

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Dipartimento di Morfologia Umana e Biologia Applicata

Dottorato di Ricerca in

Morfologia e Funzione Normale e Patologica di Cellule e Tessuti

La metanfetamina induce nel topo inclusioni neuronali e un incremento di alfa-sinucleina all'interno dei neuroni dopaminergici

Presidente: Chiar.mo Prof. Antonio Paparelli

Relatore

Dott.ssa Paola Lenzi

Candidato

Dott. Giuseppe Mauceli

Anni 2005-2007

INDICE

RIASSUNTO	I
1 INTRODUZIONE	3
1.1 La malattia di Parkinson come modello di patologia con inclusi neuronali	3
1.2 α -sinucleina	6
1.3 Corpi di Lewy	10
1.4 Sistema Ubiquitina-Proteasoma	12
1.5 Metanfetamina	17
2 SCOPO DELLO STUDIO	24
3 MATERIALI E METODI	25
3.1 Microscopia ottica	25
3.2 Microscopia elettronica	26
3.3 Western Blotting	28
3.4 Saggio delle monoamine in HPLC	30
3.5 Analisi statistica	31
4 RISULTATI	32
4.1 Denervazione striatale	32
4.2 Incremento selettivo dell' α -sinucleina nella SNpc	36
5 DISCUSSIONE	41
6 CONCLUSIONI	44
7 BIBLIOGRAFIA	45

RIASSUNTO

La presenza di inclusioni neuronali è una caratteristica anatomopatologica di un ampio numero di malattie neurodegenerative come la Malattia di Parkinson (MdP). Questi inclusi, noti anche come corpi di Lewy, sono inclusioni di natura principalmente proteica che si trovano all'interno dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars-compacta (SNpc), nei neuroni della corteccia cerebrale e nel proencefalo basale. Queste inclusioni sono state descritte come aggregati citoplasmatici neuronali debolmente eosinofili. L'accumulo di questi aggregati citoplasmatici, è un fenomeno complesso che può avere molte cause. Uno dei meccanismi biochimici che possono causare l'accumulo di tali formazioni, è rappresentato dal sistema Ubiquitina-Proteasoma che, insieme all'autofagia, è il principale meccanismo cellulare di degradazione delle proteine anomale, mutate o eccessivamente espresse. Il mancato funzionamento del sistema Ubiquitina-Proteasoma, anche in maniera parziale, infatti, è in grado di determinare un accumulo di proteine nel citosol cellulare che, aggregandosi, formano le inclusioni o corpi di Lewy. Presenza costante nei corpi di Lewy è l' α -sinucleina, una proteina presinaptica la cui funzione è ancora in gran parte sconosciuta.

L' α -sinucleina è presente nei corpi di Lewy, fin dai primi stadi della loro formazione tanto che ne costituisce il marker specifico.

Gli studi condotti dal nostro gruppo su cellule PC12 trattate con metanfetamina (METH) hanno permesso di osservare la formazione di inclusioni citoplasmatiche contenenti α -sinucleina. Al fine di indagare questo fenomeno in maniera più

approfondita, abbiamo condotto una serie di ricerche *in vivo* su topi C57/Black (N=40). Al primo gruppo di animali (N=20) è stata somministrata (i.p.) METH alla dose di 5 mg/kg per tre volte ad intervalli di due ore, mentre al secondo gruppo (N=20), è stata somministrata soluzione salina con le stesse modalità e con le stesse tempistiche.

I topi trattati e di controllo sono stati sacrificati dopo sette giorni dalla somministrazione. Nove topi per gruppo sono stati usati per indagini morfologiche (microscopia ottica e microscopia elettronica) mentre i rimanenti, undici topi per gruppo, sono stati impiegati sia per l'analisi con Western Blotting che per il dosaggio delle monoamine mediante HPLC.

Il modello sperimentale di M₁ da noi utilizzato è stato validato per mezzo della microscopia ottica e dei saggi biochimici. Nei topi trattati con METH si è osservata una notevole denervazione dopaminergica striatale consistente con una significativa riduzione della dopamina striatale e dei suoi principali metaboliti rispetto ai controlli

Inoltre, nei neuroni dopaminergici della SNpc abbiamo potuto osservare la presenza di inclusioni positive per l' α -sinucleina ed un aumento dell'espressione dell' α -sinucleina stessa.

La somministrazione di METH induce quindi una significativa riduzione dei terminali dopaminergici a livello striatale ed un incremento nell'espressione di α -sinucleina nei neuroni dopaminergici della SNpc. Inoltre, l'aumento di α -sinucleina è strettamente correlato alla formazione di inclusi neuronali, nei quali questa proteina è costantemente presente.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA MALATTIA DI PARKINSON COME MODELLO DI PATOLOGIA CON INCLUSI NEURONALI

Il Morbo di Parkinson (MdP) è una patologia neurodegenerativa la cui diffusione, è seconda solo al morbo di Alzheimer. La forma sporadica di questa malattia colpisce circa l'1% degli individui al di sopra dei sessanta anni di età ed ha quindi una insorgenza tardiva, il suo andamento è progressivo e provoca disordini a livello motorio. Essa deve il suo nome al medico inglese James Parkinson che nel 1817 la descrisse per la prima volta, pubblicando il trattato "An Essay of the Shaking Palsy".

Questi sintomi sono causati dalla perdita di dopamina (DA) nel corpo striato, area cerebrale bersaglio dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta (SNpc), la cui degenerazione progressiva rappresenta la principale caratteristica patologica della MdP (Crossman, 1989; DeLong, 1990; Greenamyre, 1993). I sintomi motori possono essere accompagnati da disturbi autonomici che riguardano principalmente il sistema cardiovascolare, gastrointestinale ed urinario, oltre ad alterazioni di funzioni omeostatiche legate alla termoregolazione come la sudorazione. Inoltre, tra i pazienti affetti da MdP vi è un'alta incidenza di depressione e alterazioni cognitive.

Si ritiene che i sintomi non motori di tipo autonomico, siano provocati dalla neurodegenerazione in aree diverse dalla SNpc come il locus coeruleus (LC), il nucleo motore dorsale del nervo vago e la formazione reticolare del ponte e del

mesencefalo. Inoltre, il deterioramento cognitivo che caratterizza i pazienti malati di Mdp, può essere attribuito alla neurodegenerazione a livello corticale.

Dal punto di vista anatomopatologico, un tratto caratteristico della Mdp è la presenza, all'interno dei neuroni dopaminergici, di inclusioni citoplasmatiche che prendono il nome di corpi di Lewy, dal nome di colui che per primo le descrisse come strutture debolmente eosinofile all'interno dei nuclei basali di pazienti parkinsoniani (Lewy, 1912). Le ricerche successive hanno stabilito che i corpi di Lewy consistono in aggregati di natura principalmente proteica, situati all'interno dei neuroni dopaminergici della SNpc che sono sopravvissuti ai processi neurodegenerativi, nei neuroni della corteccia cerebrale e nei nuclei colinergici del proencefalo basale (Braak et al., 1995). La proteina quantitativamente più importante che va a costituire i corpi di Lewy è l' α -sinucleina che rappresenta anche il marker specifico di queste inclusioni (Spillantini et al., 1997). Oltre all' α -sinucleina, negli inclusi si possono trovare molte altre proteine, tra le quali alcune componenti il sistema Ubiquitina-Proteasoma (Meredith et al., 2004). Dal punto di vista clinico, la malattia di Parkinson è caratterizzata da disturbi di tipo motorio come il tremore a riposo, bradicinesia, instabilità posturale, accompagnati da disturbi cognitivi e psichiatrici. I processi molecolari che instaurano questa malattia, sono ancora poco chiari tuttavia si pensa che essa possa originare da fattori ambientali, genetici o una combinazione dei due. In letteratura ci sono studi epidemiologici che evidenziano come solo per una percentuale inferiore al 10% la malattia di Parkinson può essere ricondotta a fattori familiari mentre nella maggioranza dei casi, si tratta di Parkinson idiopatico. In questi ultimi anni, la scoperta dei geni responsabili di rare forme di Parkinson familiare, ha confermato

la notevole importanza dei fattori genetici nella genesi di questa patologia ed ha permesso di comprendere alcuni processi patogenetici comuni anche al ben più diffuso Parkinson idiopatico (Thomas and Beal, 2007).

