE CELLULE STRIATALI***

**Coordinatore**

Chiar.mo Prof Antonio Paparelli

**Relatore:**

Dott.ssa Paola Lenzi

**Candidata:**

Dott.ssa Lisa Celati

## SOMMARIO

INDICE FIGURE.....	4
1. INTRODUZIONE.....	5
Il sistema Ubiquitina-Proteasoma .....	5
Malattie neurodegenerative.....	9
Inclusi.....	12
METH e DA.....	17
Progetto della tesi.....	21
2. MATERIALI E METODI.....	23
Disegno sperimentale.....	23
<i>Esperimenti in vivo</i> .....	23
<i>Esperimenti in vitro</i> .....	23
Procedure sperimentali.....	24
<i>Chirurgie</i> .....	24
<i>Trattamenti farmacologici</i> .....	25
<i>Misura delle specie reattive all'ossigeno (ROS)</i> .....	25
<i>Saggi biochimici per la valutazione della DA e dei suoi metaboliti</i> .....	26
<i>Preparazione delle colture primarie</i> .....	27
<i>Colture delle cellule PC12</i> .....	27
<i>Morfologia</i> .....	27
<i>Immunocitochimica</i> .....	28
<i>Immunolettromicroscopia - Tecniche di post-inclusione</i> .....	29
<i>SDS-Page Immunoblotting</i> .....	30
<i>Attività del Proteasoma</i> .....	30
<i>Analisi statistica</i> .....	31
3. RISULTATI.....	32
<i>Esperimenti in vivo</i> .....	32
<i>Effetti della 6-OH-DA, dell' <math>\alpha</math>MpT e della METH sul sistema nigrostriatale</i> .....	32

<i>Effetti della 6-OH-DA e dell' <math>\alpha</math>MpT sui cambiamenti post-sinaptici dello striato indotti dalla METH</i> .....	34
Esperimenti <i>in vitro</i> .....	35
<i>La DA produce effetti subcellulari nelle colture primarie di cellule striatali, mentre la METH da sola no</i> .....	35
<i>La DA induce immuno-positività all'ubiquitina e all' <math>\alpha</math>-sinucleina nelle colture striatali</i> .....	37
<i>Correlazione fra la morte delle cellule e la formazione degli inclusi</i> .....	40
<i>Effetti della DA e della METH sull'attività del proteasoma in presenza (cellule PC12) o in assenza (cellule striatali) di dopamina endogena</i> .....	41
<i>Sinergismo fra DA e inibitori del sistema UP</i> .....	43
<i>Effetti degli antagonisti e degli agonisti dei recettori dopaminergici</i> .....	44
4. DISCUSSIONE .....	48
5. CONCLUSIONI .....	52
BIBLIOGRAFIA .....	53

## INDICE FIGURE

Figura 1.1 .....	7
Figura 1.2 .....	8
Figura 1.3 .....	11
Figura 1.4.....	13
Figura 1.5 .....	14
Figura 1.6 .....	16
Figura 1.7 .....	18
Figura 3.1 .....	33
Figura 3.2.....	34
Figura 3.3 .....	36
Figura 3.4.....	37
Figura 3.5 .....	39
Figura 3.6.....	40
Figura 3.7.....	42
Figura 3.8.....	43
Figura 3.9.....	45
Figura 3.10.....	47

# 1. INTRODUZIONE

## **Il sistema Ubiquitina-Proteasoma**

Il sistema Ubiquitina-Proteasoma (UP) è un complesso proteolitico responsabile della degradazione intracellulare delle proteine danneggiate, coinvolte nel mantenimento e nella regolazione di vari processi cellulari. Tali proteine possono essere sia nucleari che citosoliche, proteine regolatorie di vita breve (come cicline, inibitori delle cicline, prodotti oncogeni etc.), e anche la gran parte delle proteine cellulari di vita più lunga. Il sistema UP di solito degrada il substrato in piccoli peptidi, e in alcuni casi la degradazione può portare a frammenti di proteine ancora biologicamente attivi.

Il sistema UP è costituito dal proteasoma 26S, un complesso proteasico multicatalitico che si trova nel citoplasma e nel nucleo delle cellule eucariotiche. Due complessi regolatori 19S, legati alle estremità del complesso catalitico 20S, formano il proteasoma 26S: i complessi 19S cap contengono subunità con attività ATP-asi e subunità capaci di legare e riconoscere sia catene di poliubiquitina sia proteine chaperonine, le quali dispiegano le catene proteiche destinate alla degradazione e le trasportano nella cavità interna del nucleo del proteasoma 20S (Wolf DH, Hilt W, 2004), dove si trovano le funzioni enzimatiche del proteasoma (Adams et al , 1999).

Il substrato entra nel complesso 20S procedendo con un meccanismo multifasico, che sembra essere controllato dal complesso 19S, per raggiungere il sito attivo. In concomitanza con il passaggio dei polipeptidi nella camera proteolitica, i substrati sono convertiti in peptidi e la proteolisi continua fino a che i frammenti sono così piccoli da lasciare il sistema per diffusione.

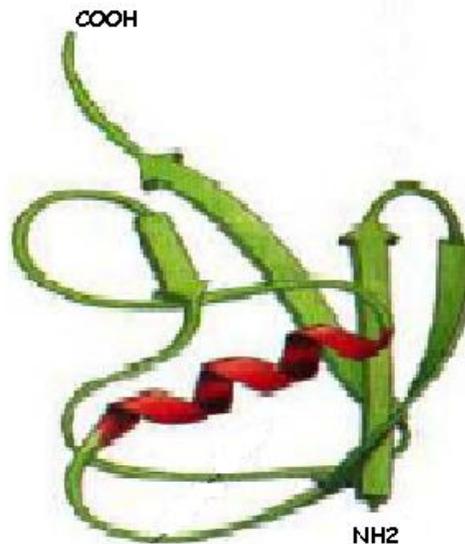
La subunità 20S è il nucleo del complesso, formato da 4 anelli, 2 anelli  $\alpha$  esterni e 2 anelli  $\beta$  interni, ognuno dei quali è costituito da 7 diverse subunità  $\alpha$  e 7 diverse subunità  $\beta$  (per un totale di 28 proteine), affiancate nei vertebrati da 3 subunità indotte dall'interferone e implicate nella reazione antigenica.

Negli organismi superiori non tutte le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  sono uguali tra di loro, alcune sono funzionali ed altre no ed inoltre le funzioni possono essere differenti. Negli organismi inferiori invece tali subunità sono solitamente identiche.

Studi biochimici sul proteasoma 20S hanno rivelato almeno 3 differenti attività proteolitiche chiamate chimotripsina-simile (ChTL), tripsina-simile (TL) e peptidilglutamilpeptide idrolizzante (PGPH) e 2 attività minori, una per gli aminoacidi ramificati e una per gli aminoacidi neutri. Di queste attività la ChTL sembra essere la più importante, dal momento che l'uso di inibitori specifici di questa porta ad un rapido accumulo di proteine ubiquitinate, alla vacuolizzazione cellulare, al blocco del ciclo cellulare e all'apoptosi (De Martino Slaughter, 1999; Myung et al, 2001).

La capacità di degradazione della subunità 20S è limitata ai peptidi corti e non ubiquitinati, mentre le proteine destinate alla degradazione da parte del proteasoma 26S sono preventivamente riconosciute e legate dal polipeptide ubiquitina (U), una proteina globulare compatta di 76 aminoacidi, di peso molecolare 8500 Dalton, la cui sequenza è costante in specie molto diverse, dai lieviti all'uomo.

Il processo, detto ubiquitinazione, procede attraverso una reazione di vari passaggi che richiedono l'intervento di tre classi di enzimi: il primo attiva l'U (E1) formando un legame tio-esterico ad alta energia (con idrolisi di ATP) tra un proprio residuo di cisteina e un C-terminale di un residuo di glicina dell'U.

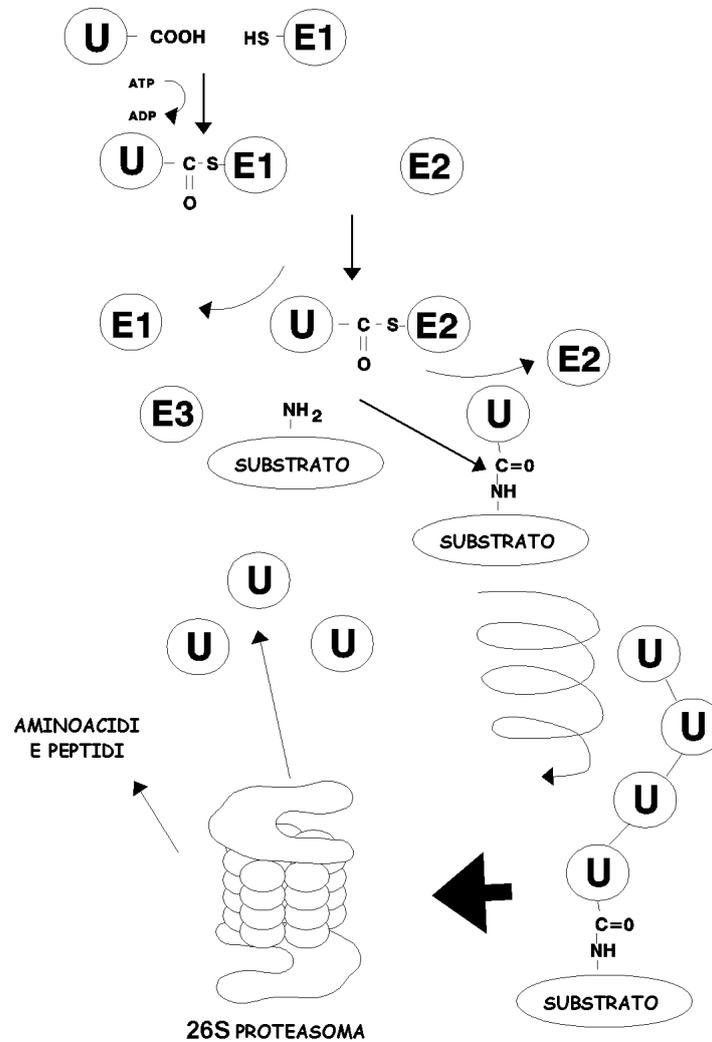


**Figura 1.1.**

L'ubiquitina mostra una parte globulare idrofobica in rosso, e il carbossile terminale che rappresenta il punto di attacco alla catena laterale di lisina di una proteina.

Il sito attivo dell'U si lega poi ad un'altra cisteina all'enzima E2, ubiquitina-coniugante, attraverso una reazione di trans(tio)esterificazione; infine l'ubiquitina-proteina-ligasi (E3) catalizza la formazione di un legame covalente tra l'U e la proteina bersaglio generando legami isopeptidici (Myung et al, 2001). Sebbene non siano completamente noti i segnali che innescano il terzo passaggio, ne è stato proposto uno molto semplice che riguarda il solo aminoacido ammino-terminale della proteina bersaglio, che sarebbe dunque l'unico discriminante per il legame con l'enzima E3. Molti cicli di ubiquitinazione portano alla sintesi di catene di poliubiquitina, che servono da segnale di riconoscimento per l'avvio della degradazione della proteina bersaglio da parte del sistema UP 26S. Infatti il riconoscimento del proteasoma nei confronti delle proteine da degradare è di tipo generalmente specifico, esso infatti le individua soltanto per il fatto che sono legate alla catena di poliubiquitina. Successivamente, con consumo energetico, srotola la proteina e la degrada. Una volta avvenuta la proteolisi le molecole di poliubiquitina vengono depolimerizzate per essere

riciclate (Myung et al, 2001), grazie anche alla famiglia proteica delle DUBs. Tuttavia vi sono proteine come l' $\alpha$ -sinucleina e piccoli peptidi possono entrare nel proteasoma senza il legame con l'ubiquitina.



**Figura 1.2.**

L'enzima E1 (enzima di attivazione dell'U) utilizza l'energia di una molecola di ATP per legarsi all'U con un legame tioesterico; l'enzima E2 (enzima di coniugazione dell'U) è indispensabile per il riconoscimento della proteina da degradare; l'enzima E3 (ubiquitina-proteina ligasi) trasferisce l'ubiquitina da E2 alla proteina da degradare, formando un legame ammidico tra l'ubiquitina e una lisina della proteina da legare; il processo di ubiquitinazione deve compiersi più volte prima che la proteina venga

eliminata dal proteasoma (catena di poliubiquitina); poi la proteina viene degradata con consumo energetico in parti lunghe da 3 a 23 aminoacidi, nella parte centrale (20S) del proteasoma, e in molecole di ubiquitina riciclabili.

Il sito attivo del proteasoma è dato da treonine attive appartenenti ad alcune subunità  $\beta$  degli anelli centrali; queste treonine sono responsabili del taglio proteolitico per cessione del loro gruppo ossidrilico. Grazie alla differenza delle varie subunità  $\beta$  il taglio proteolitico può avvenire accanto ad un aminoacido idrofobico, basico oppure acido. Per evitare danni cellulari, le varie subunità  $\beta$  vengono all'inizio sintetizzate come precursori inattivi (pre- $\beta$ ), con un peptide aggiuntivo all'estremità N-terminale e solo dopo il completo assemblaggio dei 2 anelli verranno attivate tramite taglio proteolitico (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/microprot.html>; <http://www.nottingham.ac.uk/biochemcourses/students/ub/ubintro.html>).

### **Malattie neurodegenerative**

Il mal funzionamento del sistema UP contribuisce alla patogenesi di molte malattie neurodegenerative, autoimmuni, genetiche, metaboliche oltre al cancro. Tali situazioni patologiche mostrano un accumulo anormale e una composizione alterata dei componenti del sistema UP.

Di recente studi clinici e sperimentazioni *in vivo* e *in vitro* hanno mostrato che le aberrazioni del sistema UP sono strettamente correlabili ad alcune malattie neurodegenerative come la Malattia di Alzheimer, la Malattia di Parkinson e malattie ereditarie nelle quali il marcatore eziologico è noto che sia la mutazione dei geni dell' $\alpha$ -sinucleina e della Leucine Repeat Rich Kinase 2.

La Malattia di Alzheimer, la più comune forma di demenza senile, è caratterizzata dalla progressiva degenerazione e dalla perdita dei neuroni corticali e del sistema limbico, accompagnato dall'accumulo di peptidi  $\beta$ -amiloidi in placche extracellulari e di grovigli intracellulari neurofibrillari, composti entrambi da proteine Tau iperfosforilate, da U e da varie subunità proteasomiche, rilevate con l'immunoistochimica.

Dal momento che i peptidi  $\beta$ -amiloidi inibiscono selettivamente l'attività della chimotripsina peptidasi del proteasoma 26S, che conduce ad un aumento della produzione  $\alpha$ -secretasi-dipendente di  $\beta$ -amiloidi e dei propri precursori, è stato proposto che l'inibizione del sistema UP, nel contesto del metabolismo dei  $\beta$ -amiloidi patologico, contribuisca almeno in parte alla patogenesi della Malattia di Alzheimer.

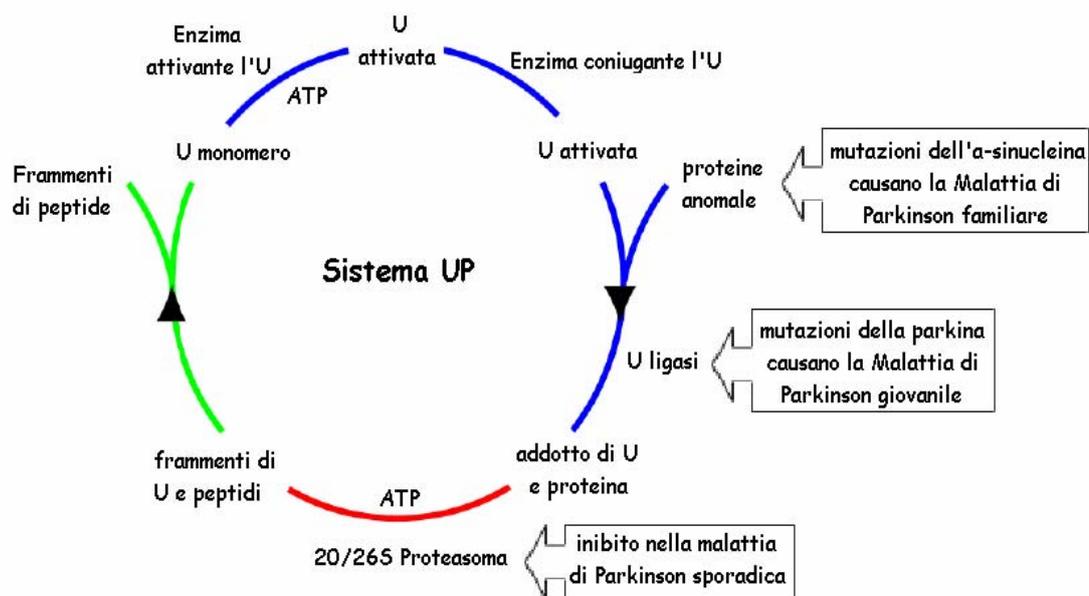
Nuovi studi hanno mostrato un coinvolgimento più complesso del proteasoma in questa malattia: forme mutanti di U, chiamate Ub (+1) e Ubb+1, sono espresse nei neuroni in degenerazione e competono per l'ubiquitinazione delle proteine bersaglio, inibendo la degradazione proteica da parte dell'UP e provocando apoptosi neuronale. Inoltre le proteine Tau che costituiscono i filamenti dei grovigli neurofibrillari sono degradate dal proteasoma 26S, ma i filamenti elicoidali pari sono in grado di inibire la degradazione proteica da parte del proteasoma, portando ad un circolo vizioso.

La Malattia di Parkinson è un disturbo del movimento, caratterizzata dalla perdita selettiva dei neuroni dopaminergici della sostanza nera pars compacta e dalla formazione di inclusioni citoplasmatiche (corpi di Lewy) nei neuroni dopaminergici residui e in varie aree del sistema nervoso centrale. Il meccanismo patogenetico della malattia coinvolge tre percorsi: l'aggregazione di proteine (Dawson & Dawson, 2003; Lee, 2003), la mancata degradazione proteica (Eriksen et al., 2003), e lo stress ossidativo cellulare correlato alle disfunzioni mitocondriali (Betabert et al., 2000; Shults, 2004; Dawson & Dawson, 2003); questi tre processi possono sovrapporsi e interagire.

Infatti, segno patognomonico della Malattia di Parkinson sono i corpi di Lewy, inclusi citoplasmatici costituiti da accumuli di proteine. In particolare l' $\alpha$ -sinucleina risulta essere il principale componente di tali inclusioni (Spillantini et al., 1997), tale proteina non appartiene al sistema UP ma interagisce con l'U come substrato dell'UP. L' $\alpha$ -sinucleina è una proteina presinaptica ampiamente espressa nel sistema nervoso centrale, in grado di dare strutture fibrillari, con un meccanismo che sembra dipendere dall'alterazione del processo di sintesi e turn-over della proteina stessa (C.W. Shults, 2006). È stato infatti dimostrato che l'accumulo di  $\alpha$ -sinucleina favorisce la sua aggregazione in protofibrille che risultano particolarmente stabili perché non degradabili dal sistema UP, e porta così alla precipitazione di tali aggregati sottoforma

di inclusioni, che successivamente risultano contenere anche altre proteine, come l'ubiquitina.

Forme familiari di Malattia di Parkinson sono dovute ad una iperespressione o a mutazioni del gene dell' $\alpha$ -sinucleina e di altri geni che codificano per proteine del sistema UP, determinandone una riduzione dell'attività: fra questi, il gene che codifica per la parkina, E3 ubiquitina-proteina ligasi, e quello che codifica per l'ubiquitina-C-idrolasi-L1. Inoltre, è stata dimostrata una significativa riduzione dell'attività dell'UP anche in pazienti affetti dalla forma idiopatica della Malattia (McNaught et al., 2001). Ciò suggerisce che la riduzione di attività del proteasoma possa giocare un ruolo critico nell'insorgenza della Malattia di Parkinson.



**Figura 1.3.**

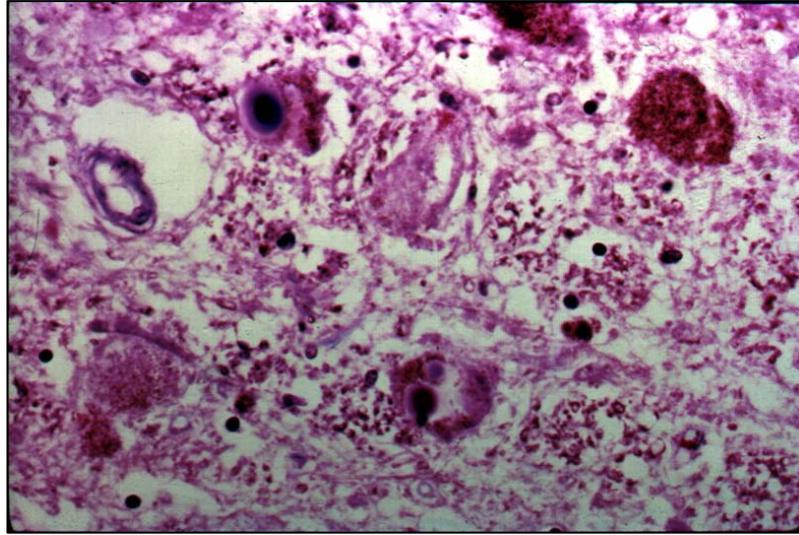
Degradazione delle proteine anomale o danneggiate da parte del sistema UP e sue alterazioni nella Malattia di Parkinson.

Inoltre i mitocondri hanno un ruolo centrale nell'omeostasi cellulare, infatti quando sono alterati possono indurre il rilascio di molecole pro-apoptotiche con conseguente degenerazione cellulare. Gli stessi aggregati di  $\alpha$ -sinucleina formando strutture simili a pori si possono inserire nella membrana esterna mitocondriale, in modo da permettere il passaggio di molecole dallo spazio intermembrana nel citosol inducendo un malfunzionamento del mitocondrio stesso, in particolare del complesso I, e indurre il rilascio del citocromo C che a sua volta induce l'attivazione delle caspasi.

### **Inclusi**

Nel 1912 Lewy descrisse per primo inclusi intraneuronali in pazienti parkinsoniani; li descrisse non nella substantia nigra ma nel nucleo basale del Meynert e nel nucleo dorsale motorio del nervo vago. I corpi di Lewy sono stati osservati anche in casi di Malattia di Parkinson genetica, compresa quella dell' $\alpha$ -sinucleina e della Leucine Repeat Rich Kinase 2, e inoltre sono stati descritti inclusi simili ai corpi di Lewy anche in modelli animali di Malattia di Parkinson dopo somministrazione di inibitori mitocondriali e del sistema UP. I corpi di Lewy sono stati osservati in altre malattie neurologiche: la demenza da corpi di Lewy, la Malattia di Alzheimer, compresi casi di Malattia di Alzheimer familiare, sindrome di Down, degenerazioni con accumulo di ferro tipo I (Malattia di Hallervorden-Spatz), disordine del sonno REM, Malattia di Guam, Malattia di Gaucher e Malattia di Pick. Questo, insieme al fatto che i corpi di Lewy si trovino in vari tipi di cellule nervose induce a pensare che ci sia un complesso di eventi comuni che portano alla formazioni di tali inclusioni.

Al microscopio ottico i corpi di Lewy appaiono colorati con ematossilina/eosina, mostrando una parte centrale molto densa. Sono marcabili con U e  $\alpha$ -sinucleina: la diversa concentrazione dei due marcatori nelle inclusioni suggerisce che, attraverso un processo dinamico, si giunga alla struttura finale dei corpi di Lewy che si presenta costituita da un *core* denso, marcabile con l'ubiquitina, e da un alone esterno marcabile con l' $\alpha$ -sinucleina. Dei due marcatori l' $\alpha$ -sinucleina rappresenta il marcatore specifico, perché la positività all' $\alpha$ -sinucleina è presente fin dai primi stadi di formazione delle inclusioni citoplasmatiche (Gomez-Tortosa, 2000).

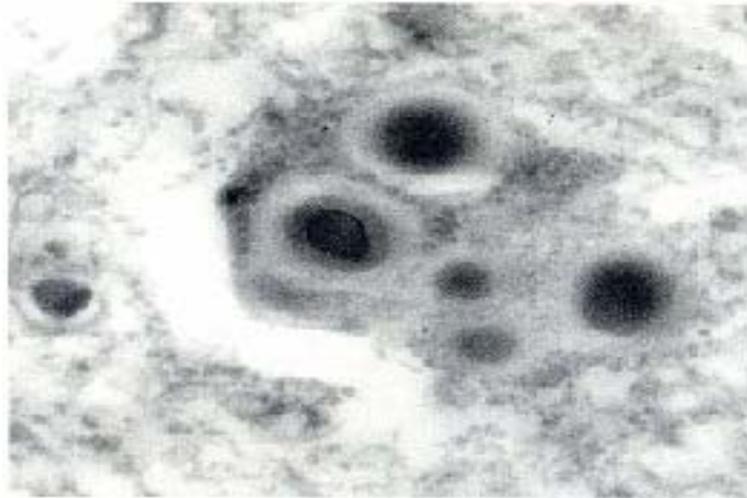


**Figura 1.4.**

Neurone osservato al microscopio ottico con inclusioni citoplasmatiche eosinofile circondate da un alone.

Al microscopio elettronico i corpi di Lewy sono stati osservati a livello intracitoplasmatico ma anche in sede extracitoplasmatica, descrivendone due tipi (Roy e Wolman, 1969; Arima et al., 1998).

Il tipo più comunemente rilevato è quello formato da componenti fibrillari, disposte radialmente alla periferia, e granulari disposti centralmente; quello meno comune è composto interamente di materiale circolare o fibrille ovalari, e al microscopio ottico mostra una densità omogenea. L' $\alpha$ -sinucleina che risulta il principale componente dei corpi di Lewy è localizzata principalmente nei filamenti periferici e poca nei granuli nella parte centrale (Shults, 2006).



**Figura 1.5.**

Cellula nervosa della sostanza nigra con 5 corpi di Lewy osservata al microscopio elettronico (da L. Forno, 1996).

Sebbene la funzione dell' $\alpha$ -sinucleina non sia chiara, è stata dimostrata, dopo trattamento con METH, la sua unione con le vescicole sinaptiche ed è quindi ipotizzabile un suo ruolo attivo nel rilascio di neurotrasmettitori (Iwai, A., 2000; Eliezer et al., 2001), nella plasticità sinaptica (Murphy et al., 2000) e nel trasporto delle vescicole entro i neuroni (Abeliovich.,2000).

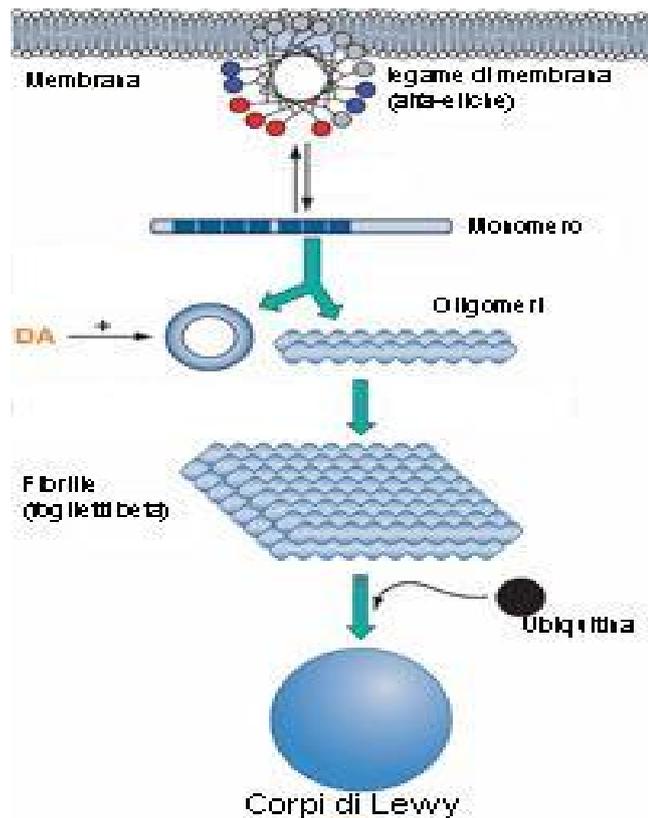
Studi su topi  $\alpha$ -sinucleina knockout (Abeliovich et al., 2000) indicano che sebbene l' $\alpha$ -sinucleina non sia indispensabile per il normale sviluppo del sistema nervoso, possa essere comunque coinvolta nella regolazione a lungo termine e nel mantenimento della funzione presinaptica (Chandra et al., 2004), e in particolare sia necessaria per la genesi, la localizzazione e/o il mantenimento di alcune delle vescicole che rappresentano il pool di riserva presinaptico (Cabin et al., 2002).

L' $\alpha$ -sinucleina è composta da 140 aminoacidi ed il suo gene contiene 7 esoni, 5 dei quali sono proteine codificanti (Goedert, 2001). Tale proteina risulta essere non strutturata in condizioni fisiologiche e caratterizzata da 3 distinte regioni, denominate regioni N-terminale (1-60), centrale (NAC) (61-95) e C-terminale (96-140). In seguito all'interazione con vescicole di fosfolipidi, la parte N-terminale adotta una

conformazione elicoidale (Weinreb et al., 1996; Davidson et al., 1998; Chandra et al., 2003).

Inoltre la regione NAC è altamente amiloidogena e conferisce alla proteina la capacità di modificarsi a formare foglietti  $\beta$  (Serpell et al., 2000; El-Agnaf et al., 2000), mentre la regione C-terminale rimane distesa e non si unisce alle vescicole (Eliezer et al., 2001).

E' stato valutato che le fibrille di  $\alpha$ -sinucleina possano non essere tossiche, ma che lo siano piuttosto i precursori detti protofibrille. Questi, come le fibrille di  $\alpha$ -sinucleina, sono composti da strutture a foglietti  $\beta$  (Uversky and Fink, 2002); l' $\alpha$ -sinucleina prima forma protofibrille sferiche che progrediscono in aggregati ad anello, e alcuni o tutti si convertono in fibrille. Nelle colture cellulari l'iperespressione di  $\alpha$ -sinucleina o il trattamento con inibitori mitocondriali porta a due forme distinte di aggregati, piccole sfere di  $\alpha$ -sinucleina, che si formano prima, e successivamente inclusi più grandi.



**Figura 1.6.**

Probabile processo dinamico di aggregazione dell' $\alpha$ -sinucleina: la figura indica che l' $\alpha$ -sinucleina normalmente si trova in equilibrio tra le membrane e il citosol (in forma lineare se in soluzione, in strutture simil-elicoideali se associata con le membrane). In condizioni patologiche, compresa la Malattia di Parkinson, l' $\alpha$ -sinucleina si aggrega, passando attraverso piccoli oligomeri, fino a formare grosse fibrille, eventualmente depositate nei corpi di Lewy.

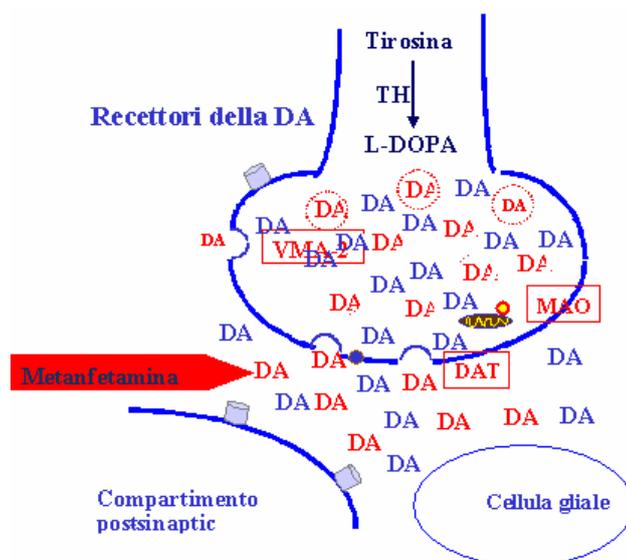
L' $\alpha$ -sinucleina forma addotti con la dopamina (DA) che sembrano rallentare la conversione di protofibrille in fibrille: ciò spiegherebbe l'attitudine dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta a danneggiarsi. Sembra che l' $\alpha$ -sinucleina possa danneggiare le cellule attraverso un meccanismo consistente nel fatto che le protofibrille rendono permeabili le vescicole fosfolipidiche attraverso la formazione di pori. E' plausibile che una quantità eccessiva di  $\alpha$ -sinucleina possa saturare il meccanismo responsabile della distruzione delle proteine aberranti, e quindi interferire con la normale fisiologia cellulare, portando eventualmente al danno e alla

morte della cellula, come avviene nei pazienti che hanno mutazioni del gene della parkina ma non presentano corpi di Lewy; infatti esperimenti su topi knockout per la parkina hanno mostrato disfunzioni mitocondriali, come nei disordini della funzionalità del sistema UP, che si verifica in concomitanza di una eccessiva espressione dell' $\alpha$ -sinucleina (C.W. Shults, 2006).

### **METH e DA**

La metamfetamina (METH) è un potente psicostimolante, ed è altamente tossica per le vie centrali dopaminergiche. Gli abusatori di METH mostrano una riduzione dei livelli cerebrali dei trasportatori per la DA, e di altri marcatori biochimici dei terminali dopaminergici.