La malattia di Parkinson quindi, colpisce in maniera piuttosto selettiva i neuroni dopaminergici e questa selettività si correla anche alla presenza di molte inclusioni neuronali. Il motivo di questa selettività è da ricercarsi nella natura chimica della DA che, andando incontro ad ossidazione e quindi alla formazione di radicali liberi, risulta neurotossica ed in grado perciò di portare a morte una cellula che abbia un meccanismo di difesa (come ad esempio il sistema Ubiquitina-Proteasoma) poco funzionante. Il rilevante ruolo che riveste la DA nella neurodegenerazione, è dimostrato dagli effetti protettivi che si ottengono dalla deplezione della dopamina striatale o dall'aumento di neurotossicità indotta da farmaci che aumentano i livelli di dopamina come ad esempio l'acido fusarico, che agisce inibendo l'enzima β -idrossilasi, il quale catalizza la trasformazione della dopamina in noradrenalina (Kilbourn et al., 1998). Come precedentemente accennato, la tossicità della dopamina può essere ricondotta alla sua spontanea ossidazione in derivati chinonici, come si può dimostrare mediante il blocco enzimatico della deaminazione ossidativa mediante l'uso della pargilina, un'inibitore della monoaminoossidasi (MAO) o della somministrazione del precursore della dopamina L-DOPA. Di contro, la diminuzione della concentrazione dopaminergica ottenuta mediante l' α -metil-p-tirosina (AMPT), una molecola che inibisce l'azione dell'enzima tirosina-idrossilasi (TH), previene la formazione di inclusi neuronali e la neurotossicità METH-indotta (Fornai et al., 2005).

1.2. α -SINUCLEINA

L' α -sinucleina, appartiene ad una famiglia di proteine che comprende anche la β - e la γ -sinucleina. L' α -sinucleina è una proteina presinaptica che dal punto di vista quantitativo rappresenta lo 0,5-1,0% di tutte le proteine citosoliche del cervello (Iwai et al., 1995) la cui funzione è stata, ed è tuttora, oggetto di intense ricerche

L'interesse che questa proteina riesce a catalizzare nella comunità scientifica, è dovuto, come vedremo meglio in seguito, al suo diretto coinvolgimento in molte malattie neurodegenerative che, non a caso, prendono anche il nome di "sinucleinopatie". Infatti, mutazioni nel gene che codifica per questa proteina, sono la causa di forme di MDP familiare. Inoltre anche la forma non mutata dell' α -sinucleina risulta essere neurotossica se è sovra espressa (Mosharov et al., 2006). Sebbene la sua funzione non sia ancora stata ben compresa, è stata dimostrato, attraverso la microscopia elettronica, una sua interazione con le vescicole sinaptiche ed è quindi ipotizzabile un suo ruolo attivo nel rilascio di neurotrasmettitori (Eliezer et al., 2001), nella plasticità sinaptica (Murphy et al., 2000) e nel trasporto delle vescicole entro i neuroni (Abeliovich, 2000). Studi su topi α -sinucleina knockout (Abeliovich et al., 2000) indicano che sebbene l' α -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) ed 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).

Dal punto di vista strutturale, l' α -sinucleina è formata da 140 aminoacidi ed è costituita da tre distinte regioni: una regione N-terminale anfipatica (1-60), una regione intermedia idrofobica (NAC) contenente la componente β non amiloide (61-95) ed una regione C-terminale (96-140). In seguito a legame con i fosfolipidi, la regione N-terminale dell' α -sinucleina converte la sua struttura secondaria passando da circa il 3% ad oltre il 70% di α -eliche. Inoltre la regione NAC è altamente amiloidogena e conferisce alla proteina la capacità di modificarsi a formare foglietti β (Serpell et al., 2000; El-Agnaf and Irvine, 2000). Infine, la regione C-terminale rimane distesa e non si unisce alle vescicole (Eliezer et al., 2001).

Il gene che la codifica, contiene 7 esoni, 5 dei quali sono codificanti (Norris et al., 2004). Nello stesso gene, si possono avere tre mutazioni missenso (A53T, A30P, E46K), oltre alla triplicazione del gene stesso, che portano alla forma autosomica dominante della MdP (Polymeropoulos et al., 1997; Kruger et al., 1998; Singleton et al., 2003). Numerosi gruppi di ricerca hanno dimostrato che l' α -sinucleina, può aggregarsi per formare proto fibrille e strutture fibrillari amiloidi (Conway et al., 1998; Giasson et al., 1999). In soluzione, le mutazioni A53T e A30P incrementano il tasso di oligomerizzazione dell' α -sinucleina e la formazione di foglietti β (Narhi et al., 1999; Uversky and Fink, 2002). Il tasso di mutazione delle fibrille viene incrementato dalla mutazione A53T e viene ridotto dalla mutazione A30P (Conway et al., 2000). In numerose linee cellulari, è stata osservata la formazione di aggregati, a seguito della sovra espressione di α -sinucleina, la

quale, se indotta nel topo, provoca la formazione di inclusi non fibrillari in varie regioni cerebrali dove vengono trovati i corpi di Lewy. I topi presentavano inoltre, danni al sistema dopaminergico nigrostriatale e deficit a livello motorio (Hsu et al., 2000; Stefanis et al., 2001; Stefanova et al., 2001) Questa proteina quindi, a causa della sua componente idrofobica β non amiloide, ha una spiccata propensione a formare aggregati che vanno a costituire la parte quantitativamente più importante dei corpi di Lewy, suggerendo quindi un ruolo importante degli aggregati contenenti α -sinucleina nelle malattie neurodegenerative come la MdP (Hornykiewicz, 2001). Questo concetto è stato rafforzato da esperimenti condotti su varianti transgeniche di *Drosophila melanogaster*, resa in grado di esprimere l' α -sinucleina, e nella quale è stata osservata perdita neuronale e formazione di inclusi molto simili ai corpi di Lewy che si riscontrano nella malattia di Parkinson (Feany and Bender, 2000). Questi studi hanno permesso inoltre di confermare quale sia l'importanza del dominio idrofobico. Esemplari di *Drosophila* a cui mancava la porzione idrofobica nel gene per l' α -sinucleina infatti, non evidenziavano né formazione di aggregati né sviluppo di patologie. Uno dei più immediati effetti avversi dovuti ad un accumulo di α -sinucleina, è il blocco del traffico vescicolare dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi che causa stress al reticolo endoplasmatico stesso (Cooper et al., 2006). Inoltre, topi transgenici che esprimono α -sinucleina umana A53T, sviluppano patologie legate al malfunzionamento dei mitocondri, evidenziando così un ruolo cruciale dell' α -sinucleina nella modulazione delle funzioni mitocondriali (Martin et al., 2006; Stichel et al., 2007). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che l' α -sinucleina è

un modulatore del danno ossidativo dal momento che topi deficienti del gene che la codifica, sono più resistenti alle tossine mitocondriali (Klivenyi et al., 2006).

Come precedentemente accennato, il prototipo delle sinucleinopatie, è la M α P nella quale l' α -sinucleina viene identificata come una componente costante dei corpi di Lewy. Altre patologie dove l' α -sinucleina è direttamente coinvolta, sono la demenza a corpi di Lewy (DLB), una variante del morbo di Alzheimer (LBVAD), il morbo di Huntington, la demenza fronto-temporale, la paresi progressiva sopranucleare, la sindrome di Down, la sclerosi subacuta pan encefalitica, l'atassia-telangectasia ed altre malattie più rare come l'atrofia multi sistemica (MSA) e la neuro degenerazione con accumuli ferrosi di tipo 1 (NBIA-1) (Charles et al., 2000; Jellinger, 2003; Dev et al., 2003).

1.3. CORPI DI LEWY

Come accennato in precedenza, nella MdP vi è la presenza costante, nei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta, dei corpi di Lewy, tanto che la loro presenza è uno dei fattori caratterizzanti la patologia. I corpi di Lewy devono il proprio nome a Friedrich Lewy che per primo li descrisse come strutture debolmente eosinofile all'interno dei neuroni di pazienti parkinsoniani (Lewy, 1912). I Corpi di Lewy sono inclusioni proteinacee neuronali, singole o multiple, di aspetto e diametro diverso (Shults, 2006); contengono α -sinucleina (Spillantini et al., 1997) e proteine correlate al sistema Ubiquitina-Proteasoma quali ubiquitina, parkina e ubiquitina-C-idrolasi-L1 (Uch-L1) (Liu et al., 2002; Meredith et al., 2004).

I corpi di Lewy sono stati osservati anche nei casi di malattia di Parkinson generata da specifiche mutazioni che interessano geni come quelli codificanti per l' α -sinucleina e la chinasi-2 con ripetizioni ricche di leucina (LRRK2). I corpi di Lewy sono inclusioni polimorfiche e sono costituiti da *core* denso, e da un alone esterno periferico. Nelle analisi dei tessuti di pazienti deceduti per MdP, i corpi di Lewy vengono evidenziati mediante immunisto chimica usando anticorpi contro l' α -sinucleina e l'ubiquitina. Di questi due marcatori, l' α -sinucleina rappresenta il marcatore specifico, perché la positività all' α -sinucleina è presente fin da primi stadi di formazione delle inclusioni citoplasmatiche (Gomez-Tortosa, 2000).