I bersagli molecolari della METH sono localizzati a livello dei terminali nervosi, all'interno dei quali essa penetra sfruttando il trasportatore del neurotrasmettitore, localizzato sulla membrana del terminale (Rudnick e Wall, 1992). Passata all'interno del terminale, penetra nelle vescicole sinaptiche sia per diretta interazione con il trasportatore vescicolare che per diffusione passiva, ne dissipa il pH e provoca così il rilascio citosolico del neurotrasmettitore in esse immagazzinato (Sulzer e Rayport, 1990). Il terzo bersaglio molecolare delle molecole amfetaminiche è rappresentato dalle monoaminoossidasi (MAO), enzimi responsabili del metabolismo ossidativo delle monoamine. Le MAO, localizzate sulla membrana esterna mitocondriale, ma aventi il sito enzimatico rivolto sul versante citosolico, vengono inibite dai derivati amfetaminici (Leonardi e Azmitia, 1994). Pertanto, l'alta concentrazione citosolica extravescicolare di neurotrasmettitore, prodotta dalle amfetamine, induce un'inversione nella direzione del trasporto del trasportatore di membrana, che porta al riversamento del neurotrasmettitore all'esterno del terminale (Raiteri et al., 1978; Rudnick e Wall, 1992).



**Figura 1.7.**

Effetti acuti della METH.

La METH è tossica per i terminali dopaminergici nigrostriatali sia negli uomini che nei modelli animali. Nei topi iniezioni consecutive di METH inducono una degenerazione massiva del sistema nigro-striatale, che si riflette nel dimezzamento dei livelli di DA striatale e di acido 3,4 di-idrossi-fenil-acetico (DOPAC), in una sostanziale riduzione della tirosina idrossilasi e del trasportatore della DA nello striato. La degenerazione del sistema nigro-striatale indotto dalla METH risulta ampiamente attenuato nei topi ai quali mancano i recettori adrenergici  $\alpha 1b$ , e risultano ridotti anche il rilascio di DA striatale stimolato dalla somministrazione di METH e l'attività locomotoria.

La somministrazione di METH (5 mg/kg X 3 i.p., con un intervallo di 2 ore) in topi causa la comparsa di inclusioni intracellulari nel nucleo dei neuroni striatali e nel citoplasma dei neuroni della substantia nigra pars compacta (Fornai et al, 2004a), che si marciano specificamente per l' $\alpha$ -sinucleina e l'U; è stato inoltre dimostrato

recentemente, che anche gli abusatori di METH presentano inclusi nei neuroni dopaminergici della substantia nigra (Quan et al, 2005).

La METH agisce selettivamente sul terminale dopaminergico striatale determinando un rilascio di DA, che si ridistribuisce dalle vescicole al citosol e da qui allo spazio extracellulare (Sulzer e Rayport, 1990), spiegando il rapido depauperamento delle riserve intraneuronali di DA, che induce la degenerazione del sistema nigrostriatale caratteristica della Malattia di Parkinson (Ricaurte et al.1982; Seiden et al.1987).

Tutte le inclusioni cellulari presenti nei topi trattati con METH contengono l'ubiquitina, l'enzima attivante l'ubiquitina (E1), l'E3 (parkina) e le "heat shock proteins" ad alto (HPS-70) e basso (HPS-40) peso molecolare. La formazione di inclusioni citoplasmatiche è stata osservata anche in cellule PC12 in coltura trattate con METH. Le cellule PC12 in coltura offrono il vantaggio di fornire un modello cellulare semplice per lo studio della morfologia e dei determinanti molecolari delle inclusioni, essendo cellule catecolaminergiche capaci di sintetizzare e rilasciare DA (Fornai et al, 2007).

Le inclusioni presenti nelle cellule PC12 sono simili a quelle osservate nei neuroni nigrali, poiché sono localizzate esclusivamente nel citoplasma e sono marcate per l' $\alpha$ -sinucleina. Tali inclusioni presentano una morfologia che varia nel tempo, infatti si possono osservare degli inclusi costituiti semplicemente da membrane avvolte su sé stesse, che poi tendono a fondersi rimanendo alla periferia dell'incluso. In questo caso si osserva un core centrale più elettron denso, finché tutto l'incluso appare omogeneo senza più presentare membrane.

L'inibizione della sintesi di DA con l' $\alpha$ -Methyl-p-tirosina ( $\alpha$ -MpT) riduce in maniera significativa la formazione delle inclusioni nelle cellule PC12 in coltura trattate con METH. Le inclusioni si formano quando le cellule trattate con  $\alpha$ -MpT sono incubate in presenza di DA, che ripristina i livelli di DA intracellulare. Inoltre la DA aumenta la formazione di inclusioni indotte da METH in cellule PC12 non trattate con  $\alpha$ -MpT.

La DA sembra dunque svolgere un ruolo fondamentale nella tossicità neuronale indotta da METH.

Il primo meccanismo postulato di neurotossicità DA-mediata prevedeva che gli elevati livelli di DA extracellulari, prodotti dal trattamento amfetaminico, innescassero

processi di auto-ossidazione della DA, con conseguente produzione di specie molecolari altamente reattive e stress ossidativo (Seiden e Vosmer, 1984; Axt et al., 1990). Ben presto fu però chiaro che lo stress ossidativo DA-dipendente doveva avere inizio già all'interno del terminale dopaminergico, dove l'equilibrio nella distribuzione intracellulare del *pool* di molecole di DA viene profondamente alterato dalle metanfetamine (Cubells et al. 1994). In particolare, una volta entrate nel terminale dopaminergico sfruttando il trasportatore di membrana, le molecole anfetaminiche, parzialmente lipofile, sono in grado di penetrare all'interno di lisosomi, endosomi e vescicole sinaptiche, causando "swelling" osmotico (Sulzer e Holtzman, 1989), formazione di vacuoli e rilascio intracitosolico di DA.

All'interno del citoplasma, la DA, non più degradabile dalle MAO, anch'esse bloccate dalle anfetamine, può subire auto-ossidazione e portare ad una notevole produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, anione superossido, ione idrossido e chinoni tossici (Grahame et al., 1978). La presenza di elevate concentrazioni di specie altamente reattive e radicali liberi all'interno del terminale nervoso, oltre a danneggiare svariate molecole del terminale stesso, può interferire in vari modi con la produzione di energia metabolica, inducendo degradazione mitocondriale e morte cellulare (Boveris et al., 2000). D'altra parte, come suggerito da recenti studi, i mitocondri potrebbero rappresentare potenziali bersagli subcellulari diretti della METH. Infatti, sembra che la morte cellulare per apoptosi, prodotta da METH in colture neuronali, possa dipendere dall'interferenza diretta della METH con le funzioni mitocondriali e successiva attivazione della via delle caspasi (Lemasters et al., 1999).

In ultima analisi, lo stress ossidativo sembra comunque essere il meccanismo finale con cui le amfetamine realizzano neurotossicità. Alla luce di ciò, non stupisce che trattamenti volti a ridurre la produzione di radicali liberi e/o a potenziare i sistemi antiossidanti cellulari possano risultare efficaci anche nel prevenire o ridurre la neurotossicità amfetaminica.

Recentemente è stato ipotizzato che si possano formare prodotti altamente tossici tra DA-chinoni e  $\alpha$ -sinucleina (Conway et al., 2001; Sulzer, 2001).

I neuroni dopaminergici sono particolarmente vulnerabili proprio perché contengono alti livelli di DA citosolica e dopo uno stimolo rilasciante, come nel caso della

somministrazione di METH, risultano un sistema in cui l'equilibrio metabolico può facilmente essere alterato.

Pertanto un massivo *release* di DA all'interno della cellula dopaminergica potrebbe provocare un aumento dei DA-chinoni e relative specie ossidanti le quali, a loro volta, altererebbero la struttura di proteine come l' $\alpha$ -sinucleina che devono quindi essere degradate dal sistema UP.

Al contempo l'eccesso di proteine alterate blocca il sistema UP con conseguente accumulo di aggregati poliubiquitinati (Iacovelli et al., 2006).

### **Progetto della tesi**

Dati recenti indicano che la somministrazione di METH nel topo induce l'espressione di  $\alpha$ -sinucleina (Fornai et al., 2005) e la formazione di inclusioni intracellulari positive all'ubiquitina nel sistema nigro-striatale (Fornai et al., 2004a). La formazione di inclusioni intracellulari contenenti  $\alpha$ -sinucleina e ubiquitina è stata riprodotta somministrando METH a colture di cellule PC12, che come i neuroni dopaminergici della substantia nigra, producono e rilasciano DA (Cubells et al., 1994, Larsen et al., 2002; Fornai et al., 2004a, b). Questi studi hanno inoltre dimostrato che tale effetto della METH richiede la presenza di DA (Fornai et al., 2004a). Ciò è congruente con l'effetto marcato della METH sull'aumento della DA citosolica che, alternativamente, si lega alla parkina, inattivando questa proteina (La Voie et al., 2005), o alle protofibrille dell' $\alpha$ -sinucleina, promuovendo la loro precipitazione (Conway et al., 2000; Norris et al., 2005).

Inclusioni simili sono state descritte anche all'interno delle cellule striatali dopo la somministrazione di METH *in vivo* (Fornai et al., 2004a); tuttavia non è mai stata analizzata la loro ultrastruttura, la co-localizzazione dell'ubiquitina e dell' $\alpha$ -sinucleina, ed i meccanismi biochimici responsabili della loro formazione. Un punto importante che deve essere considerato è che i neuroni striatali non contengono DA. Tuttavia, questi corpi cellulari ricevono una ricca innervazione dopaminergica dalla sostanza nera pars compacta, responsabile del notevole rilascio di DA extracellulare dai terminali intra-striatali dopo la somministrazione di METH (Battaglia et al., 2002). Questo è un punto critico, poiché la DA liberata dalla via mesostriatale è stata

riconosciuta responsabile sia dello svolgersi dei processi patologici che interessano i neuroni dello striato, sia nei fenomeni neurotossici (Maragos et al., 1998; Moy et al., 2000), sia nelle malattie degenerative (Jackel e Maragos, 2000; Charvin et al., 2005); inoltre i topi transgenici per l'huntingtina (il gene responsabile dell'insorgere della Malattia di Huntington) mostrano un'interruzione della trasmissione della DA e una risposta anomala alla METH (Hickey et al., 2002).

Se la DA è necessaria per l'induzione di corpi ubiquitinati all'interno dei neuroni dopaminergici, si potrebbe ipotizzare che i neuroni striatali, privati di DA intracellulare, siano refrattari agli effetti della METH.

Per valutare questa ipotesi, è stato analizzato *in vivo* l'effetto della METH sui neuroni striatali privati di innervazione dopaminergica. Ciò è stato ottenuto producendo un danno unilaterale dei terminali nigrostriatali, mediante microinfusione stereotassica di 6-idrossidopamina (6-OHDA), oppure per mezzo della somministrazione di  $\alpha$ MpT, un inibitore della tirosina-idrossilasi (TH).

Questo studio è stato esteso *in vitro*, somministrando METH a colture primarie di cellule striatali, che di per sé sono incapaci di produrre DA, e paragonando questi effetti a quelli ottenuti esponendo queste cellule a DA esogena. Lo studio è proceduto analizzando la struttura degli inclusi nello striato e dei meccanismi molecolari attraverso i quali la DA è in grado di avviare la formazione degli inclusi intracellulari all'interno delle cellule striatali. Il primo approccio è stato usare anticorpi primari per l'ubiquitina e l' $\alpha$ -sinucleina nelle colture di cellule striatali, visualizzate per mezzo di doppia immunofluorescenza e doppia immunomarcatura per la microscopia elettronica. Per chiarire i meccanismi molecolari è stata analizzata la variazione di attività del sistema ubiquitina-proteasoma (UP) ed il ruolo potenziale giocato dai recettori dopaminergici e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Jackel e Maragos, 2000). In particolare, abbiamo valutato se i sottotipi specifici dei recettori dopaminergici giochino un ruolo attivo nell'induzione degli inclusi, e se tale ruolo fosse esclusivo, preminente o parziale, lasciando attivo l'effetto concomitante dei ROS.

## 2. MATERIALI E METODI

### Disegno sperimentale

#### *Esperimenti in vivo*

Per gli esperimenti *in vivo* sono stati usati topi C57 black (maschi di 9 settimane, Charles River, Calco). Sono stati disposti in numero costante per gabbia (N=5) in condizioni fisiche standard (T=21°C, umidità relativa 60%). Gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato Etico Locale e hanno seguito rigorosamente la guida di riferimento per la cura e l'uso degli animali da laboratorio pubblicati dal Ministero della Salute. I topi sono stati divisi nei seguenti gruppi: A= controlli sottoposti a iniezioni di soluzione salina (N=20); B= topi sottoposti a iniezioni di METH cloridrato (N=20), con un protocollo di tre iniezioni intraperitoneali (i.p.) di 5 mg/kg a ogni 2 ore di intervallo; C= topi sottoposti a iniezioni di METH dopo una lesione unilaterale della via nigrostriatale (N=15); D= topi sottoposti a iniezioni di METH (N=15) durante la deplezione transitoria di DA indotta da un'esposizione sistemica all' $\alpha$ MpT, inibitore della tirosina idrossilasi (TH). I topi sono stati sacrificati a 3 o 7 giorni dopo la somministrazione di METH per valutare sia il caso di denervazione di DA (7 giorni), sia la presenza di inclusi all'interno delle cellule striatali (3 e 7 giorni). Un gruppo dei topi ai quali era stata somministrata salina o  $\alpha$ MpT (N=5) è stato sacrificato a 1 ora dopo l'iniezione per valutare l'efficacia dell'inibizione della TH. Durante la somministrazione di METH un certo numero di topi (N=6) ha subito la microdialisi allo striato per studiare gli effetti dei vari trattamenti sulla DA striatale e sui livelli extracellulari di ROS.

#### *Esperimenti in vitro*

Le colture delle cellule striatali primarie sono state esposte da 24 ore fino a 7 giorni a varie dosi di METH (0.001-10  $\mu$ M) o DA (0.1-1.000  $\mu$ M). E' stato contato il numero

delle cellule con gli inclusi e le cellule apoptotiche. Inoltre abbiamo valutato la presenza di ubiquitina e di  $\alpha$ -sinucleina e la loro co-localizzazione nelle cellule. E' stato inoltre quantificata l'attività del sistema UP durante l'esposizione a DA rispetto ai controlli. E' stata poi esaminata la correlazione fra inibizione del proteasoma, perdita di cellule e formazione di inclusi. Come informazione ulteriore, è stato verificato se la somministrazione di DA in presenza di un inibitore UP specifico avesse prodotto un effetto sinergico. Per concludere, abbiamo somministrato: eticlopride (1  $\mu$ M), un antagonista selettivo del recettore dopaminergico D<sub>2</sub>; flufenazina (1  $\mu$ M), antagonista misto dei recettori dopaminergici D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>; SCH23390 (1  $\mu$ M), antagonista selettivo del recettore dopaminergico D<sub>1</sub>; SKF38393 (0.01-10  $\mu$ M), antagonista selettivo del recettore dopaminergico D<sub>1</sub>. Le soluzioni di DA sono state preparate dissolvendo la polvere direttamente nel terreno di coltura. La flufenazina e l'eticlopride sono stati disciolti in acqua sterile, il SCH23390 e il SKF38393 sono stati disciolti in etanolo, e le soluzioni da 1 mM sono state diluite al momento dell'uso alle varie concentrazioni nel terreno di coltura.

## **Procedure sperimentali**

### ***Chirurgie***

Per produrre una lesione unilaterale del sistema nigrostriatale, i topi hanno subito un'infusione unilaterale della neurotossina 6-OHDA (Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo, U.S.A.) in corrispondenza del fascicolo proencefalico mediale dopo un'iniezione sistemica di desmetilimipramina (DMI, 25 mg/kg; Sigma). I topi sono stati anestetizzati profondamente e disposti nell'apparecchio stereotassico di Kopf (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, U. S.A.) adattato con le punte della barra all'orecchio dei topi; una cannula da iniezione (0.36 millimetri di diametro esterno e 17 millimetri di lunghezza) è stata inserita in un foro prodotto nel cranio usando le seguenti coordinate (in millimetri): AP= -1.2 dal bregma; ML=  $\pm$ 1.2 laterale alla linea mediana; DV= -5.0 dalla superficie del cranio (Paxinos e Franklin, 2004). La cannula è stata collegata con un tubo di polietilene (PE20, 1.01 millimetri di diametro esterno) ad una siringa Hamilton (10  $\mu$ l) guidata da una pompa da microinfusione (KD Scientific, 2Biological

Instruments, Besozzo, Varese, Italia). La 6-OH-DA è stata dissolta in acido ascorbico allo 0.1% (per prevenire il metabolismo della tossina prima dell'assorbimento cellulare) ed è stato iniettato alla dose di 8 µg dissolto in 2 µl, alla velocità di 0.2 µl/min per 10 minuti per evitare danni meccanici.

A sei topi di ogni gruppo sono state impiantate le guide intracerebrali da microdialisi (CMA/7 Guide Cannula, CMA/Microdialysis, Stoccolma, Svezia). Il luogo di impianto è stato il tessuto striato sinistro o destro (coordinate in millimetri: AP=+0.6 dal bregma; ML=1.7 laterale alla linea mediana; DV=-2.5-4.5 dalla superficie del cranio, secondo l'atlante di Paxinos e di Franklin, 2004). Sono state usate sonde verticali concentriche da microdialisi di 2 millimetri di lunghezza e 0.24 millimetri di diametro esterno, con una membrana rameosa con un limite molecolare di 6.000 Dalton (CMA/7 Sonda da Microdialisi, CMA/Microdialysis). Le sonde sono state perfuse continuamente con liquido cerebrospinale artificiale (ACSF), ad un flusso di 1.5 µl/min, per mezzo di una pompa da microiniezione (Bioanalytical System Inc., West Lafayette, Indiana, U.S.A.). Il liquido cerebrospinale artificiale conteneva NaCl 150 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.7 mM e MgCl<sub>2</sub> 0.9 mM; questa soluzione non è stata tamponata ed il pH è risultato 6.5. Dopo 3 frazioni del campione, usate per determinare i livelli basali di DA striatale e dei ROS, i topi hanno ricevuto tre iniezioni di METH (5 mg/kg, i.p., ogni 2 ore).

### ***Trattamenti farmacologici***

Per produrre una privazione transitoria di DA ad un gruppo di topi è stata effettuata un'iniezione i.p. di αMpT (150 mg/kg), 30 minuti prima di ricevere la METH. Complessivamente, i topi di controllo (N=20), i topi lesionati con 6-OHDA (N=18) ed i topi iniettati con αMpT (N=20) sono stati divisi in due sottogruppi: uno ha ricevuto la soluzione salina e l'altro una dose neurotossica di METH (5mg/kg x 3 ogni 2 ore). Tutti i topi sono stati sacrificati 7 giorni dopo la somministrazione di METH.

### ***Misura delle specie reattive all'ossigeno (ROS)***

La formazione di ROS è stata rilevata valutando la quantità del sottoprodotto acido 2,3-diidrossibenzoico (2,3-DHBA), che deriva dalla reazione del salicilato (5 mM,

aggiunta al liquido cerebrospinale artificiale) con i radicali idrossilici che si trovano nello spazio extracellulare. Quindi, la quantità di 2,3-DHBA fornisce una misura indiretta dei livelli extracellulari di ROS (Giovanni et al., 1995). L'analisi di 2,3-DHBA è stata effettuata con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) con il rivelatore elettrochimico Coulochem II (ESA, Inc., Chelmsford, MA, U.S.A., come pubblicato precedentemente, Battaglia et al., 2002). La quantità di 2,3-DHBA è stata espressa come percentuale dei valori basali.

### ***Saggi biochimici per la valutazione della DA e dei suoi metaboliti***

I livelli di DA striatale sono stati misurati sia negli omogenati striatali dei topi sacrificati a 7 giorni dopo la somministrazione di METH, sia nello spazio extracellulare striatale dal quale è stato effettuato il prelievo durante gli esperimenti di microdialisi. Per l'analisi degli omogenati di tessuto striato sono stati sacrificati 5 topi da ogni gruppo, il loro encefalo è stato rimosso rapidamente e lo striato è stato processato e analizzato per misurare i livelli di DA, come precedentemente descritto (Fornai et al., 1999).

Brevemente, lo striato congelato è stato omogenato con un sonicatore, sono stati raccolti 500 µl e analizzati per misurare le concentrazioni proteiche secondo la procedura del Lowry (Lowry et al., 1951), i restanti 550 µl sono stati centrifugati e 20 µl del sovrantante sono stati iniettati direttamente in HPLC.

Quando sono stati raccolti i campioni di DA nello striato dal materiale in dialisi, 20 µl del perfuso sono stati iniettati direttamente in HPLC. Il sistema HPLC stava funzionando in fase inversa con un rivelatore coulometrico (Coulochem III con una cella analitica 5011A) composto da due elettrodi, il primo a +300 mV ed il secondo a -300 mV. Il segnale è stato registrato da entrambi gli elettrodi. Prima e durante l'analisi dei campioni sono stati iniettati nel sistema soluzioni a concentrazione nota per costruire due curve di regressione (una per l'elettrodo ossidante e l'altra per quello riducente). La quantità di DA nello striato è stata determinata con un'analisi quantitativa per unità di proteina (omogenati di striato) o per volume extracellulare unitario (striato sottoposto a microdialisi).

### ***Preparazione delle colture primarie***

Le colture cellulari di striato, che contengono sia neuroni che glia, sono state ottenute da embrioni di topi di 14-16 giorni come descritto da Rosa et al. (1992). Topi albini femmine Swiss Webster gravide (Charles River) sono stati anestetizzati con cloroformio (14-16 giorni di gestazione). Lo striato è stato sezionato sotto uno stereomicroscopio in condizioni sterili ed è stato posto nel mezzo di dissezione e omogenato. 500 µl della sospensione sono stati pilastrati su una base di glia precedentemente preparata da 2-4 settimane. Le piastre sono state mantenute in un incubatore umidificato con il 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C. Dopo 5 giorni, la divisione di cellule non-neuronali è stata bloccata trattando per 1-3 giorni con citosina-arabinoside 10 µM (Sigma).

Dopo 14-15 giorni di crescita cellulare le colture sono state usate per gli esperimenti.

### ***Colture delle cellule PC12***

Abbiamo usato le colture delle cellule PC12 per confrontare una linea cellulare che produce e rilascia DA con una che non lo fa, quella delle cellule striatali. Le colture cellulari di PC12 derivano dal feocromocitoma di ratto sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A.) e fatta crescere nel mezzo di coltura RPMI 1640, arricchito con siero di cavallo al 10% inattivato e siero bovino fetale al 5%, contenenti penicillina (50 UI/ml) e streptomina (50 mg/ml). Le cellule sono cresciute in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> e mantenute in atmosfera umidificata al 5% con CO<sub>2</sub> a temperatura 37°C. Gli esperimenti sono stati effettuati durante la fase logaritmica dello sviluppo delle cellule.

### ***Morfologia***

Per gli esperimenti *in vivo*, la valutazione morfologica è stata effettuata per confermare la denervazione unilaterale indotta dalla 6-OH-DA e per valutare l'integrità del sistema nigrostriatale dopaminergico e la capacità della METH di indurre inclusi stratali.

Per la microscopia ottica cinque animali per ogni gruppo sono stati sacrificati per decapitazione e il loro encefalo è stato rapidamente rimosso, congelato in isopentano e conservato a -80°C fino al momento del taglio. Sezioni seriate di striato, substantia nigra (distanza dal bregma a + 2.28 mm, - 4.68 mm e a -9.48 mm, rispettivamente), di 20 µm di spessore, sono state ottenute al criostato (2800 Frigocut, Reichert-Jung). Le sezioni sono state alternativamente colorate con ematossilina/eosina e processate per l'immunoistochimica.

Per la microscopia elettronica i topi sono stati perfusi con paraformaldeide al 2%, glutaraldeide allo 0.1% in PBS 0.1 M a pH 7.4, e gli encefali sono stati immersi nella stessa soluzione per una notte a 4°C. Lo striato è stato dissezionato e poi fissato in OsO<sub>4</sub> allo 1% in soluzione tampone, disidratato in etanolo e incluso in resina Epon-araldide. Sezioni ultrafini sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo, ed infine sono state esaminate con un microscopio a trasmissione elettronica Jeol Jem 100SX (Tokio, Giappone).

Le colture di cellule striatali sono state processate per la valutazione morfologica per analizzare l'eventuale morte cellulare e la presenza di inclusi dopo i diversi tipi di trattamento. Ciò è stato effettuato usando sia la microscopia ottica che la microscopia elettronica.

### ***Immunocitochimica***

Sono stati utilizzati anticorpi monoclonali anti-tirosina idrossilasi (Sigma Aldrich, USA), anti-ubiquitina (Sigma Aldrich, USA) e  $\alpha$ -sinucleina (gentilmente fornita dal Prof. Sudhof), rivelati con il sistema dell'immunoperossidasi, mediante l'impiego di un anticorpo secondario biotinilati (1:200) (Vector Laboratories, USA), seguito dall'incubazione con il complesso avidina-biotina (ABC Kit) (Vector Laboratories, USA) e infine con diaminobenzidina, substrato dell'enzima perossidasi. L'anticorpo anti-TH è stato diluito 1:2000, mentre quello anti-U è stato diluito 1:100. Le sezioni sono state poi osservate utilizzando il microscopio ottico Eclipse 80i (Nikon, Giappone).

### ***Immunoelettromicroscopia - Tecniche di post-inclusione***

I *pellet* cellulari sono stati processati come descritto precedentemente per la microscopia elettronica a trasmissione. Sezioni di campione sono state raccolte su retini di nichel e trattate come segue:

- 1) etching in NA-metaperiodato (soluzione satura in acqua distillata) a temperatura ambiente per 30 min
- 2) lavaggi in PBS 3 per 5 min
- 3) blocco dei siti antigenici specifici con goat-serum al 10% disciolto in una soluzione contenente saponina allo 0,2% in PBS per 20 min
- 3) incubazione nell'anticorpo primario (1:10) disciolto in una soluzione contenente goat-serum all' 1%, saponina allo 0,2% in PBS per 24 ore a 4 °C in camera umida
- 4) lavaggi in PBS 3 per 5 min
- 5) Incubazione nell'anticorpo secondario coniugato a particelle d'oro (1:50), che possono avere il diametro o di 10 o di 20/30 nm, tale anticorpo è diluito in una soluzione contenente goat-serum all' 1%, saponina allo 0,2% in PBS per 60 min a temperatura ambiente
- 6) lavaggi in PBS 3 per 5 min
- 7) fissazione in glutaraldeide all'1% in PBS per 3 min
- 8) Lavaggio in acqua distillata per 5 min
- 9) contrastazione con acetato di uranile e citrato di piombo

Gli anticorpi che sono stati utilizzati sono: anti  $\alpha$ -sinucleina (svilupata in topo), ubiquitina (svilupata in coniglio), le diluizioni per tutti e tre i primari sono state di 1:10, mentre per i secondari 1:10 per gli anticorpi anti topo e 1:20 per gli anti coniglio.

Per la doppia marcatura  $\alpha$ -sinucleina e ubiquitina abbiamo contemporaneamente incubato le sezioni nei due anticorpi e come sistema di rivelazione abbiamo utilizzato anticorpi secondari legati a particelle d'oro con diametro diverso 10 nm per l' $\alpha$ -sinucleina e 20 nm per l'ubiquitina.

### ***SDS-Page Immunoblotting***

Ad ogni tempo (24, 72 e 168 ore) dopo il trattamento con DA (10  $\mu$ M), le cellule striatali primarie sono state lisate in tampone TEN (Tris 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl mM, NP-40 all'1% a pH 7.6, contenente fenimetilsulfonil fluoruro allo 0.1% e inibitori della proteasi 10  $\mu$ g/ml) e centrifugate a 15.000 giri al minuto per 20 minuti a 4°C.

E' stato trattenuto il sovranatante e la concentrazione delle proteine è stata determinata usando un kit di analisi basato sulla procedura del Lowry (Lowry et al., 1951; Sigma). I campioni contenenti 40  $\mu$ g di proteine totali sono stati solubilizzati e sottoposti ad elettroforesi su gel di sodiododecilsolfato-poliacrilammide al 12%. A seguito dell'elettroforesi, le proteine sono state trasferite sulla membrana di nitrocellulosa (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). La membrana è stata immersa durante la notte a 4°C in una soluzione bloccante (latte in polvere non grasso al 3% in Tris 20 mM, NaCl 137 mM a pH 7.6 contenente Tween-20 allo 0.05%). Successivamente la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario per l' $\alpha$ -sinucleina (1: 2500) o per l'ubiquitina (1: 1000) per 1 ora a temperatura ambiente su un agitatore orbitale. Successivamente la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario anti-ubiquitina (1:400, Sigma) o anti  $\alpha$ -sinucleina (1:200, gentilmente donatoci da Dr. Thomas C Sudhof) *overnight* a 4°C. La membrana è stata successivamente lavata e incubata con anticorpo secondario legato alla perossidasi (1:100 e 1:500 rispettivamente, per 1 ora a temperatura ambiente). Le bande immunoreattive corrispondenti alla proteina indagata, sono state visualizzate esponendo successivamente tale membrana a reagenti chemoluminescenti che si legano alla perossidasi (Amersham Pharmacia Biotech).

### ***Attività del Proteasoma***

I campioni di cellule sono stati congelati a -80°C fino all'analisi, al momento della processazione sono stati omogeneizzati in 100  $\mu$ l di Tris-HCl 10 mM pH 7.8 contenente EDTA 1 mM.

Per misurare l'attività chimotripsina-simile è stato usato il 20S Proteasome Activity Assay Kit (Chemicon). L'attività della post-glutamil peptidasi (o peptidil-glutamil-peptide idrolizzante, attività del PGPH) è stata misurata usando il Cbz-Leu-Leu-Glu-

AMC (Sigma) e l'attività della tripsina è stata misurata usando il Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC (Sigma). In entrambi i casi, l'attività è stata misurata tramite rilevazione del fluoroforo 7 amido-4-metilcoumarina (AMC) dopo divisione dei vari peptidi fluorogenici sintetici: Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (per l'attività della chimotripsina), CBZ-Leu-Leu-Glu-AMC (per l'attività del PGPH) e Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC (per l'attività della tripsina). Le stesse misure sono state effettuate anche aggiungendo alla miscela di reazione il detergente SDS (0.02%), per aumentare le attività enzimatiche e per valutare l'attività residua del proteasoma (Orlowsky et al., 1991).

### ***Analisi statistica***

I dati riguardanti la misura quantitativa delle catecolammine e dei livelli di 2,3-DHBA così come il conteggio dei corpi neuronali TH positivi, il conteggio degli inclusi nelle colture cellulari, il numero di cellule con inclusi e il numero di cellule apoptotiche e la misura dell'attività del proteasoma, sono stati trattati come valori parametrici. Per quando riguarda la microscopia elettronica le conte sono state fatte su microfotografie a 4.000 ingrandimenti per un totale di 1.000 cellule sia di controllo che dopo trattamento.

I confronti fra gruppi sono stati realizzati con l'ANOVA con analisi *post hoc* di Sheffè. I valori semiquantitativi sono stati trattati soltanto come dati rappresentativi e non sono mai stati confrontati usando la statistica differenziale.

### 3. RISULTATI

#### **Esperimenti *in vivo***

##### ***Effetti della 6-OH-DA, dell' $\alpha$ MpT e della METH sul sistema nigrostriatale***

E' stata osservata un'intensa immuno-colorazione per la TH nello striato e nella substantia nigra pars compacta dei topi di controllo (Fig. 3.1a); dopo la microinfusione ipsilaterale della neurotossina 6-OH-DA (Fig. 3.1b) non è più visibile alcuna positività, mentre dopo  $\alpha$ MpT (Fig. 3.1c) non è stata osservata alcuna riduzione della immuno-colorazione della TH nei topi trattati. Allo stesso modo, i livelli di DA e dei metaboliti misurati nei controlli (Fig. 3.1d) sono risultati seriamente ridotti dopo la denervazione nigrostriatale prodotta dalla 6-OH-DA (Fig. 3.1e), mentre c'è stata una diminuzione significativa dopo 1 ora dalla somministrazione di  $\alpha$ MpT (Fig. 3.1f).

Quando è stata somministrata la METH (5 mg/Kg x 3) ai topi controllo, abbiamo trovato un aumento significativo dei livelli extracellulari di DA, misurati nella sonda da dialisi, mentre vi è stata una diminuzione sia nei topi denervati con 6-OH-DA che in quelli iniettati con  $\alpha$ MpT (Fig. 3.1g). E' stata osservata una tendenza simile anche per la produzione di ROS extracellulare (Fig. 3.1h), sebbene in questo caso le differenze fra i gruppi siano risultate minori.

A 7 giorni dalla somministrazione di METH, i topi pretrattati con  $\alpha$ MpT hanno mostrato una certa protezione contro la tossicità indotta da METH, risultato in linea con quanto osservato da Shmidt (1985, dati non mostrati).

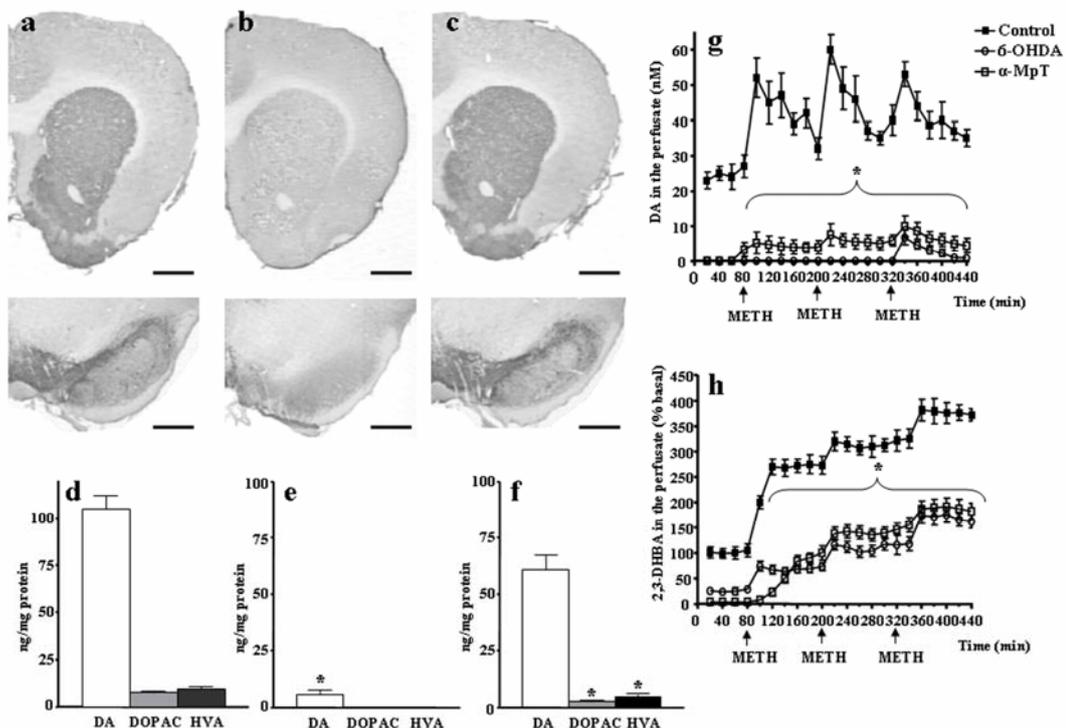


Fig 1

### Figura 3.1

#### Effetti della denervazione striatale dopaminergica sui livelli di DA striatale e sul rilascio di 2,3-DHBA dopo METH.