Questa tecnica ha sostituito la tradizionale colorazione con ematossilina-eosina perché può rivelare in modo più specifico i corpi di Lewy. Inoltre, i corpi di Lewy

che si trovano nella neocorteccia, non presentano di norma alcun alone risultando così poco visibili ad una eventuale colorazione con eosina. (Shults, 2006). La proteina quantitativamente più importante che va a costituire i corpi di Lewy è l' α -sinucleina che, come accennato in precedenza, rappresenta anche il marker specifico di questo tipo di inclusioni (Spillantini et al., 1997).

1.4. SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASOMA

Gli studi recenti confermano che la formazione di inclusi nelle malattie neurodegenerative, compresa la MdP, è correlata all'attività del sistema catalitico noto come sistema Ubiquitina-Proteasoma (Giorgi et al., 2006).

Il sistema Ubiquitina-Proteasoma costituisce, insieme all'autofagia, il principale meccanismo di degradazione proteica nelle cellule eucariotiche (Mariño and López-Otín, 2004; Hara et al., 2006;). Esso ha infatti la funzione di rimuovere molte delle proteine cellulari mal conformate o danneggiate che si trovano nel citosol, nel nucleo o nel reticolo endoplasmatico mentre la membrana e le proteine extracellulari, vengono degradate, dopo endocitosi, all'interno dei lisosomi.

Per evitare danni alla cellula infatti, le proteine non più funzionanti, vengono legate all'ubiquitina, che funge da segnalatore, e successivamente degradate dal proteasoma (Ross and Pickart, 2004; Betarbet et al., 2005).

Il legame tra l'ubiquitina e la sua proteina bersaglio, è il risultato di tre passaggi fondamentali: l'attivazione dell'ubiquitina attraverso una reazione ATP-dipendente catalizzata da un enzima attivatore dell'ubiquitina (E1), in questo primo passaggio si ha la formazione di un legame tioestere tra un gruppo sulfidrilico di un residuo di cisteina dell'enzima ed il gruppo carbossilico di una glicina presente all'estremità C-terminale dell'ubiquitina. L'ubiquitina attivata viene successivamente trasferita ad uno dei numerosi enzimi E2 (enzimi di coniugazione) per mezzo di un ulteriore legame tioestere. Il passaggio finale, vede il coinvolgimento dell'enzima E3 (proteina-ubiquitina ligasi) che catalizza la formazione di un legame covalente tra l'ubiquitina attivata ed il gruppo amminico

della catena laterale di una lisina sulla proteina bersaglio. Una volta avvenuto il legame tra la proteina bersaglio e l'ubiquitina, si ha la formazione di catene di poliubiquitina formata da numerose molecole di ubiquitina che si legano le une alle altre, in corrispondenza dei residui di lisina. Questa struttura, rappresenta il segnale che viene riconosciuto dal proteasoma e che permette così la degradazione della proteina bersaglio.

La molecola poliubiquitinata, viene poi processata dal proteasoma nel citoplasma, nella regione perinucleare e nel nucleo (Fig. 1.4.1).

L'ubiquitina, è una proteina di piccole dimensioni (8,5 kDa), filogeneticamente molto antica ed altamente conservata, che deve il suo nome al fatto che essa si trova in tutti gli organismi eucariotici. Il proteasoma, è presente nel citoplasma, nella regione perinucleare e nel nucleo di tutte le cellule eucariotiche. La sua abbondanza all'interno di questi distretti è molto variabile. Nel citoplasma, il proteasoma è associato con i centrosomi, il citoscheletro e la superficie esterna del reticolo endoplasmatico. Nel nucleo, il proteasoma è presente nel nucleoplasma ma non nei nucleoli. Il sistema Ubiquitina-Proteasoma è costituito da diverse proteasi che costituiscono nel loro insieme, il complesso proteolitico 26S, a sua volta costituito da una parte catalitica che prende il nome di proteasoma 20S (Adams et al., 2000), formato da 28 subunità organizzate in 4 anelli eptamerici, due esterni e due interni impilati a formare una struttura cilindrica cava dove si svolgono i processi proteolitici. I due anelli più interni del proteasoma 20S sono formati ognuno da sette differenti subunità β .

I tre differenti siti catalitici (simil-chimotripsina, simil-tripsina ed il sito idrolitico peptidil glutamil proteasi) del proteasoma, risiedono sulla superficie interna degli

anelli interni, in modo da prevenire una degradazione proteica indiscriminata. Gli anelli esterni non catalitici formati da 7 differenti subunità α , fungono da ancoraggio per l'attivatore del proteasoma 19S (Wolf and Hilt, 2004). Il complesso 19S ha funzioni regolatorie e determina la specificità del substrato. Esso è formato da almeno 6 ATP-asi e più di 15 subunità addizionali che mancano della capacità di legarsi all'ATP (Fig. 1.4.2).

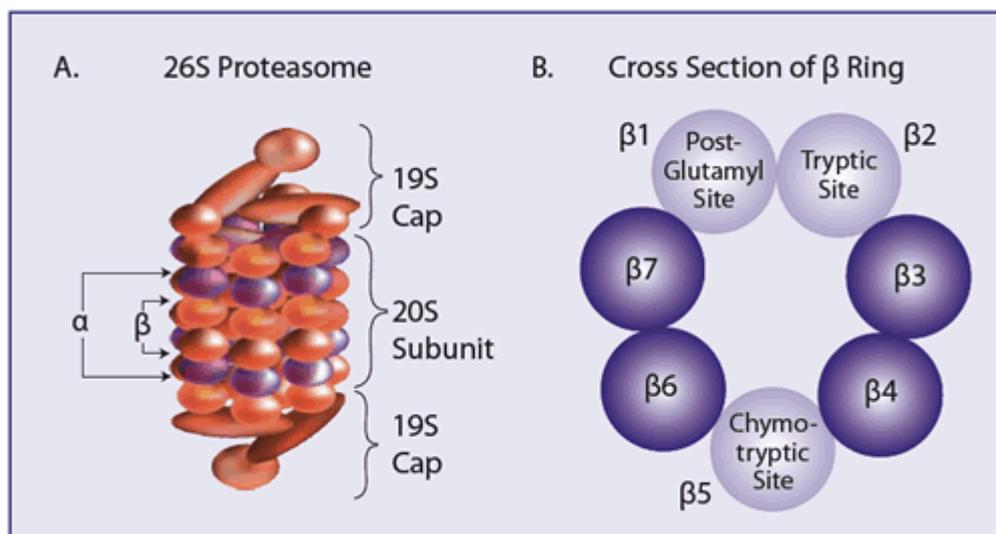


Fig. 1.4.2. (A). Struttura del complesso 26S del Proteasoma. (B). Sezione trasversale del core catalitico 20S.

Il complesso regolatorio 19S, svolge almeno tre funzioni ATP-dipendenti: 1) apertura selettiva del canale attraverso il proteasoma 20S; 2) linearizzazione delle proteine ubiquitinate per consentirne l'ingresso nel sito catalitico; 3) eliminazione della catena poliubiquitinata dal substrato.

Un altro attivatore del proteasoma (11S), è associato mediante le subunità α del proteasoma 20S ad una o ad entrambe le estremità ed anch'esso svolge la funzione di aprire il canale nel proteasoma 20S ma attraverso un processo non

dipendente dall'ATP. I prodotti della degradazione operata dal proteasoma, sono corti peptidi che hanno una lunghezza variabile da 3 a 22 aminoacidi e che possono essere riciclati per produrre nuove proteine (Myung et al., 2001).

Allo stesso tempo, le catene di poliubiquitina rilasciate dalle proteine-bersaglio, vengono disassemblate da parte dell'ubiquitina idrolasi carbossi-terminale (UCH-L1) per produrre molecole monomeriche di ubiquitina che possono essere utilizzate nuovamente (Betarbet et al., 2005).

In particolari condizioni, come ad esempio in caso di eccessiva quantità di proteine da degradare, il sistema UP può subire una inibizione da substrato e quindi non digerire le proteine alterate con conseguente loro accumulo.

In tempi recenti, il sistema Ubiquitina-Proteasoma ha ricevuto una notevole attenzione da parte dei ricercatori, soprattutto, quando è stato scoperto che una forma comune di parkinsonismo autosomico recessivo, è legato alla mutazione del gene parkina che codifica per una ligasi di tipo E3 (Kitada et al., 1998; Shimura et al., 2000).