L'intensa positività della TH caratterizza il tessuto striato e la substantia nigra del topo di controllo (a), mentre si perde dopo microinfusione ipsilaterale della 6-OH-DA (b). Non si osserva nessuna riduzione dell'immunocolorazione per la TH dopo la somministrazione sistemica di αMPT (c).

I grafici mostrano i livelli di DA striatale e dei metaboliti nei topi di controllo (d); nei topi microinfusioni ipsilateralmente con 6-OH-DA (e); e nei topi che hanno ricevuto un'iniezione sistemica di αMPT (f). A seguito di ulteriori somministrazioni di METH (5 mg/Kg x 3, ogni 2 ore) è stato trovato un aumento significativo dei livelli extracellulari di DA nei topi di controllo, la DA si riduce drasticamente nello striato dei topi microinfusi ipsilateralmente con 6-OH-DA, e nei topi trattati con αMPT (g). Si osserva una tendenza analoga per la produzione di ROS extracellulari, sebbene la riduzione indotta dalla 6-OH-DA o dall'αMPT sia minore (h).

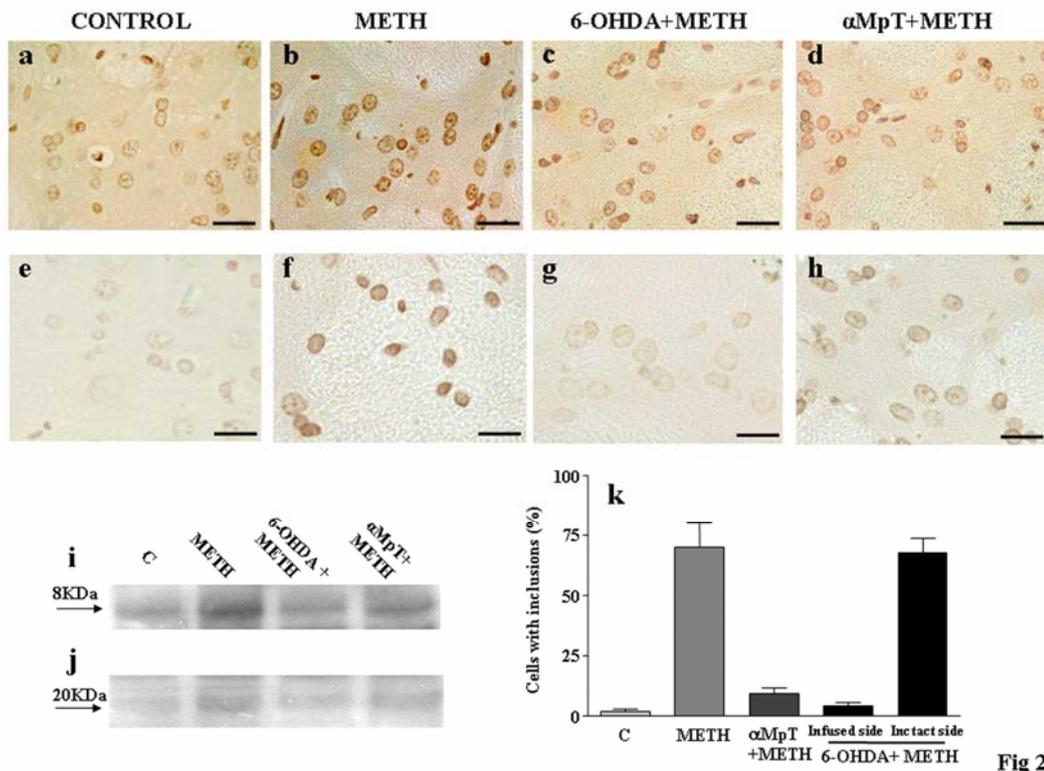
\*P < 0.05 paragonato al controllo. One-way ANOVA + Sheffe's post hoc test.

Barre=1.6 mm (striato); 0.5 mm (nigra).

**Effetti della 6-OH-DA e dell'  $\alpha$ MpT sui cambiamenti post-sinaptici dello striato indotti dalla METH**

Nella figura 3.2 vengono mostrate delle immagini rappresentative di striato e l'immunoblotting per l'ubiquitina e l' $\alpha$ -sinucleina. La riduzione di DA nello striato leso da 6-OH-DA o dopo somministrazione con  $\alpha$ MpT è concomitante con una diminuzione dell'immuno-colorazione per l'ubiquitina e per l' $\alpha$ -sinucleina che invece risultavano notevolmente aumentate nei topi trattati con la sola METH (Fig. 3.2a-j).

Quando abbiamo valutato il numero di inclusi positivi all'ubiquitina all'interno dei neuroni striatali, abbiamo osservato una notevole protezione, comprovata dall'assenza di DA endogena, a differenza dei cambiamenti ultrastrutturali post-sinaptici prodotti dalla METH (Fig. 3.2k). Questi dati suggeriscono che l'integrità dei terminali striatali dopaminergici è di fondamentale importanza affinché la METH induca alterazioni post-sinaptiche nello striato. Per verificare questa indicazione e per analizzare i meccanismi coinvolti, è stato usato un sistema *in vitro*.



**Fig 2**

**Figura 3.2**

### **Effetti della perdita di DA striatale sull'espressione dell'ubiquitina e dell' $\alpha$ -sinucleina indotta dalla METH nelle cellule striatali.**

Immagini rappresentative mostrano l'espressione dell'ubiquitina in un tessuto striatale di controllo (**a**). Dopo somministrazione di METH si verifica un aumento dell'espressione di ubiquitina (**b**), che diminuisce nello striato di un topo lesionato con 6-OHDA (**c**), o dopo somministrazione di METH in condizione di privazione di DA, dovuta all'  $\alpha$ MpT (**d**). Nelle immagini più in basso (**e-h**) le stesse condizioni sperimentali mostrano risultati analoghi ottenuti con la colorazione per l' $\alpha$ -sinucleina, l'immunoblotting per l'ubiquitina (**i**) e un analogo immunoblotting per l' $\alpha$ -sinucleina (**j**).

La morfometria quantitativa del numero dei corpi positivi all'ubiquitina, all'interno dei neuroni striatali per ogni gruppo sperimentale, è riportato nel grafico (**k**), in cui in assenza di DA endogena, la METH perde l'efficacia nel produrre inclusioni neuronali.

\* $P < 0.05$  paragonato al controllo. One-way ANOVA + Sheffe's post hoc test.

**Barre=75  $\mu$ m (a-h).**

### **Esperimenti *in vitro***

#### ***La DA produce effetti subcellulari nelle colture primarie di cellule striatali, mentre la METH da sola no***

A differenza delle cellule striatali *in vivo* o delle PC12, abbiamo osservato che la somministrazione di METH (1  $\mu$ M) non ha indotto inclusi in colture di cellule striatali, che infatti mostrano la stessa ultrastruttura delle cellule di controllo (Fig. 3.3a e 3.3b). Mentre, l'esposizione delle cellule striatali primarie alla DA, ha indotto la formazione di inclusi intracellulari (Fig. 3.3c) simili a quelli osservati *in vivo*. Tali inclusi appaiono come formazioni multilamellari (Fig. 3.3d e 3.3e).

Gli inclusi aumentano all'aumentare delle dosi di DA fino 10  $\mu$ M, mentre a dosi elevate diminuiscono (Fig. 3.3f). La diminuzione del numero degli inclusi si accompagna all'insorgere della morte cellulare (vedere il paragrafo sulla correlazione fra la morte cellulare e la formazione degli inclusi).

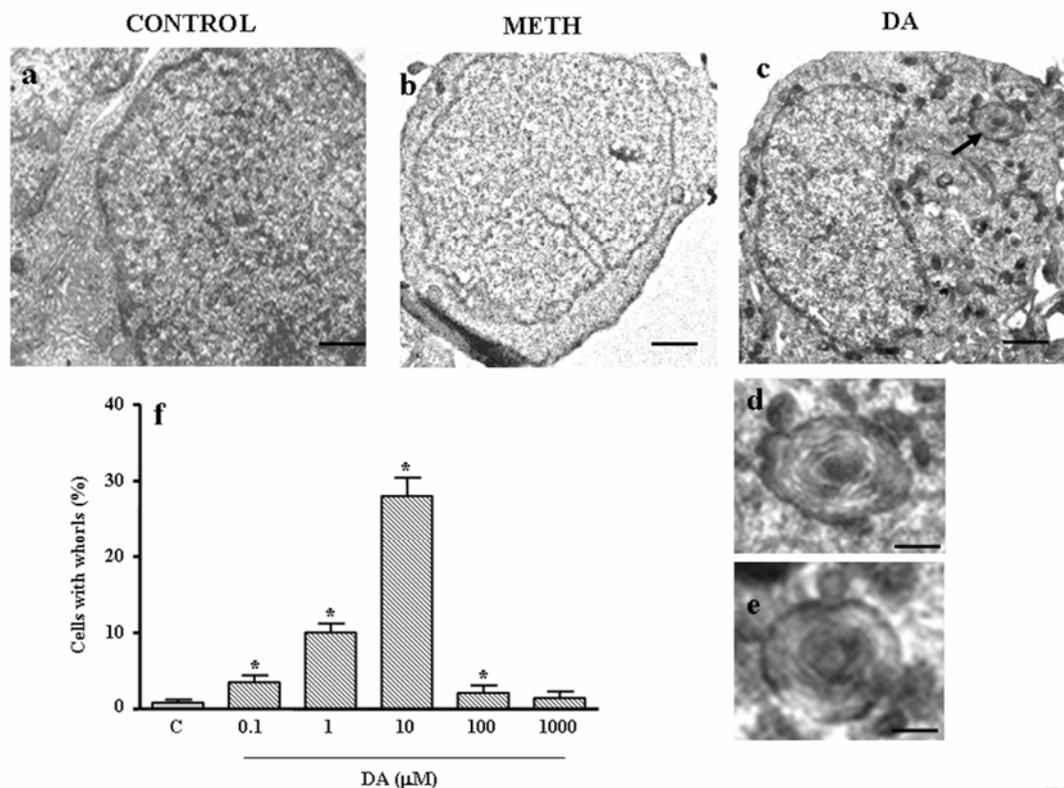


Fig 3

### Figura 3.3

#### **Mancanza di effetti della METH sulle colture delle cellule striatali e ripristino dose-dipendente degli inclusi intracellulari dovuto a DA esogena.**

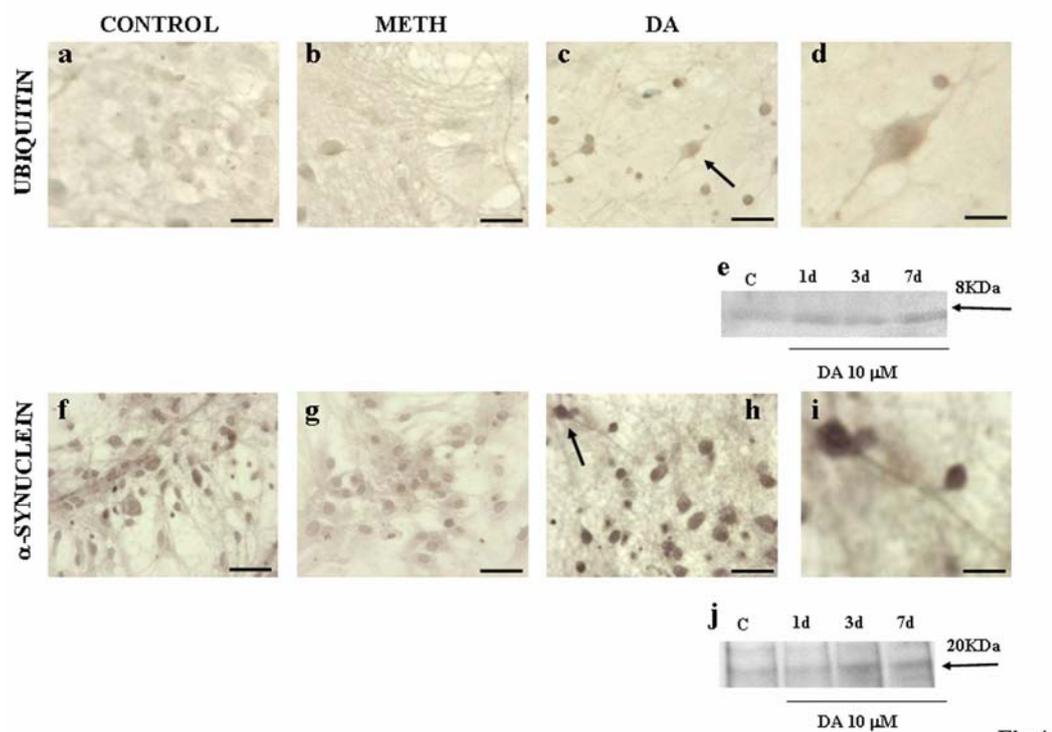
L'ultrastruttura di una cellula striatale di controllo (a) non risulta modificata dalla somministrazione di METH (1 μM, b). L'esposizione delle cellule striatali primarie alla DA esogena riproduce la formazione degli inclusi multilamellari (c, d, e), che sono simili a quelli osservati *in vivo* dopo somministrazione di METH. L'effetto dose-risposta della DA sul numero di cellule con i corpi subcellulari è mostrato nel grafico (f), l'effetto maggiore della DA è ottenuto alla dose 10 μM.

\*P< 0.05 confrontato col controllo. One-way ANOVA + Sheffe's post hoc test.

Barre=4.25 μm (a-c); 0.66 μm (d,e).

***La DA induce immuno-positività all'ubiquitina e all' $\alpha$ -sinucleina nelle colture striatali***

Quando la DA è somministrata a varie dosi alle colture cellulari striatali, produce un aumento dose-dipendente degli inclusi intracellulari ubiquitinati (Fig. 3.3f). Nella figura 3.4a è mostrata un'immagine rappresentativa dell'immuno-positività dell'ubiquitina in una coltura di controllo che risulta paragonabile a quanto si osserva dopo trattamento con METH (Fig. 3.4b). Invece, il trattamento con DA (10  $\mu$ M) produce un aumento dell'immuno-colorazione (Fig. 3.4c, 3.4d) nelle colture di cellule striatali. Il fenomeno ora descritto per l'immunoistochimica è confermato dall'immunoblotting per l'ubiquitina (Fig. 3.4e). Nelle figure 3.4f-i sono mostrati risultati analoghi per l'immunoistochimica dell' $\alpha$ -sinucleina confermati dall'immunoblotting (Fig. 3.4j).



**Fig 4**

**Figura 3.4**

**Immunocolorazione dell'ubiquitina e dell' $\alpha$ -sinucleina nelle colture cellulari striatali: effetti della METH e della DA.**

L'immagine rappresentativa del controllo (**a**) mostra l'immunocolorazione per l'ubiquitina che è paragonabile a quella ottenuta con la METH (**b**). Quando la DA è somministrata alla dose 10  $\mu$ M si osserva un aumento della colorazione (**c**: aumento leggero; **d**: aumento maggiore), che persiste per 1 settimana come indicato dalle immagini dell'immunoblotting SDS-PAGE (**e**). Risultati analoghi sono ottenuti con l'immunocolorazione e l'immunoblotting per l' $\alpha$ -sinucleina (**f-i**).

**Barre**=75  $\mu$ m (**a-c**); 20  $\mu$ m (**d**); 30  $\mu$ m (**i**).

Quando le colture striatali di controllo vengono processate per la doppia marcatura ubiquitina/ $\alpha$ -sinucleina i segnali fluorescenti indicano una mancata colocalizzazione delle due proteine (Fig. 3.5a-c), mentre dopo trattamento con DA è evidente un marcato segnale fluorescente per entrambe le singole proteine che colocalizzano (Fig. 3.5d-f). Questi dati ottenuti con la doppia immunofluorescenza sono confermati dall'immuno-elettromicroscopia (Fig. 3.5g-i), a livello delle stesse strutture subcellulari (inclusi) sono presenti sia l'ubiquitina che l' $\alpha$ -sinucleina. In particolare, l'ubiquitina è presente in modo diffuso, mentre l' $\alpha$ -sinucleina è posta preferenzialmente alla periferia degli stessi inclusi.

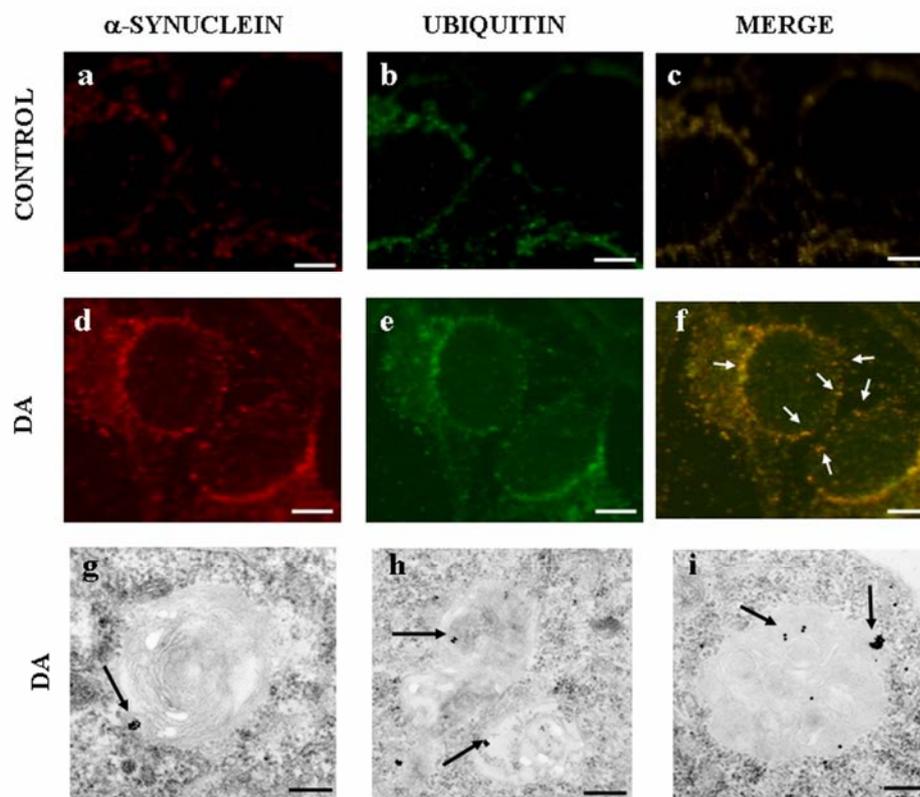


Fig 5

### Figura 3.5

#### Co-localizzazione dell'ubiquitina e dell' $\alpha$ -sinucleina al microscopio ottico e al microscopio elettronico.

Nel controllo, l'immunofluorescenza per l' $\alpha$ -sinucleina (a) e per l'ubiquitina (b) ha un segnale basso e assenza di colocalizzazione (c). Dopo la somministrazione di DA (10  $\mu$ M, 72 h) la colorazione intensa dell' $\alpha$ -sinucleina (d) e dell'ubiquitina (e) conduce ad una colocalizzazione ben definita come indicato dalle frecce bianche (f). Questi risultati sono confermati dalla microscopia elettronica, che estende l'analisi della localizzazione a livello dei singoli inclusi. Nel dettaglio, l' $\alpha$ -sinucleina è rivelata dalle particelle più piccole dell'immunogold (g) ed è localizzata alla periferia degli inclusi; mentre l'ubiquitina è rivelata dalle particelle più grandi dell'immunogold (h) ed è localizzata diffusamente. E' visibile la localizzazione di entrambe le proteine a livello della stessa inclusione (i).

Barre=16.7  $\mu$ m (a-f); 0.2  $\mu$ m (g-i).

### *Correlazione fra la morte delle cellule e la formazione degli inclusi*

Come detto precedentemente, l'aumento della dose di DA fra 0.1 e 10  $\mu\text{M}$  conduce ad un aumento del numero di cellule con inclusi, mentre un ulteriore aumento della dose di DA a 1000  $\mu\text{M}$  conduce ad un effetto opposto (Fig. 3.3f). Nelle figure 3.6a, 3.6b e 3.6c, si possono apprezzare gli effetti ultrastrutturali dell'aumento delle dosi di DA (10, 100 e 1000  $\mu\text{M}$ , rispettivamente). Queste immagini mostrano che la mancanza delle inclusioni è accompagnata da un aumento della morte delle cellule, come rappresentato graficamente nella figura 3.6d. La figura 3.6e correla la morte cellulare con la riduzione degli inclusi cellulari, cosicché questi due fenomeni risultano inversamente proporzionali. Infatti, la curva dose-risposta per la morte delle cellule indotta dalla DA è spostata a destra rispetto alla curva dose-risposta per le inclusioni cellulari indotte dalla DA (Fig. 3.6e).

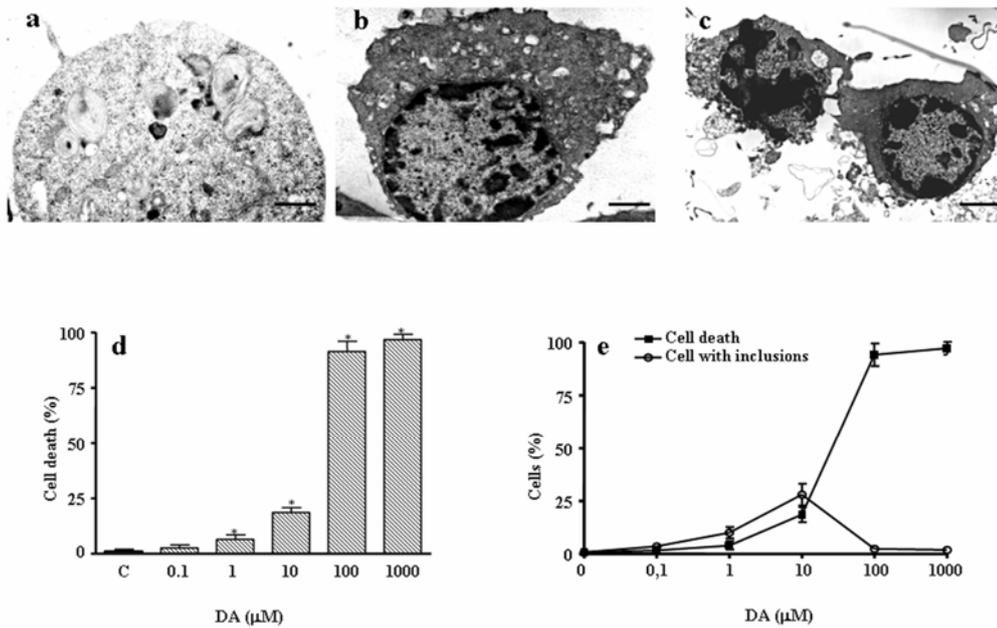


Fig 6

### **Figura 3.6**

**Effetti dipendenti dalla dose di DA sul verificarsi della morte delle cellule nelle colture cellulari striatali e correlazione con la formazione degli inclusi.**

Cellule striatali di controllo (**a**); dosi alte (**b**) e letali (**c**) di DA sulle colture cellulari striatali (100 e 1000  $\mu\text{M}$ , rispettivamente). La misura quantitativa della morte cellulare indotta aumentando le dosi di DA è indicata nel grafico (**d**), mentre (**e**) mostra la correlazione negativa fra la formazione degli inclusi e la morte delle cellule.

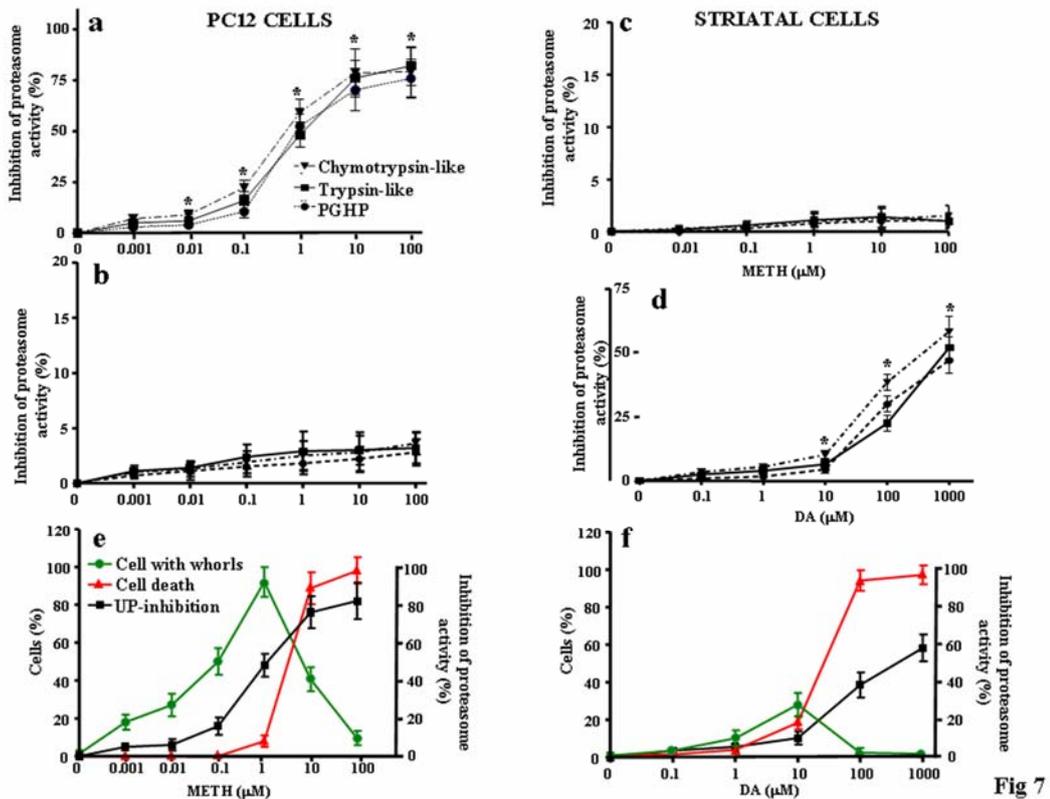
\* $P < 0.05$  paragonati ai controlli.

**Barre**=2.0  $\mu\text{M}$  (a); 5.0  $\mu\text{M}$  (b); 10  $\mu\text{M}$  (c).

Ciò indica che la presenza di inclusi neuronali rappresenta una fase più blanda di tossicità e che si richiedono dosi elevate di DA per produrre la morte cellulare. Il significato di questi risultati può essere collegato ad un ruolo protettivo degli inclusi neuronali, o semplicemente al coinvolgimento di un meccanismo di difesa che diventa morfologicamente evidente quando la cellula non è ancora irreversibilmente compromessa.

#### ***Effetti della DA e della METH sull'attività del proteasoma in presenza (cellule PC12) o in assenza (cellule striatali) di dopamina endogena***

Come mostrato in figura 3.7a, abbiamo trovato che la METH inibisce in modo dose-dipendente tutte le attività del sistema UP nelle cellule PC12. Tuttavia, quando abbiamo valutato l'attività del sistema UP in cellule PC12 private di DA (pretrattate con  $\alpha\text{MPT}$  1 mM), non è stato possibile misurare alcuna inibizione (Fig. 3.7b). La somministrazione di varie dosi di METH alle cellule striatali non interagisce con l'attività del sistema UP (Fig. 3.7c). Tuttavia, quando è somministrata DA anziché METH, può essere rilevata un'inibizione dose-dipendente del sistema UP (Fig. 3.7d). Quando abbiamo tracciato il grado di inibizione del sistema UP rispetto al numero di cellule con le inclusioni o rispetto al numero di cellule morte, abbiamo trovato che questi fenomeni, sono collegati con l'inibizione del sistema UP nelle cellule striatali e nelle PC12 (Fig. 3.7e e 3.7f, rispettivamente).



**Figura 3.7**

**Effetti della METH e della DA sull'attività del Proteasoma nelle PC12 e nelle culture di cellule striatali.**

E' mostrata la curva dose-risposta degli effetti inibitori della METH sulle tre principali attività enzimatiche del sistema UP (a). L'effetto scompare (b) quando le cellule PC12 sono esposte alla METH dopo la somministrazione di un agente che provoca la privazione di DA, la  $\alpha$ MpT 1 mM. In modo simile, le colture di cellule striatali, che né producono né immagazzinano la DA, sono refrattarie agli effetti inibitori della METH sul sistema UP (c); mentre questa inibizione è ristabilita in modo dose-dipendente tramite la somministrazione di DA al mezzo di coltura delle cellule striatali (d). Quando l'inibizione dell'attività del Proteasoma, indotta aumentando le dosi di METH nelle cellule PC12, è confrontata con la percentuale di cellule con inclusi o di cellule morte, si osserva una correlazione fra inibizione del Proteasoma e presenza di inclusi o di morte cellulare (e). Un effetto simile si ottiene aumentando la dose di DA somministrata alla colture di cellule striatali (f).

\*P<0.05 paragonato ai controlli (attività normale del sistema UP).

### *Sinergismo fra DA e inibitori del sistema UP*

La capacità della METH di inibire il sistema UP attraverso un meccanismo che richiede la presenza di DA, e la capacità della DA di riprodurre una tale inibizione ci ha condotti a formulare l'ipotesi di un sinergismo fra la DA e gli inibitori del sistema UP. Come mostrato in figura 3.8, la struttura normale di una cellula di controllo (Fig. 3.8a) è stata alterata dalla presenza di formazioni intracellulari dopo la somministrazione dell'inibitore del sistema UP lactacistina (10  $\mu$ M, Fig. 3.8b), che produce un effetto subcellulare simile a quello indotto dalla DA (10  $\mu$ M, Fig. 3.8c). Quando la lactacistina e la DA sono somministrate insieme si verifica una tossicità sinergica, che conduce alla morte delle cellule sia tramite apoptosi che necrosi, come mostrato dalla microscopia elettronica a trasmissione (Fig. 3.8d), tali fenomeni sono quantificati nei grafici di figura 3.8e e 3.8f.

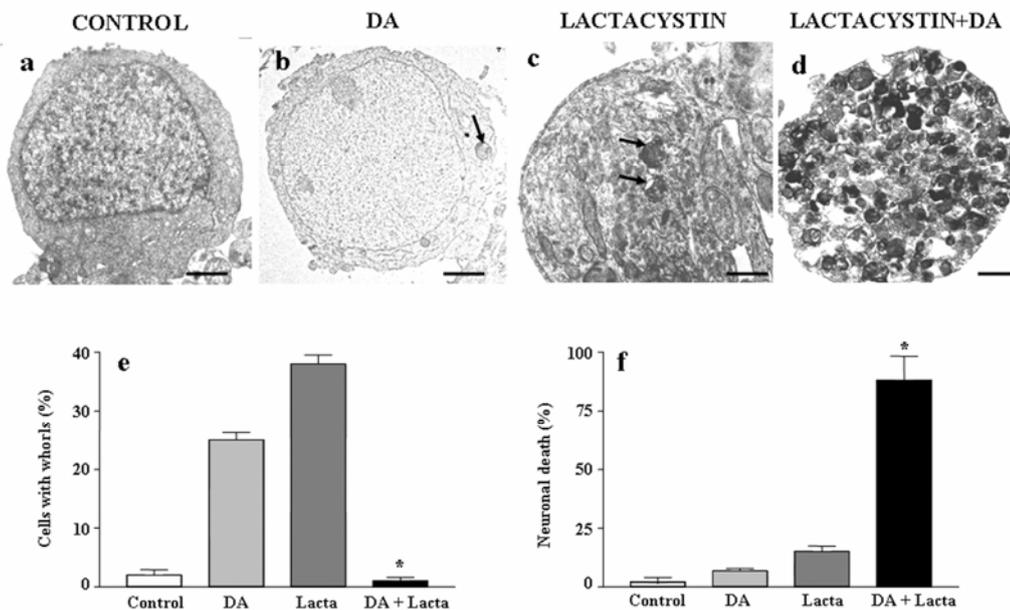


Fig 8

**Figura 3.8**

**Sinergismo fra DA e un inibitore del Proteasoma nelle colture di cellule striatali.**

Sono mostrati un neurone striatale di controllo (**a**), e gli effetti della DA (10  $\mu$ M, **b**), che sono simili a quelli osservati dopo la somministrazione dell'inibitore del Proteasoma lactacistina (10  $\mu$ M, **c**). Quando la DA è somministrata insieme con la lactacistina si osserva una elevata morte cellulare (**d**). I grafici mostrano la misura quantitativa delle cellule con gli inclusi e delle cellule morte, rispettivamente (**e-f**). Il sinergismo fra DA e lactacistina conduce alla morte delle cellule, con scomparsa delle inclusioni.

\* $P < 0.05$  paragonato alla DA e alla lactacistina singolarmente.

**Barre**=5.45  $\mu$ m (a-d).

### ***Effetti degli antagonisti e degli agonisti dei recettori dopaminergici***

Dopo somministrazione di METH, abbiamo osservato *in vivo* cambiamenti post-sinaptici nello striato dipendenti dal rilascio presinaptico di DA; e abbiamo riprodotto questi effetti somministrando alle colture striatali DA esogena.