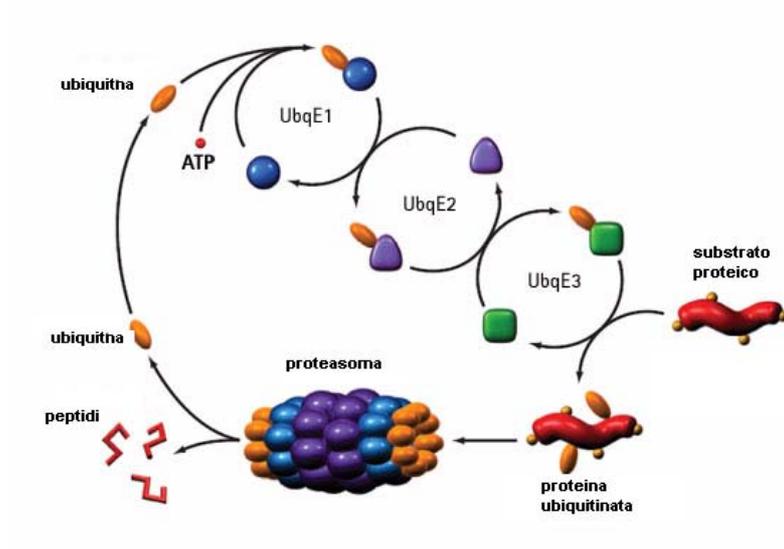


Fig 1.4.1: Schema che rappresenta il funzionamento del sistema Ubiquitina-Proteasoma.

1.5. METANFETAMINA

La metanfetamina (METH) è una sostanza d'abuso che appartiene alla categoria degli psicostimolanti. Il termine "psicostimolante" si riferisce a droghe che producono nell'uomo uno spettro di effetti che comprendono un elevato tono dell'umore, riduzione del sonno e della percezione della fatica (Rothman and Baumann, 2003). Il fatto che questa droga provochi una notevole dipendenza ed abbia effetti neurotossici, sta diventando sempre più importante in considerazione di un crescente aumento del suo consumo sia negli Stati Uniti che in Europa (Lukas, 1997). La relativa facilità di sintesi, che consiste nella riduzione del precursore chimico efedrina, unita alla facile reperibilità sul mercato della suddetta materia prima, ha favorito la nascita di molti laboratori clandestini che ogni anno immettono nei circuiti dello spaccio quantità considerevoli di questo derivato anfetaminico (Barr et al., 2006).

La METH, fa parte di una famiglia di composti che presenta una struttura chimica comune, caratterizzata dalla presenza di un anello β -feniletilaminico (Fig. 1.5.1). Questa molecola agisce sul Sistema Nervoso Centrale (SNC) rilasciando neurotrasmettitori monoaminergici quali la dopamina, la noradrenalina e la serotonina (Kuczenski et al., 1995; Sulzer et al., 2005). A differenza della cocaina, che aumenta il rilascio di DA inibendo il processo di reuptake (Izenwasser, 2004), la METH provoca un maggiore rilascio di neurotrasmettitore attraverso molteplici meccanismi. Infatti, oltre ad interrompere il reuptake attraverso l'inibizione del trasportatore dopaminergico DAT come fa la cocaina, la METH mobilita la DA contenuta nelle vescicole, che in questo modo, si riversa nel citosol (Brown et al.,

2001). Inoltre, il DAT deputato alla ricaptazione del neurotrasmettitore, inverte la direzione del trasporto provocando il release di DA dal terminale dopaminergico, nel vallo sinaptico (Fig. 1.5.2) (Fleckenstein et al., 1997; Khoshbouei et al., 2003). La METH agisce anche sulle monoaminoossidasi, gli enzimi deputati alla degradazione delle monoamine, inibendone l'azione ed aumentando perciò la concentrazione dopaminergica nel citosol (Mantle et al., 1976), oltre ad incrementare l'attività della tirosina idrossilasi (TH), l'enzima che catalizza la formazione della DA (Mandell and Morgan, 1970). La sinergia tra questi diversi meccanismi d'azione, fanno della METH un potente psicostimolante che si caratterizza inoltre per avere un tempo di emivita superiore a quello di molte altre sostanze d'abuso, come ad esempio la cocaina (8-13 ore per la METH contro le 1-3 ore per la cocaina). Per questo motivo, la durata degli effetti psicologici e comportamentali di questa molecola, sono sensibilmente superiori a quelli di molte altre sostanze psicostimolanti.

Gli effetti in acuto della METH consistono in uno stato di euforia ed un senso di benessere (Hart et al., 2001) oltre ad un incremento della libido ed una diminuzione dell'appetito. Gli effetti somatici indesiderati di questa molecola consistono in un aumento della pressione sanguigna, ipertermia, maggiore probabilità dell'insorgenza di ictus e tremore muscolare. Gli effetti avversi della METH dal punto di vista psicologico sono rappresentati da ansia, insonnia aggressività, paranoia e allucinazioni (Nordahl et al., 2003).

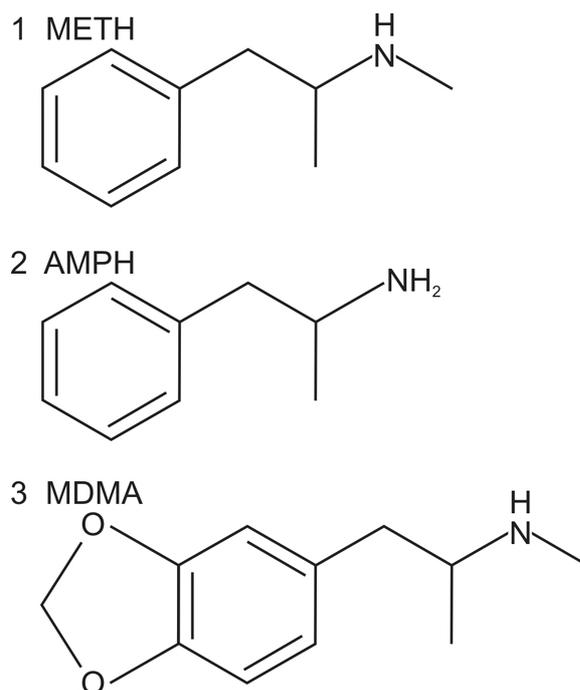


Fig. 1.5.1 Struttura chimica della METH (1) a confronto con quelle di anfetamina (2) e MDMA, "Ecstasy" (3).

Da tempo si conoscono gli effetti tossici della METH. Questi effetti sono legati principalmente alla formazione di radicali liberi dovuti a processi di auto-ossidazione della DA ed al conseguente aumento dello stress ossidativo.

La DA infatti, svolge un ruolo fondamentale nella tossicità neuronale indotta dalla METH. Il primo meccanismo postulato di neurotossicità DA-mediata prevedeva che gli elevati livelli di DA extracellulari, prodotti dal trattamento anfetaminico, innescassero processi di auto-ossidazione della DA, con conseguente produzione di specie molecolari altamente reattive e stress ossidativo (Seiden and 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 dalla METH (Cubells et al. 1994). In particolare, una volta entrate nel terminale dopaminergico sfruttando il trasportatore di membrana, le molecole di METH, 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 dal derivato anfetaminico, può subire auto-ossidazione e portare ad una notevole produzione di H₂O₂, anione superossido, ione idrossido e chinoni tossici (Imam et al., 2001).

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 (Riddle et al., 2006) 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 la METH provoca 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 da METH.

Recentemente è stato ipotizzato che si possano formare prodotti altamente tossici tra DA-chinoni e α -sinucleina e che questo possa essere un evento biochimico critico proprio nella MdP (Conway et al., 2001; Sulzer, 2001).

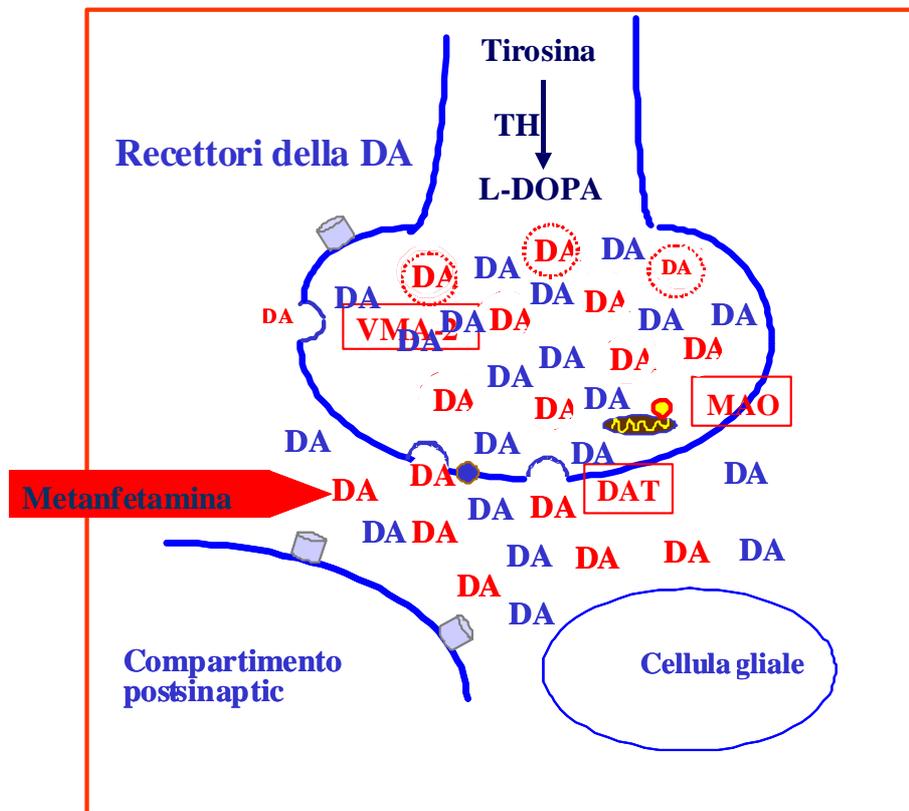
I neuroni dopaminergici sono particolarmente vulnerabili proprio perché contengono alti livelli di DA citosolica e dopo uno stimolo rilasciante, come nel caso della somministrazione di METH, risultano un sistema in cui l'equilibrio metabolico può facilmente essere alterato.