Questi risultati ci hanno spinti ad esaminare il meccanismo con cui la DA extracellulare può innescare gli effetti post-sinaptici. Poichè i recettori D<sub>1</sub> che D<sub>2</sub> sono presenti sulla membrana delle cellule striatali (Maus et al., 1989; Brami-Cherrier et al., 2002), abbiamo somministrato contemporaneamente alla DA antagonisti specifici e non specifici della DA alle colture cellulari striatali. In figura 3.9a e 3.9b sono mostrati gli effetti dell'eticlopride e della flufenazina (entrambi alla dose di 1  $\mu$ M) nell'indurre cellule con inclusioni e nel provocare morte cellulare. Come mostrato nel grafico di figura 3.9a, l'eticlopride, selettiva per i recettori D<sub>2</sub>, produce una blanda riduzione del numero di cellule con inclusi, ma non riduce il numero di cellule morte (Fig. 3.9b). D'altra parte la flufenazina, antagonista prevalentemente D<sub>1</sub>, riesce ad impedire con grande efficacia il fenomeno della morte cellulare (Fig. 3.9b) indotto dalla DA (10  $\mu$ M), inducendo invece un aumento di cellule con inclusi (Fig. 3.9a). Si può quindi ipotizzare che gli effetti della flufenazina siano protettivi contro la morte cellulare in quanto convertono il numero di cellule morte in cellule con inclusi.

Questi dati suggeriscono una franca neurotossicità, consistente nella morte cellulare mediata principalmente dai recettori D<sub>1</sub>, mentre il contributo dei recettori D<sub>2</sub> sembra molto minore poiché riduce soltanto il numero di cellule con inclusi e non ha alcun

effetto sulla morte delle cellule ottenuta per dosi elevate di DA. Ciò è stato confermato dal fatto che l'antagonista SCH 23390, altamente selettivo nei confronti dei recettori D<sub>1</sub>, assicura protezione se somministrato congiuntamente a varie dosi di DA (1  $\mu$ M) (Fig. 3.9c e 3.9d). In particolare, abbiamo trovato che il SCH 23390 previene gli inclusi indotti da basse concentrazioni di DA, e soprattutto impedisce la morte delle cellule indotta da una più alta concentrazione di DA. Quando la DA è somministrata alle concentrazioni più alte il SCH 23390, proprio come la flufenazina, converte la morte delle cellule in un aumentato numero di cellule con inclusi. Ciò conferma un ruolo importante dei recettori D<sub>1</sub> nella mediazione degli effetti mortali indotti dalla DA.

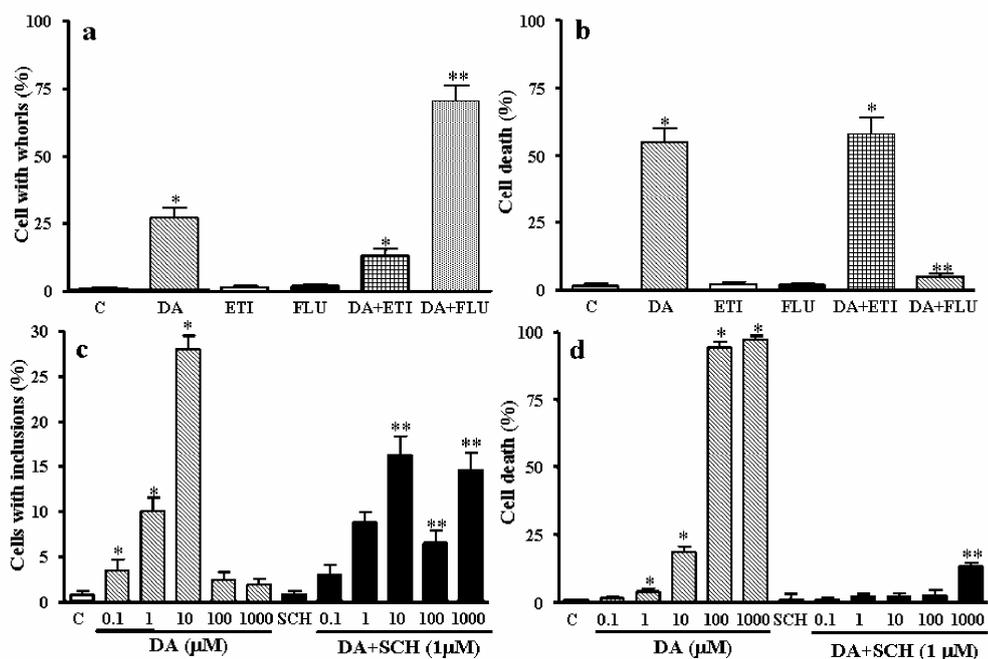


Fig 9

### Figura 3.9

#### Effetti di vari antagonisti della DA sugli effetti della DA nelle colture di cellule striatali.

La somministrazione dell'antagonista selettivo D<sub>2</sub> eticlopride produce un blando effetto sul numero di cellule con inclusi (a), ma non cambia il numero di cellule morte rispetto alla DA da sola (b), mentre l'antagonista D<sub>1</sub> flufenazina trasforma l'effetto letale della DA nella formazione di inclusi. Il risultato della somministrazione dell'antagonista selettivo D<sub>1</sub> SCH 23390, sul numero di cellule con inclusi o di cellule morte dopo l'aumento delle dosi di DA, è molto efficace (c-d). L'antagonista selettivo D<sub>1</sub> produce

una completa protezione contro la morte cellulare, tuttavia a dosi alte di DA previene la morte cellulare, congiuntamente alla formazione degli inclusi nelle cellule sopravvissute.

\*P<0.05 paragonato ai controlli; \*\*P<0.05 paragonato alla sola DA.

Per valutare al meglio il ruolo della stimolazione del recettore D<sub>1</sub> abbiamo somministrato l'agonista selettivo per il recettore, SKF 38393, sia a dosi che a tempi diversi alle colture di cellule striatali primarie. La figura 3.10a mostra la struttura subcellulare normale di una cellula di controllo, mentre nelle figure 3.10b e 3.10c sono mostrati gli effetti del SKF 38393 (1 e 10 µM, rispettivamente) a brevi tempi. In questa fase iniziale, il SKF 38393 produce corpi vescicolari che ricordano quelli prodotti dalla DA. Prolungando l'esposizione all'agonista dei recettori D<sub>1</sub> fino a 72 ore alle dosi 1 e 10 µM (Fig. 3.10d e 3.10e, rispettivamente), abbiamo ottenuto inclusioni simili a quelli indotti dalla DA agli stessi intervalli di tempo. Le figure 3.10f e 3.10g mostrano rispettivamente gli effetti di tre dosi differenti di SKF 38393 sul numero di cellule con corpi vescicolari (24 ore) e inclusi (72 ore). Vale la pena di accennare che nessuna delle dosi esaminate di SKF 38393 ha indotto morte cellulare, a differenza degli effetti neurotossici indotti dalle alte concentrazioni di DA.

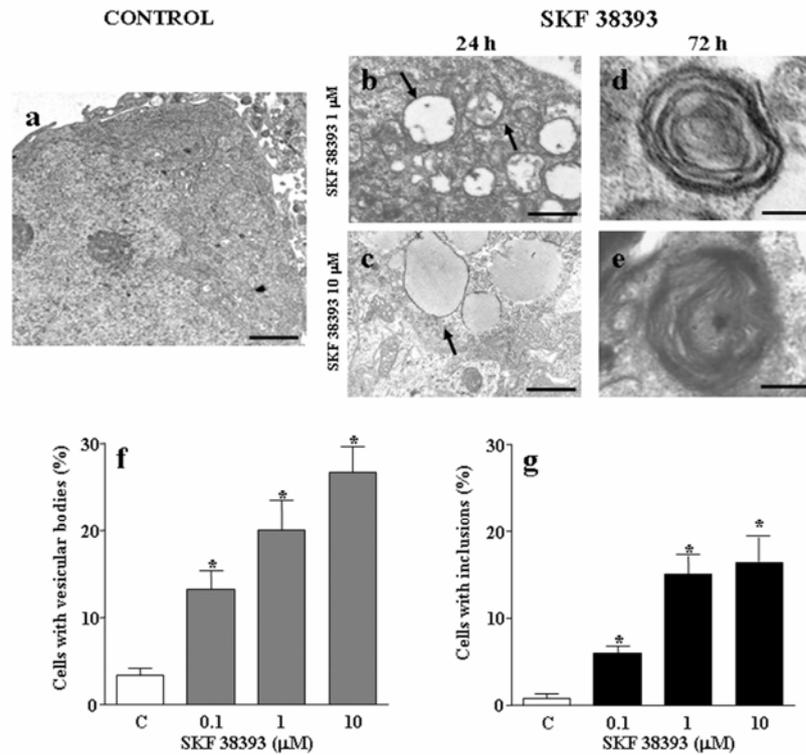


Fig 10

### Figura 3.10

#### Effetto dose-dipendente dell'agonista $D_1$ SKF 38393 sulle colture di cellule striatali.

Cellula di controllo (a), dopo una breve esposizione (24 ore) a dosi differenti (1 e 10  $\mu\text{M}$ , rispettivamente) dell'agonista della DA SKF 38393 le cellule presentano corpi vescicolari (b-c). Dopo una lunga esposizione (72 ore) alla stessa dose (1 e 10  $\mu\text{M}$ , rispettivamente) dell'agonista della DA (d-e), si manifestano inclusi simili a quelli indotti dalla DA. Sia i corpi vescicolari (f) che gli inclusi (g) sono stati contati e posti in grafico alle varie dosi di SKF 38393.

**Barre** = 4.62  $\mu\text{m}$  (a); 2.0  $\mu\text{m}$  (b,c); 0.66  $\mu\text{m}$  (d,e).

## 4. DISCUSSIONE

I dati attuali dimostrano che la DA endogena è essenziale per l'induzione delle alterazioni subcellulari prodotte *in vivo* dalla METH all'interno dei neuroni striatali, che consistono in formazioni multilamellari positive all'ubiquitina e all' $\alpha$ -sinucleina. Ciò è stato dimostrato in primo luogo *in vivo*, verificando che la privazione transitoria o definitiva (lesione con 6-OH-DA) di DA, potevano entrambe impedire la formazione degli inclusi nei neuroni striatali dopo la somministrazione di METH. Infatti la METH è un attivatore potente del rilascio di DA, suggerendo che la formazione degli inclusi nei neuroni striatali post-sinaptici sia collegata con la DA extracellulare. L'aumento dei livelli extracellulari di DA, indotti dalla METH, è associato ad un aumentato livello dei ROS (Battaglia et al., 2002), facendo supporre che derivino dal rilascio di DA stessa.

In questo studio abbiamo accertato che la denervazione dopaminergica striatale o il blocco della sintesi della DA, hanno inibito il rilascio di DA indotto dalla METH, e hanno attenuato la produzione dei radicali liberi eliminando la presenza degli inclusi all'interno dei neuroni striatali post-sinaptici.

La quantità elevata di DA extracellulare è il requisito necessario per produrre le alterazioni subcellulari all'interno dei neuroni striatali. Alla base di questo fenomeno ci possono essere due vie meccanicistiche principali: (i) attivazione dei recettori della DA; (ii) danni indotti dalla quantità elevata di radicali liberi. Per valutare questi meccanismi abbiamo replicato la formazione di questi inclusi *in vitro*, in colture di cellule striatali primarie. In accordo al ruolo chiave della DA nel promuovere la formazione degli inclusi indotti dalla METH nelle cellule striatali *in vivo*, è stato trovato che *in vitro* la METH da sola non induce alcun cambiamento morfologico delle cellule. Infatti, le colture delle cellule striatali né immagazzinano né liberano DA; tuttavia è stato possibile indurre la formazione degli inclusi dopo somministrazione esogena di DA.

In particolare, il numero di cellule con inclusi è dose-dipendente. A dosi elevate, la DA induce anche morte cellulare riducendo il numero di cellule con inclusi. Dopo il trattamento con DA (10  $\mu$ M) si ha un aumento dell'immuno-marcatore sia per l'ubiquitina che per l' $\alpha$ -sinucleina, in modo tempo dipendente. L'indagine

ultrastrutturale delle inclusioni indotte dalla DA, ha mostrato che l'ubiquitina è diffusa nel loro interno, mentre l' $\alpha$ -sinucleina è preferenzialmente raggruppata alla periferia. La presenza di proteine che appartengono al sistema UP nella struttura di questi inclusi intracellulari, descritta *in vivo* (Fornai et al., 2004a, b; Quan et al., 2005) ed *in vitro* (Larsen et al., 2002, Fornai et al., 2004a), è in linea con quanto ottenuto dopo somministrazione di inibitori del proteasoma (Fornai et al., 2003). Questo ci ha condotti a valutare se la METH potesse inibire il sistema UP e se tale inibizione fosse diretta o mediata dalla DA endogena. Abbiamo quindi paragonato gli effetti della METH sul sistema UP in cellule PC12, con gli effetti della METH sulle colture primarie striatali. Abbiamo trovato che la METH può inibire in modo dose-dipendente il sistema UP nelle colture cellulari di PC12, anche se (in conformità con il ruolo chiave della DA) questo effetto scompare in assenza di DA. In accordo con questo, nelle colture di cellule striatali non è stata rilevata alcuna inibizione del sistema UP, mentre l'aggiunta di DA esogena ha prodotto un'inibizione.

Sono stati ulteriormente indagati gli effetti biochimici e strutturali indotti dalla DA nelle colture di cellule striatali valutando il ruolo di recettori specifici della DA. Abbiamo trovato che lo stimolo di recettori dopaminergici ha prodotto un notevole effetto nell'innescare la formazione degli inclusi. In dettaglio, è il sottotipo D<sub>1</sub> che svolge il ruolo maggiore, sia dopo somministrazione di agonisti che di antagonisti selettivi. Sono stati analizzati questi recettori perchè sia i D<sub>1</sub> che i D<sub>2</sub> sono presenti nelle cellule striatali in coltura (Maus et al., 1989; Brami-Cherrier et al., 2002). Abbiamo trovato che soltanto in presenza di un blocco dei recettori D<sub>1</sub> (ottenuto con la flufenazina o con SCH23390) era possibile impedire la morte delle cellule indotta dalla DA; mentre il ruolo dei recettori D<sub>2</sub> non era rilevante nella protezione contro la morte delle cellule, ed era limitato alla riduzione del numero degli inclusi indotti dalle basse dosi di DA. Ciò nonostante, non è stato possibile attribuire completamente i meccanismi di neurotossicità, indotti dalla DA sulle cellule striatali, allo stimolo dei recettori della DA. Infatti, quando sono state somministrate dosi elevate di DA, la presenza dell'antagonista altamente selettivo SCH23390 del recettore D<sub>1</sub> poteva ancora impedire la morte delle cellule, ma non era più efficace nell'impedire la formazione degli inclusi. In altre parole l'effetto netto della somministrazione congiunta di dosi

elevate di DA e di un antagonista del recettore D<sub>1</sub> è stata la conversione di una neurotossicità franca (perdita delle cellule) verso una forma più blanda di danno neuronale (formazione degli inclusi).

Il ruolo forte, ma ancora parziale dell'attivazione del recettore dopaminergico nella mediazione della neurotossicità indotta dalla DA nelle cellule striatali, è stato confermato dagli effetti di un agonista specifico del recettore D<sub>1</sub> che, malgrado possa riprodurre formazioni ultrastrutturali all'interno dei neuroni striatali, non può da solo produrre la morte delle cellule. Quindi, lo stimolo dei recettori dopaminergici differisce parzialmente dagli effetti prodotti dalla DA. È probabile che questo sia dovuto ad un sinergismo concomitante prodotto dalle specie reattive dell'ossigeno extracellulari prodotte dalla DA nel mezzo cellulare. Un tale effetto si pensa possa accadere maggiormente *in vivo*, dove i comparti coinvolti dalla METH vanno oltre il sistema della DA, e le fonti potenziali di ROS extracellulari indotte dalla METH sono molto più abbondanti. Questi dati portano a pianificare ulteriori studi mirati ad analizzare il ruolo degli antagonisti della DA *in vivo*; tuttavia nella progettazione di questi esperimenti dovrebbe essere considerato che usare questi composti *in vivo* conduce all'ipotermia che, a sua volta, protegge dalla tossicità della METH (Miller e O'Callaghan, 1994). D'altra parte, è stato osservato che la potenza degli antagonisti della DA è ridotta *in vivo* e un effetto simile si verifica osservando l'azione degli agonisti della DA. In questo studio, è stato confermato che *in vivo* l'efficacia della METH nella promozione del rilascio di DA striatale è drammatica, così come l'aumento correlato dei livelli extracellulari di ROS. E' interessante notare che abolendo il rilascio di DA nello striato non viene cancellata la produzione delle specie reattive dell'ossigeno, aprendo la possibilità che i ROS *in vivo* possano aumentare anche attraverso meccanismi non correlati alla DA. Per esempio, è noto che la METH produce un aumento dei neurotrasmettitori extracellulari oltre alle monoammine, compreso il glutammato e varie altre molecole. Negli studi sugli effetti prodotti dalla METH *in vitro* deve essere considerato che la protezione ottenuta dagli antagonisti della DA sia molto forte ma non completa, ed *in vivo* altri meccanismi (molto limitati nel campione biologico di una coltura di cellule striatali) possano svolgere un ruolo ben maggiore dovuto alla complessità del tessuto striatale. E' fondamentale prendere in considerazione questa

prospettiva auto-limitante quando il terreno biologico approssimativo, offerto da una coltura cellulare, viene confrontato con il modello articolato del tessuto striatale *in vivo*. Tenendo presenti questi “trabocchetti” potenziali, i nostri dati sono risultati conformi a quelli ottenuti in altri esperimenti effettuati da Wersinger et al. (2004). Questi autori suggeriscono che ci siano due vie di segnalazione con cui la DA induce la neurotossicità; dimostrando che lo stimolo dei recettori D<sub>1</sub> induce gli stessi effetti della DA, ma meno specie reattive dell’ossigeno e una morte dei neuroni ridotta. Questi effetti possono essere bloccati somministrando l’antagonista selettivo del recettore D<sub>1</sub>, SCH23390.

Il presente studio indica che le alterazioni dello striato dipendenti dalla DA sono dovute alla METH e questi effetti *in vitro* sono dovuti all’attivazione della sottoclasse dei recettori D<sub>1</sub> (Lazzeri et al., 2007). Anche se non possiamo trarre conclusioni *in vivo*, è noto che lo stimolo ripetuto di questa categoria di recettori, e una risposta alterata dei neuroni striatali si verificano sia dopo un’esposizione cronica alle droghe d’abuso (Dong et al., 2004), sia in conseguenza di uno stimolo intermittente della DA nella Malattia di Parkinson (Chartoff et al., 2001). In conformità con questo, è stato stabilito (Gerfen et al., 2002) che una sensibilità alterata del recettore D<sub>1</sub> è responsabile dell’attività alterata dei neuroni striatali e può determinare il verificarsi di movimenti involontari anormali. Uno studio recente del gruppo di Bezard (Aubert et al., 2005) ha dimostrato che le alterazioni del recettore D<sub>1</sub>, ma non del recettore D<sub>2</sub>, possono essere collegate con l’insorgere dei movimenti involontari anormali nei primati.

Da questo studio si evince una correlazione morfologica specifica che si verifica all’interno dei neuroni striatali dopo lo stimolo dei recettori D<sub>1</sub>, e che consiste nella formazione degli inclusi neuronali contenenti sia ubiquitina che  $\alpha$ -sinucleina. Queste strutture sono strettamente correlate all’inibizione del sistema UP: il modo in cui l’attivazione dei recettori della DA conduca ad un coinvolgimento del sistema UP resta completamente da investigare, nonostante sia stato trovato recentemente che la  $\beta$ -arrestina, una proteina che veicola i recettori delle catecolammine al sistema UP, risulta inclusa all’interno delle formazioni indotte dalla METH (De Blasi et al., 2003). Questa via di segnalazione è un forte candidato alla modulazione dell’attività del sistema UP conseguente allo stimolo dei recettori dopaminergici.

## 5. CONCLUSIONI

- La mancanza di DA riduce significativamente le alterazioni ultrastrutturali indotte nel tessuto striato dalla METH. Ciò suggerisce che l'integrità dei terminali dopaminergici striatali svolge un ruolo chiave nell'induzione degli effetti post-sinaptici della METH.
- La DA è richiesta per l'induzione di inclusi intracellulari in colture primarie di cellule striatali. Tali inclusioni sono positive per l'ubiquitina e per l' $\alpha$ -sinucleina.
- La morte cellulare e la formazione degli inclusi sono inversamente correlate, suggerendo che gli inclusi neuronali possano rappresentare una fase più leggera e/o precoce di tossicità e supportando l'ipotesi di un ruolo protettivo degli inclusi stessi.
- La formazione di inclusi neuronali è correlata alla inibizione del sistema UP.
- Gli effetti neurotossici della DA sulle cellule striatali sembra mediato dalla stimolazione selettiva dei recettori D1. L'inibizione di tali recettori riduce significativamente la morte cellulare indotta da alte dosi di DA e aumenta il numero di cellule con inclusi, suggerendo che il meccanismo di formazione delle inclusioni neuronali possa rappresentare una risposta protettiva per la cellula contro gli insulti neurotossici.

## BIBLIOGRAFIA

Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A and al. (2000) *NEURON* 25, 239–252

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al. (1999) Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.*; 59:2615-2622.

Arima K, Ueda K, Sunohara N, Hirai S, Izumiyama Y, Tonzuka-Uehara and Kawai M. (1998) *Brain Res.* 808,93-100.

Aubert I, Guigoni C., Hakansson K. et al (2005) Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann. Neurol.* 57, 17-26.

Axt KJ, Commins DL, Vosmer G, Seiden LS. (1990) alpha-Methyl-p-tyrosine pretreatment partially prevents methamphetamine-induced endogenous neurotoxin formation. *Brain Res.* May 7;515(1-2):269-76.

Battaglia G., Fornai F., Busceti, C. L. et al (2002) Selective blockade of mGlu5 Metabotropic glutamate receptors is protective against Methamphetamine neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 22, 2135-2141.

Betarbert R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Grenamyre JT. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 3: 1301-1306.

Boveris A, Costa LE, Poderoso JJ, Carreras MC, Cadenas E. Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:121-35. Review.

Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Garcia, M. et al (2002) Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J. Neurosci.* 22, 8911-8921.

Brown, J. M., Quinton, M. S. and Yamamoto, B. K. (2005) Methamphetamine-induced inhibition of mitochondrial complex II: roles of glutamate and peroxynitrite. *J. Neurochem.*, 95, 429-436.

Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci* Oct 15;22(20):8797-807.

Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R and Sudhof TC (2003). *J Biol Chem* 278, 15313–15318.

Chandra S, Fornai F, Kwon HB, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, Hammer RE, Battaglia G, German DC, Castillo PE, Sudhof TC. (2004) Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci USA* Oct 12;101(41):14966-71.

Chartoff E. H., Marck B. T., Matsumoto A. M. et al (2001) Induction of stereotypy in dopamine-deficient mice requires striatal D1 receptor activation. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 98, 10451-10456.

Charvin D., Vanhoutte P., Pages C., Borelli E. and Caboche, J. (2005) Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 102, 12218-12223.

Ciechanover A. (2005) Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ.* ;12(9):1178-90. Review.

Conway K. A., Lee S. J., Rochet, J. C. et al (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 97, 571-576.

Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT JR. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science*. Nov 9;294(5545):1346-9.

Cubells J. F., Rayport S., Rajendran G. and Sulzer D. (1994) METHamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J. Neurosci.* 14, 2260-2271.

Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. (2004) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. Aug 27;305(5688):1292-5.

Davidson WS, Jonas A, Clayton DF and George JM (1998). *J Biol Chem* 273, 9443–9449.

Dawson TM, Dawson VL. (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*. 302(5646):819-22. Review.

De Blasi A., Capobianco L., Iacovelli L. et al. (2003) Presence of beta-arrestin in cellular inclusions in Methamphetamine-treated PC12 cells. *Neurol. Sci.* 24, 164-165.

DeMartino GN, Slaughter CA. (1999) The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem.*;274:22123-22126.

Dong Y., Saal D., Thomas M. et al. (2004) Cocaine-induced potentiation of synaptic strength in dopamine neurons: behavioral correlates in GluRA(-/-) mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 14282-14287.

El-Agnaf O.M.A. and Irvine G.B. (2000) *J. Struct. Biol.* 130, 300–309.

Eliezer D, Kutluay E, Bussel R and Browne G (2001). *J Mol Biol* 307, 1061–1073.

Eriksen JL, Dawson TM, Dickson DW, Petrucelli L. (2003) Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron*. Oct 30;40(3):453-6. Review.

Fornai F., Giorgi F.S., Alessandrì M.G., Giuliani M. and Corsini G.U. (1999). Effects of pretreatment with N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) on Methamphetamine pharmacokinetics and striatal dopamine losses. *J. Neurochem.* 72, 777-784.

Fornai F., Lenzi P., Gesi, M. Ferrucci, M. et al (2003) Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J. Neurosci.* 23, 8955-8966.

Fornai F., Lenzi P., Gesi M. et al. (2004a) Methamphetamine produces neuronal inclusions in the nigrostriatal system and in PC12 cells. *J. Neurochem.* 88, 114-123.

Fornai F., Lenzi P., Frenzilli G. et al (2004b). DNA damage and ubiquitinated neuronal inclusions in the substantia nigra and striatum of mice following MDMA (ecstasy). *Psychopharmacology (Berl)*, 173, 353-363.

Fornai F, Lenzi P, Ferrucci M, Lazzeri G, di Poggio AB, Natale G, Buscati CL, Biagioni F, Giusiani M, Ruggieri S, Paparelli A. (2005) Occurrence of neuronal inclusions combined with increased nigral expression of alpha-synuclein within dopaminergic neurons following treatment with amphetamine derivatives in mice. *Brain Res Bull.* 65(5):405-13.

Fornai F, Lenzi P, Lazzeri G, Ferrucci M, Fulceri F, Giorgi FS, Falleni A, Ruggieri S, Paparelli A. (2007) Fine ultrastructure and biochemistry of PC12 cells: a comparative approach to understand neurotoxicity. *Brain Res.* Jan 19;1129(1):174-90. Epub 2006 Dec 6.

Lazzeri G, Lenzi P, Buscati CL, Ferrucci M, Falleni A, Bruno V, Paparelli A, Fornai F. (2007) Mechanism involved in the formation of dopamine-induced intracellular bodies within striatal neurons. *J Neurochem.* Jun; 101 (5): 1414-27. Epub 2007 feb 5.

Forno, L. S., Langston, J. W., Delanney, L. E., Irwin, I., Ricaurte, G. A., 1986, Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys, *Ann. Neurol.* 20:449.

Gerfen C. R., Miyachi S., Paletzki, R. and Brown P. (2002) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase *J. Neurosci.* 22, 5042-5054.

Giovanni A., Liang L. P., Hastings T. G., Zigmond M. J. (1995) Estimating hydroxyl radical content in rat brain using systemic and intraventricular salicylate: impact of Methamphetamine. *J. Neurochem.* 64, 1819-1825.

Goedert, M. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 492–501.

Gomez-Tortosa E, Newell K, Irizarry MC, Sanders JL, Hyman BT. (2000) alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. *Acta Neuropathol (Berl)*. Apr;99(4):352-7.

Hickey M. A., Reynolds, G. P., and Morton A. J. (2002) The role of dopamine in motor symptoms in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 81, 46-59.

<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/microprot.html>

<http://www.nottingham.ac.uk/biochemcourses/students/ub/ubintro.html>

Iacovelli L, Fulceri F, De Blasi A, Nicoletti F, Ruggieri S, Fornai F. (2006) The neurotoxicity of amphetamines: Bridging drugs of abuse and neurodegenerative disorders. *Exp Neurol*. May 4 (in press)

Iwai A. (2000) *Biochim Biophys acta* 1502, 95–109.

Jakel R. J. and Maragos W. F. (2000) Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends. Neurosci.* 23, 239-245.

Larsen K. E., Fon E. A., Hastings T. G., Edwards R. H., and Sulzer D. (2002) Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *Neuroscience* 22, 8951-8960.

LaVoie M. J., Ostaszewski B. L., Weihofen A., Schlossmacher M. G. and Selkoe, D. J. (2005) Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat. Med.* 11, 1214-1221.

Lee SJ. (2003) alpha-synuclein aggregation: a link between mitochondrial defects and Parkinson's disease? *Antioxid Redox Signal.* Jun;5(3):337-48. Review.

Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL, Herman B. (1999) Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr.* Aug;31(4):305-19. Review.

Lowry O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Leonardi ET, Azmitia EC. (1994) MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology*. Jul;10(4):231-8.

Maragos W. F., Jakel R. J., Pang Z. and Geddes J. W. (1998) 6-Hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway attenuate striatal malonate and 3-nitropropionic acid lesions. *Exp. Neurol.* 154, 637-644.

Maus M., Bertrand P., Drouva S. et al (1989) Differential modulation of D1 and D2 dopamine-sensitive adenylate cyclases by 17 beta-estradiol in cultured striatal neurons and anterior pituitary cells. *J. Neurochem.* 52, 410-418.

McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. (2001) Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2(8):589-94. Review.

McNaught KS, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 179(1):38-46.

McNaught KS, Olanow CW. (2006) Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 27(4):530-45. Review.

Miller D. B. and O'Callaghan J. P. (1994) Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270, 752-760.

Moy L. Y., Zeevalk G. D. and Sonsalla P. K. (2000) Role for dopamine in malonate-induced damage *in vivo* in striatum and *in vitro* in mesencephalic cultures. *J. Neurochem.* 74, 1656-1665.

Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ and Lee VM. (2000) *J Neurosci* 20, 3214–322.

Myung J, Kim KB, Crews CM. (2001) The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev.* 21:245-273.

Norris E. H., Giasson B. I., Hodara R. et al (2005) Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *J. Biol. Chem.* 280, 21212-21219.

Orloski M., Caedozo C., Hidalgo M. C. and Michaud C. (1991). Regulation of the peptylglutamyl-peptide hydrolyzing activity of the pituitary multicatalytic protease complex. *Biochemistry*. 30, 5999-6005.

Paxinos G. and Franklin K. B. J. (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.

Quan L., Ishikawa T., Michiue T. et al. (2005) Ubiquitin immunoreactive structures in the midbrain of Methamphetamine abusers. *Leg. Med. (Tokyo)* 7, 144-150.

Raiteri M, Cerrito F, Cervoni AM, Del Carmine R, Ribera MT, Levi G. (1978). Release of dopamine from striatal synaptosomes. *Ann Ist Super Sanità* 14(1):97-110.

Ricaurte G.A., Guillery R.W., Seiden L.S., Schuster C.R. and Moore R.Y. (1982) Dopamine nerve degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. *Brain Res.* 235,93-103

Rose K., Goldberg M. P. and Choi D. W. (1992) Cytotoxicity in murine neocortical cell cultures, in *Methods in Toxicology*, (Tyson C. A. and Frazier J. M., eds), Vol. 1, pp. 46–60. San Diego Academics, San Diego.

Ross CA, Pickart CM. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.* Dec;14(12):703-11.

Roy S, Wolman L. (1969) Electron microscopic observations on the virus particles in Herpes simplexencephalitis. J Clin Pathol. Jan;22(1):51-9.

Rudnick G, Wall SC. (1992). p-Chloroamphetamine induces serotonin release through serotonin transporters. Biochemistry. Jul 28;31(29):6710-8.

Schmidt C. J., Ritter J. K., Sonsalla P. K., Hanson G. R. and Gibb J. W. (1985) Role of dopamine in neurotoxic effects of Methamphetamine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 233, 539-544.

Seiden LS, Vosmer G. (1984) Formation of 6-hydroxydopamine in caudate nucleus of the rat brain after a single large dose of methylamphetamine. Pharmacol Biochem Behav. Jul;21(1):29-31.

Seiden L.S. and Ricaurt G.A.(1987) Neurotoxicity oh methamphetamine and related drugs, in Psychopharmacology: the third generation of progress,(Mellzter,H.Y.,ed),pp. 359-366. Raven press, New York

Serpell LC, Bemman J, Jakes R, Goedert M and Crowther RA (2000). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 4897–4902

Shults CW. (2004) Mitochondrial dysfunction and possible treatments in Parkinson's disease--a review. *Mitochondrion*. Sep;4(5-6):641-8. Epub 2004 Sep 29.

Shults C. W. (2006) Lewy bodies (Edited by Huda Y. Zoghbi, Baylor College of Medicine, Houston, TX). *PNAS* vol. 103 n. 6, 1661–1668.

Snyder H, Wolozin B. (2004) Pathological proteins in Parkinson's disease: focus on the proteasome. *J Mol Neurosci*.;24(3):425-42. Review.

Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R. and Goedert M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature* 388, 839-840.

Sulzer D, Holtzman E. (1989) Acidification and endosome-like compartments in the presynaptic terminals of frog retinal photoreceptors. *J Neurocytol*. Aug;18(4):529-40.

Sulzer D, Rayport S. (1990) Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: a mechanism of action. *Neuron*. Dec;5(6):797-808.

Sulzer D. (2001) alpha-synuclein and cytosolic dopamine: stabilizing a bad situation. *Nat Med*. Dec; 7(12):1280-2.

Uversky, V.N., LI & J. and Fink, A.L. (2002) *Febs Lett*. 522, 9-13.

Weinreb PH, Zhen WG, Poon AW, Conway KA and Lansbury JR, P.T. (1996) *Biochemistry* 35, 13709–13715.

Wersinger C., Chen J., and Sidhu A. (2004) Bimodal induction of dopamine-mediated striatal neurotoxicity is mediated through both activation of D1 dopamine receptors and autoxidation. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 124-137.

Wolf DH, Hilt W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta.*;1695:19-31.