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' α -sinucleina che devono quindi essere degradate dal sistema Ubiquitina-Proteasoma.

Ne consegue che l'eccesso di proteine alterate che si accumulano in grande quantità all'interno della cellula, può inibire l'azione del sistema Ubiquitina-Proteasoma che non è quindi più in grado di operare la degradazione proteica (Fig. 1.5.3) (Iacovelli et al., 2006).

Per quanto detto in precedenza, la METH può essere utilizzata come modello sperimentale per lo studio della MdP, in quanto, negli animali da esperimento, è in grado di determinare lesioni a livello dei terminali dopaminergici nigrostriatali, riproducendo così molte caratteristiche cliniche osservate nei pazienti affetti da parkinsonismo.

Fig. 1.5.2 Effetti della METH in acuto sui terminali dopaminergici



Da più di 20 anni infatti, è noto che nei roditori la METH ha effetti neurotossici sia su neuroni dopaminergici sia su quelli serotonergici, mentre non induce alcuna diminuzione dei livelli di noradrenalina (NA) in nessuna area cerebrale (Wagner et al., 1979; 1980), né sono mai stati evidenziati effetti sui sistemi colinergico e GABAergico.

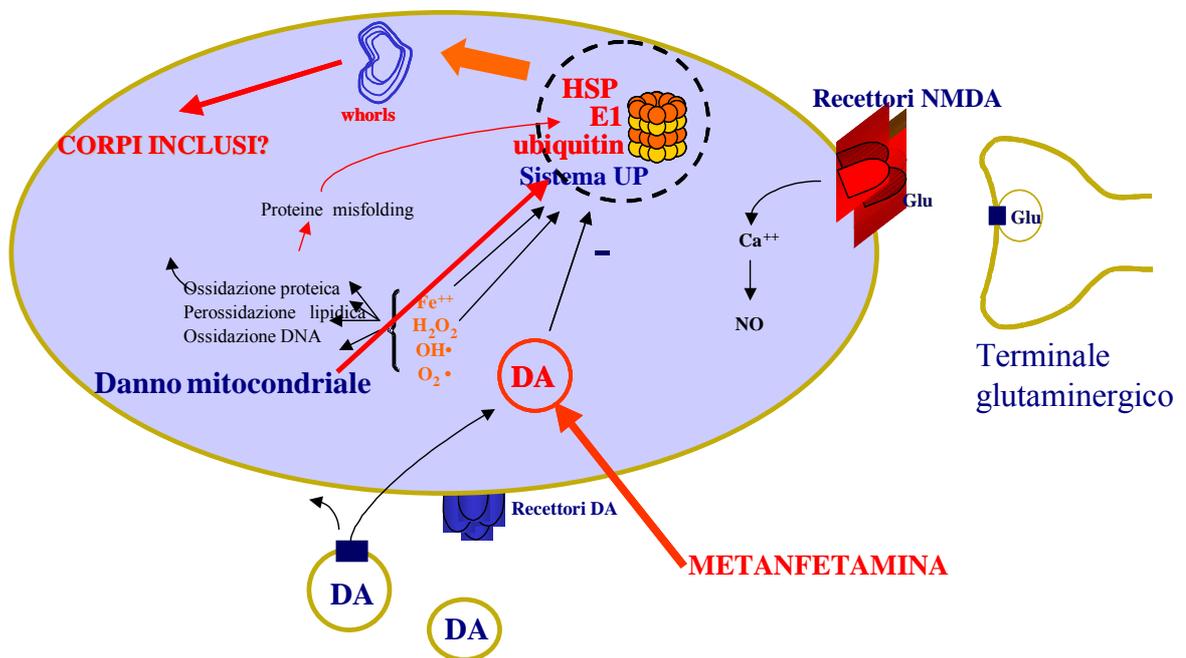


Fig. 1.5.3 Il sistema ubiquitina-proteasoma come via finale comune per la tossicità anfetaminica e le malattie neurodegenerative.

2. SCOPO DELLO STUDIO

La METH è impiegata ormai da molti anni nel campo della ricerca medica in quanto è in grado di produrre MdP sperimentale nel topo. Questo derivato anfetaminico infatti, ha la capacità di ledere i terminali dopamonerfici striatali lasciando però vitali i corpi cellulari. Precedenti ricerche condotte dal nostro gruppo, hanno avuto come oggetto l'indagine sugli effetti della METH *in vitro*, utilizzando cellule PC12. Nelle colture trattate con il derivato anfetaminico, è stata osservata la presenza di inclusioni contenenti α -sinucleina (Fornai et al., 2004).

Pertanto, alla luce di questi risultati, in questo studio abbiamo voluto indagare gli effetti della METH *in vivo* ed in particolare la sua capacità di indurre un incremento di espressione di α -sinucleina nella substantia nigra, se questo effetto è specifico per la pars compacta (SNpc) ed inoltre se la METH è in grado di indurre inclusioni nei neuroni di quest'area cerebrale.

3. MATERIALI E METODI

I topi “C57 Black” utilizzati per il nostro studio, di età compresa tra le 10 e le 12 settimane, sono stati ottenuti dalla “Charles River Italy” (Calco, CO). Gli animali (n=40) sono stati mantenuti, con cicli di luce/buio della durata di 12 ore con cicli di luce dalle 7:00 alle 19:00 a una temperatura costante di 21°C, ricevendo cibo e acqua ad libitum. In tutti gli esperimenti l’utilizzo degli animali è stato conforme alle direttive dell’Unione Europea che regolamentano la sperimentazione animale. Il trattamento farmacologico ha previsto la somministrazione di metanfetamina cloridrato a un gruppo di 20 topi alla dose di 5 mg/kg per tre volte a intervalli di due ore. Il secondo gruppo di 20 topi, è stato usato come controllo ed è stato quindi trattato con soluzione salina. Sia i topi trattati che quelli di controllo, sono stati sacrificati dopo sette giorni dal trattamento. Nove topi per gruppo sono stati usati per indagini morfologiche (cinque per la microscopia ottica e quattro per quella elettronica) mentre i rimanenti undici topi per gruppo, sono stati impiegati sia per il Western Blot che per il dosaggio delle monoamine mediante HPLC.

3.1. MICROSCOPIA OTTICA

Sezioni seriate di striato e di substantia nigra (distanza dal bregma a +1,20 mm, -3,40 mm rispettivamente secondo l’atlante di Franklin e Paxinos 1997), di 20 µm di spessore sono state ottenute mediante taglio al criostato. Per l’immunoistochimica, che ci ha permesso di valutare i livelli di Tirosina Idrossilasi (TH), sono state tagliate cinque sezioni non consecutive distanti 50 µm

l'una dall'altra. Da ogni topo, sono state ottenute dieci sezioni non consecutive con un intervallo tra le sezioni di 20 μm , di cui cinque sono state impiegate per la doppia marcatura per TH e acido glutammico decarbossilasi (GAD-67) e le rimanenti cinque per la doppia marcatura TH e α -sinucleina.

Per l'immunoistochimica, abbiamo usato anticorpi monoclonali primari per la TH (1:1000) e anti α -sinucleina (1:500). Per la GAD-67 (1:1000) è stato usato l'anticorpo policlonale. Le sezioni tagliate al criostato sono state incubate con gli anticorpi overnight alla temperatura di 4°C. Il giorno dopo le sezioni sono state incubate per un'ora con anticorpi secondari coniugati alla fluoresceina nel caso della TH e con Cy3 nel caso di α -sinucleina e GAD-67. Per la immunoperossidasi, l'incubazione ha avuto la durata di 1 ora con un anticorpo secondario biotinilato (1:200). I neuroni della substantia nigra marcati per TH e α -sinucleina sono stati contati in cinque sezioni non consecutive di 20 μm da ognuno dei cinque topi per gruppo. Per effettuare una accurata conta cellulare, i preparati immunofluorescenti sono stati osservati con un ingrandimento di 40 volte, grazie al quale, è stato possibile distinguere nitidamente i contorni cellulari.

3.2. MICROSCOPIA ELETTRONICA

I topi, sono stati anestetizzati con cloralioidrato (4 ml/kg, i.p.), sono stati toracotomizzati e perfusi inizialmente con soluzione salina e successivamente fissativo contenente lo 0,1% di glutaraldeide e il 2% di paraformaldeide in tampone fosfato. Queste due aldeidi permettono la fissazione della componente proteica.

Gli encefali, una volta prelevati, sono stati conservati overnight a 4°C nella soluzione fissativa. Abbiamo quindi considerato la substantia nigra pars compacta, prelevandone alcuni campioni e sottoponendoli a post-fissazione mediante soluzione tamponata di OsO₄ 1% (Electron Microscope Sciences, Hatfield, PA, USA) per 2 ore a 4°C. Il tetrossido di osmio è in grado di fissare la componente lipidica, quindi soprattutto le membrane cellulari. È un fissativo largamente utilizzato in microscopia elettronica poiché si adatta bene all'esigenza di preservare i dettagli ultrastrutturali, limitando eventuali modificazioni introdotte durante le successive fasi di disidratazione e inclusione.

Successivamente sono state effettuate una serie di disidratazioni con alcool etilico a concentrazioni crescenti, in seguito i campioni sono stati mantenuti per 15 minuti in ossido di propilene, e overnight in una miscela di ossido di propilene e resina epossidica in proporzione 1:1. Infine i campioni sono stati inclusi in Epon-Araldite. La polimerizzazione della resina è stata effettuata trasferendo i campioni in stufa (60°C) per 3 giorni.

Successivamente i campioni cellulari sono stati piramidati e con l'ausilio di un ultramicrotomo a lame di diamante, sono state ottenute sezioni ultrafini (circa 40 nm di spessore), che sono state raccolte su retini di nichel. Le sezioni sono state poi contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo ed infine esaminate al microscopio elettronico a trasmissione Jeol Jem 100SX (Jeol, Tokyo, Giappone).

La presenza delle inclusioni neuronali è stata analizzata su 50 sezioni consecutive di ogni topo (in totale 4 topi per gruppo). Inoltre, 5 sezioni non seriali sono state raccolte in 10 differenti retini. Tre retini ottenuti dai campioni prelevati da ciascun topo sono stati destinati all'immunocitochimica post-embedding. Dopo

deosmicazione con sodio metaperiodato, i retini sono stati incubati con normal goat serum al 10% e successivamente, con l' anticorpo primario per α -sinucleina diluito 1:10 per 24 ore alla temperatura di 4°C. Il giorno successivo i retini sono stati incubati per 1 ora con l' anticorpo secondario legato ad oro colloidale (1:200).

3.3. WESTERN BLOTTING

I campioni di Substantia Nigra destinati al Western Blotting, sono stati omogenati in tampone contenente Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), PMSF (1mM), 0,5% NP-40, 0,25% SDS e 10 μ g/ml di inibitore delle proteinasi (leupeptina, pepstatina, aprotinina). L'omogenato è stato centrifugato a 5000g per 5 minuti ed il surnatante è stato successivamente centrifugato a 30000g per 30 minuti (Rothman et al., 2003).

Per misurare la quantità totale di proteine è stato utilizzato un kit (Sigma) che si basa sul metodo di Lowry ((Lowry et al. 1951)

Un volume dello stesso campione corrispondente a 25 μ g di proteine è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE, 10% acrylamide) che permette la separazione delle proteine in base al peso molecolare. I campioni da separare vengono innanzitutto bolliti per 3 minuti in un tampone (*sample buffer*) contenete sodio dodecilsolfato (SDS) e β -mercaptoetanololo. Il β -mercaptoetanololo riduce i ponti disolfuro eventualmente presenti nelle proteine, destabilizzando la loro struttura terziaria, mentre l'SDS, un detergente anionico, si lega fortemente alle proteine provocando la loro denaturazione. A ciascuna

proteina si legano diverse molecole di SDS, che mascherano le eventuali cariche presenti e le conferiscono una carica netta negativa. una volta caricati i campioni sul gel, viene fatta passare corrente e le proteine migrano tutte verso il polo positivo, separandosi in base alle dimensioni.

Le proteine separate sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Millipore) la quale è stata immersa in una *blocking solution* (5 % di latte e Tween-20 allo 0,05% in PBS) a 4°C per 3 ore su di un agitatore orbitale.

Successivamente la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario anti α -sinucleina (1:1000) overnight a 4°C.

La membrana è stata poi lavata e incubata con anticorpo secondario legato alla perossidasi (1:1000) per 1 ora a 4°C.

Le bande immunoreattive corrispondenti alla proteina indagata, erano visualizzate esponendo successivamente tale membrana a H_2O_2 e luminolo, un substrato chemiluminescente. In presenza di H_2O_2 , la perossidasi ossida il luminolo con produzione di chemiluminescenza che viene rilevata esponendo la membrana ad una lastra fotografica.

3.4. SAGGIO DELLE MONOAMINE IN HPLC

La tossicità provocata dalle anfetamine può variare a seconda di diversi fattori ambientali (Bowyer et al., 1992; Miller and O'Callaghan, 1994; Albers and Sonsalla, 1995). Per misurare la denervazione dopaminergica striatale, abbiamo quindi usato un metodo quantitativo, basato sull'uso dell'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) che qualitativo per mezzo dell'indagine immunostochimica per la TH. L'HPLC ci ha permesso di misurare i livelli di DA e dei suoi metaboliti dopo trattamento con la METH. I campioni di striato sono stati prelevati dopo dissezione eseguita su una petri di vetro immersa nel ghiaccio. La parte anteriore dello striato dorsale è stata raggiunta aprendo il ventricolo laterale in corrispondenza della faccia mediale dell'emisfero cerebrale ed operando la dissezione. Il campione di striato è stato omogenato mediante sonicazione in una provetta contenente 0,6 ml di acido perclorico (PCA) 0,1 N. Successivamente, dell'omogenato ottenuto sono stati prelevati 50 μ l per la misurazione del contenuto proteico secondo il metodo di Lowry ed il resto è stato centrifugato per 5 minuti a 5000g. Il sovrantante ottenuto dopo la centrifugazione è stato iniettato, nella quantità di 20 μ l, in un sistema HPLC per separare (mediante fase inversa) e misurare (mediante riduzione) le monoamine. Come accennato, il saggio del contenuto proteico nei campioni è stata effettuata con il metodo di Lowry e per la misura dell'assorbanza, ci siamo avvalsi di uno spettrofotometro Beckman-Coulter. La retta di taratura che è servita per calcolare la concentrazione proteica, è stata costruita misurando l'assorbanza di soluzioni di

albumina a sette diverse concentrazioni: 3,6,9,12,18,24,36 μ l di standard portate al volume di 50 μ l con NaOH 1N.

Il sistema HPLC utilizzato, dispone di un rilevatore coulometrico ESA (Coulochem III con cella analitica 5011A) il quale è composto da due elettrodi, il primo operante a +300mV ed il secondo a -300mV. Il segnale è stato registrato ad entrambi gli elettrodi. Prima di effettuare le misurazioni dei campioni, sono state iniettate nel sistema HPLC, soluzioni standard al fine di ottenere due curve di regressione (una per l'elettrodo operante in ossidazione e l'altra per l'elettrodo operante in riduzione). L'elaborazione del segnale e l'integrazione dei picchi cromatografici, sono stati ottenuti mediante personal computer collegato al sistema HPLC.

3.5. ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti dalle analisi morfologiche e biochimiche sono stati analizzati mediante il test ANOVA seguito dall'analisi di Sheffè. L'ipotesi nulla (H_0) è stata rifiutata per $P < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 DENERVAZIONE STRIATALE

I dati ottenuti, mostrano che la METH provoca una massiva denervazione dopaminergica striatale. Infatti, questo derivato anfetaminico ha ridotto in maniera significativa la quantità di DA (Fig. 4.1.1) e dei suoi principali metaboliti: l'acido diidrossifenilacetico (DOPAC) (Fig. 4.1.2) e l'acido omovanillico (HVA) (Fig. 4.1.3).

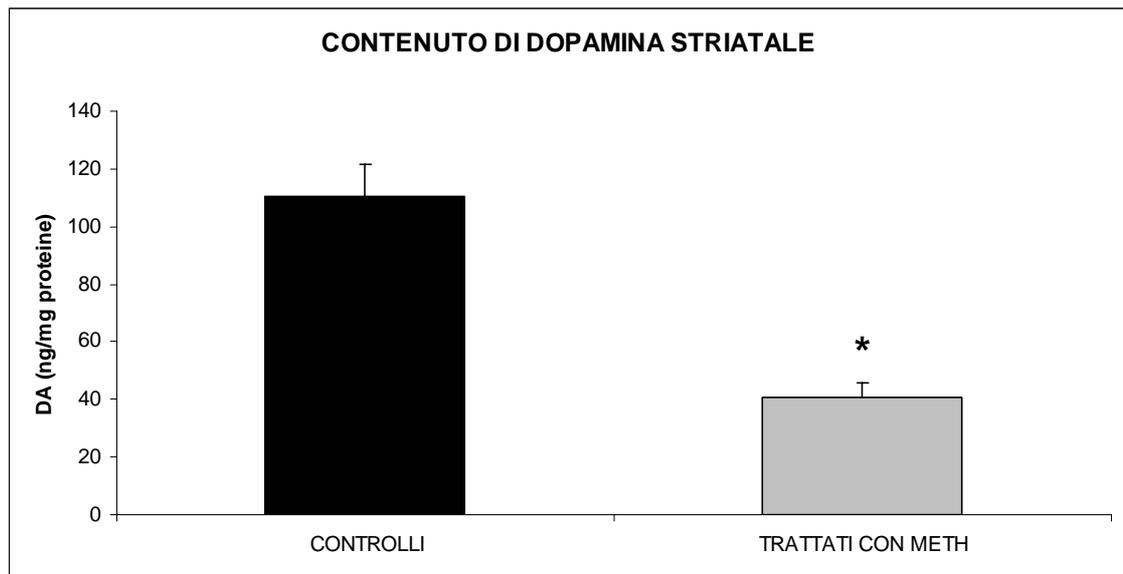


Fig. 4.1.1. Livelli di DA nello striato dei topi di controllo rispetto ai trattati ($P^* < 0,05$)

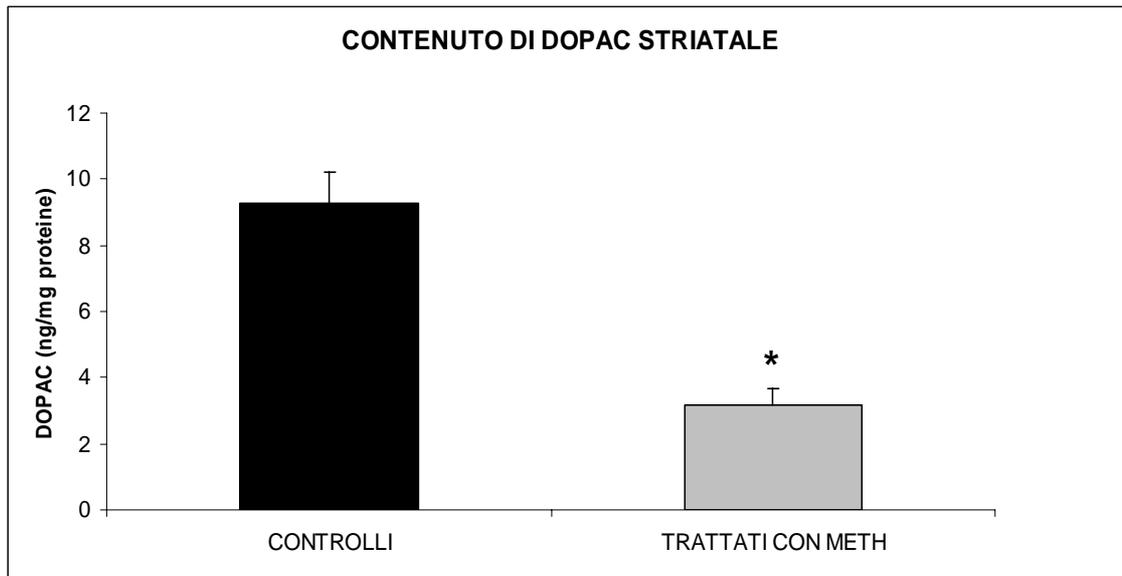


Fig. 4.1.2.: Livelli di DOPAC nello striato dei topi di controllo rispetto ai trattati ($P^* < 0,05$)

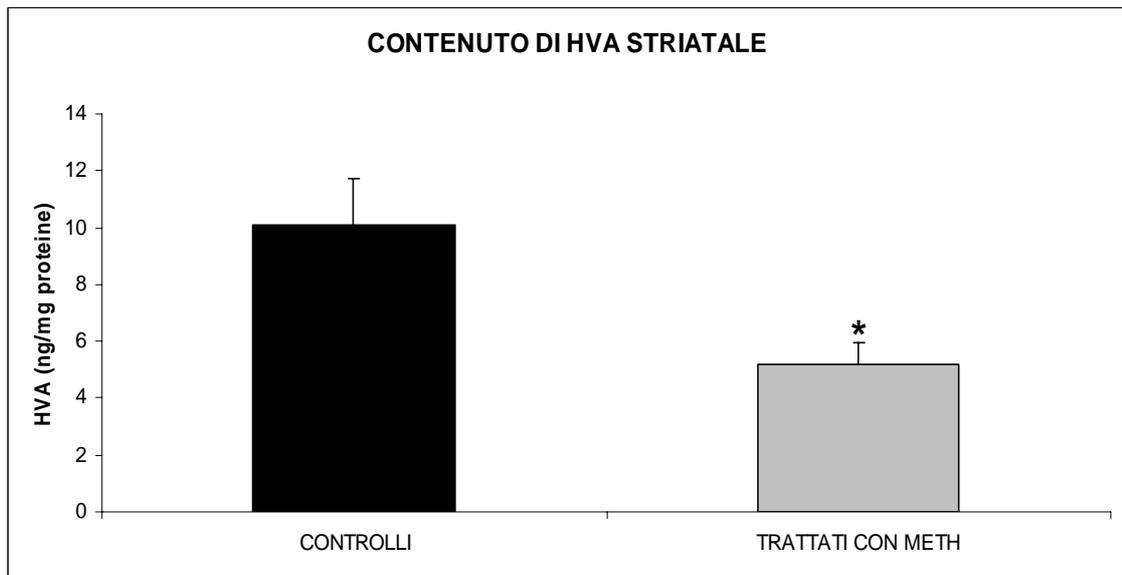


Fig. 4.1.3.: Livelli di HVA nello striato dei topi di controllo rispetto ai trattati ($P^* < 0,05$)

I dati ottenuti con l'analisi biochimica sono stati confermati dall'indagine morfologica che, come si può notare in Figura 4.1.5, mostra una forte

denervazione nello striato degli animali trattati con METH rispetto allo striato di controllo (Fig. 4.1.4).



Fig. 4.1.4.: Striato di un topo di controllo (immunoistochimica per TH).



Fig. 4.1.5.: Striato di un topo trattato con metanfetamina (immunoistochimica per TH).

L'immunocitochimica per la GAD-67 non ha evidenziato nessuna perdita di neuroni striatali dopo trattamento con METH (non mostrato).

Nonostante la significativa riduzione dei terminali dopaminergici striatali in seguito alla somministrazione della METH, non è stata rilevata alcuna perdita neuronale a livello della SNpc (Fig. 4.1.6).

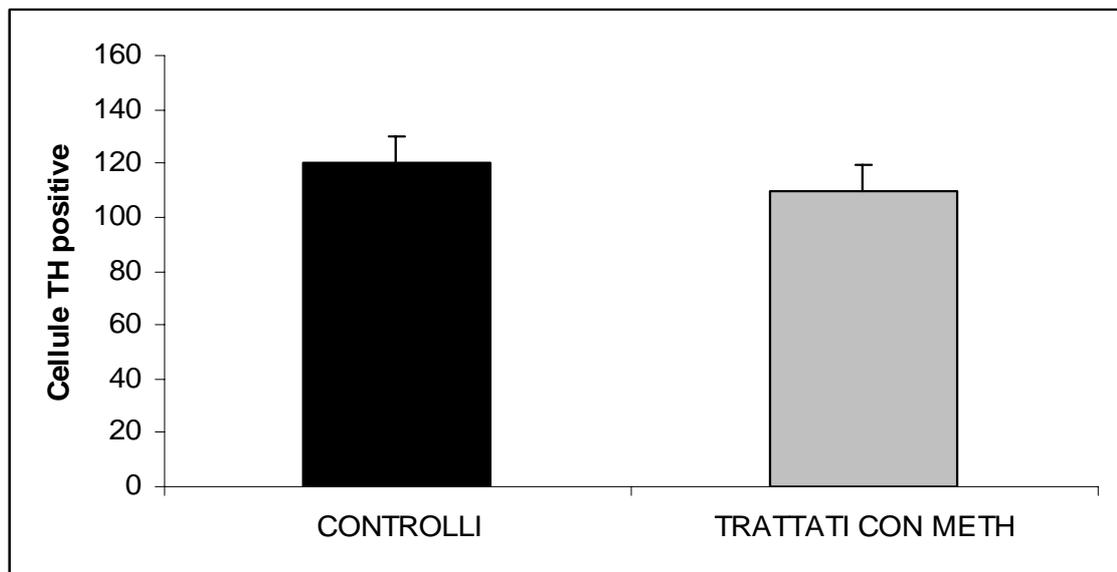


Fig. 4.1.6. Grafico che riassume i dati relativi alla conta delle cellule TH-positiva nella Substantia Nigra.

4.2. INCREMENTO SELETTIVO DELL' α -SINUCLINA NELLA SUBSTANTIA NIGRA PARS-COMPACTA (SNpc).

L'immunocitochimica per TH (neuroni dopaminergici) e per GAD-67 (neuroni GABA-ergici) mostra come queste due popolazioni neuronali siano separate tra loro e confinate nella Substantia Nigra pars-compacta e pars-reticulata rispettivamente. Ciò è evidenziato dalla mancanza di sovrapposizione tra le due immagini precedenti (Figg. 4.2.1A).

L'immunomarcatura per l' α -sinucleina ha evidenziato una bassa positività nella SNpc nei controlli, mentre nei topi trattati con METH l'immunomarcatura risulta molto più rappresentata.

Inoltre, mentre nei controlli la co-localizzazione tra TH ed α -sinucleina risultava modesta, nei topi trattati con METH, la positività per l' α -sinucleina risultava aumentata solo nei neuroni positivi alla TH. La sovrapposizione delle immagini di immunocitochimica per α -sinucleina e TH evidenziano come questa proteina si accumuli in densi spots all'interno dei neuroni dopaminergici (Fig. 4.2.1B). A tal proposito, mediante conta cellulare, è stato possibile determinare che nei topi trattati con METH, si è avuta una co-localizzazione superiore al 70%, mentre nei controlli, tale co-localizzazione ha raggiunto appena il 5% del totale di cellule TH-positive (Fig. 4.2.2).

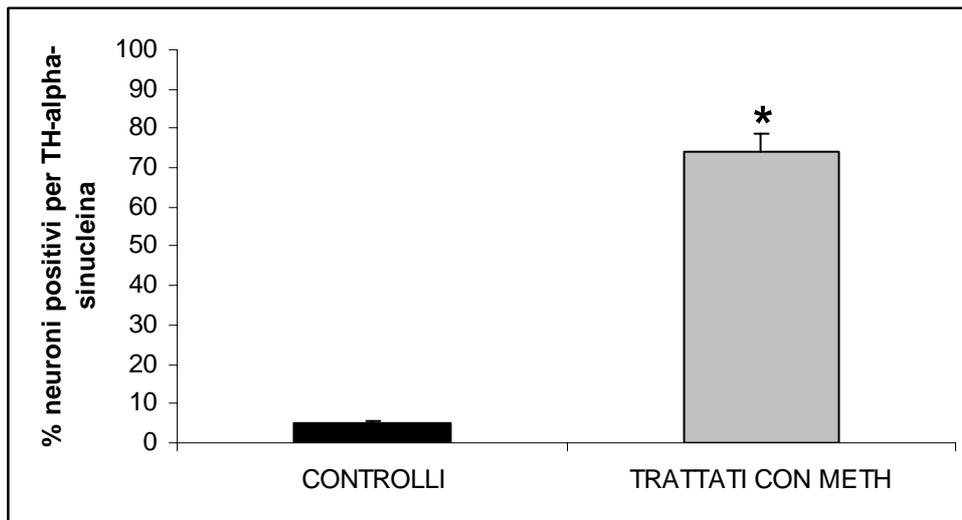


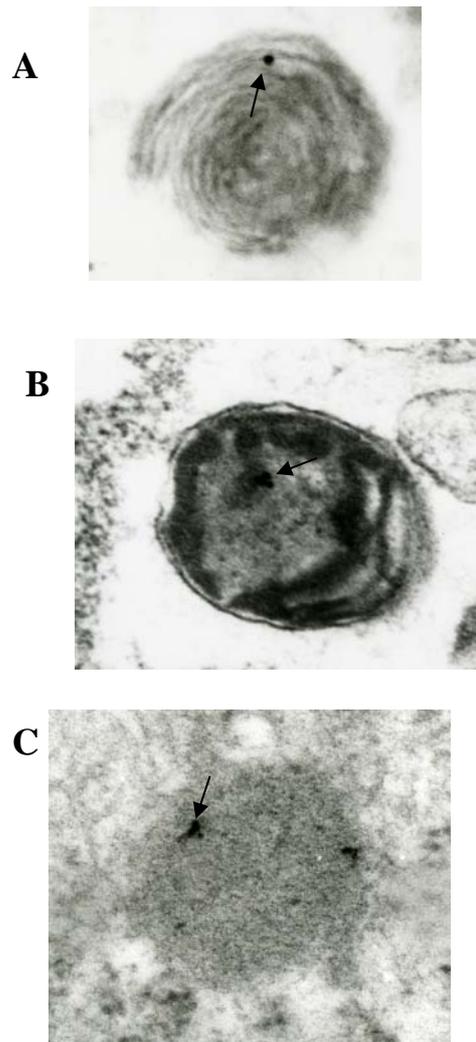
Fig. 4.2.2.: Confronto tra la percentuale di cellule che presentano doppia marcatura per TH e α -sinucleina nei controlli e nei trattati con METH ($P^* < 0,05$).

Ciò indica che gli effetti della METH sono selettivi e riguardano i neuroni dopaminergici della substantia nigra pars-compacta.

Inoltre, anche le indagini condotte mediante western blotting hanno confermato l'incremento di α -sinucleina nigrale nei topi trattati con METH rispetto ai controlli (Fig. 4.2.5).

La presenza di inclusioni α -sinucleina positive all'interno dei neuroni dopaminergici è stata confermata anche attraverso l'impiego della microscopia elettronica che ha permesso di poterne studiare l'ultrastruttura.

In tal modo infatti, abbiamo potuto distinguere uno stadio iniziale nel quale gli inclusi presentano una struttura multilamellare, vari stadi intermedi caratterizzati comunque dalla presenza di un core elettrondenso ancora avvolto da membrane ed infine, uno stadio maturo nel quale le membrane non sono più evidenti (Fig. 4.2.4).



Figg. 4.2.4. Corpi inclusi all'interno delle cellule dopaminergiche delle SNpc positivi per α -sinucleina (freccie) e a differenti stadi di maturazione. A) Corpo multilammellare; B) incluso con un core elettrondenso avvolto da membrane; C) stadio maturo in cui le membrane non sono più visibili.

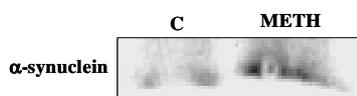
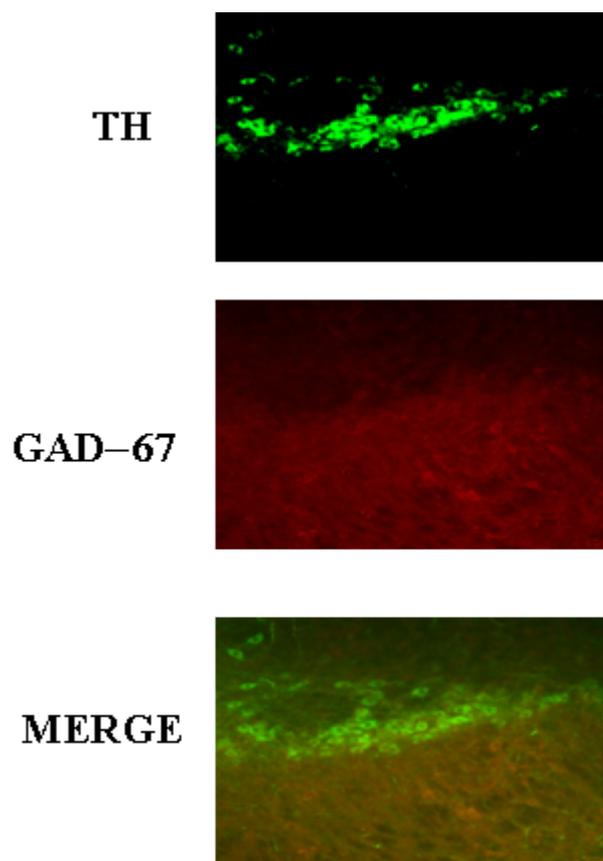


Fig.4.2.5. Immagine di Western Blotting che evidenzia l'incremento di espressione dell' α -sinucleina nei topi trattati con METH rispetto ai controlli.



Figg. 4.2.1A: Doppia immunomarcatura per TH e GAD-67 che evidenzia la netta separazione tra neuroni dopaminergici e GABA-ergici nella Substantia nigra pars compacta e reticulata rispettivamente.

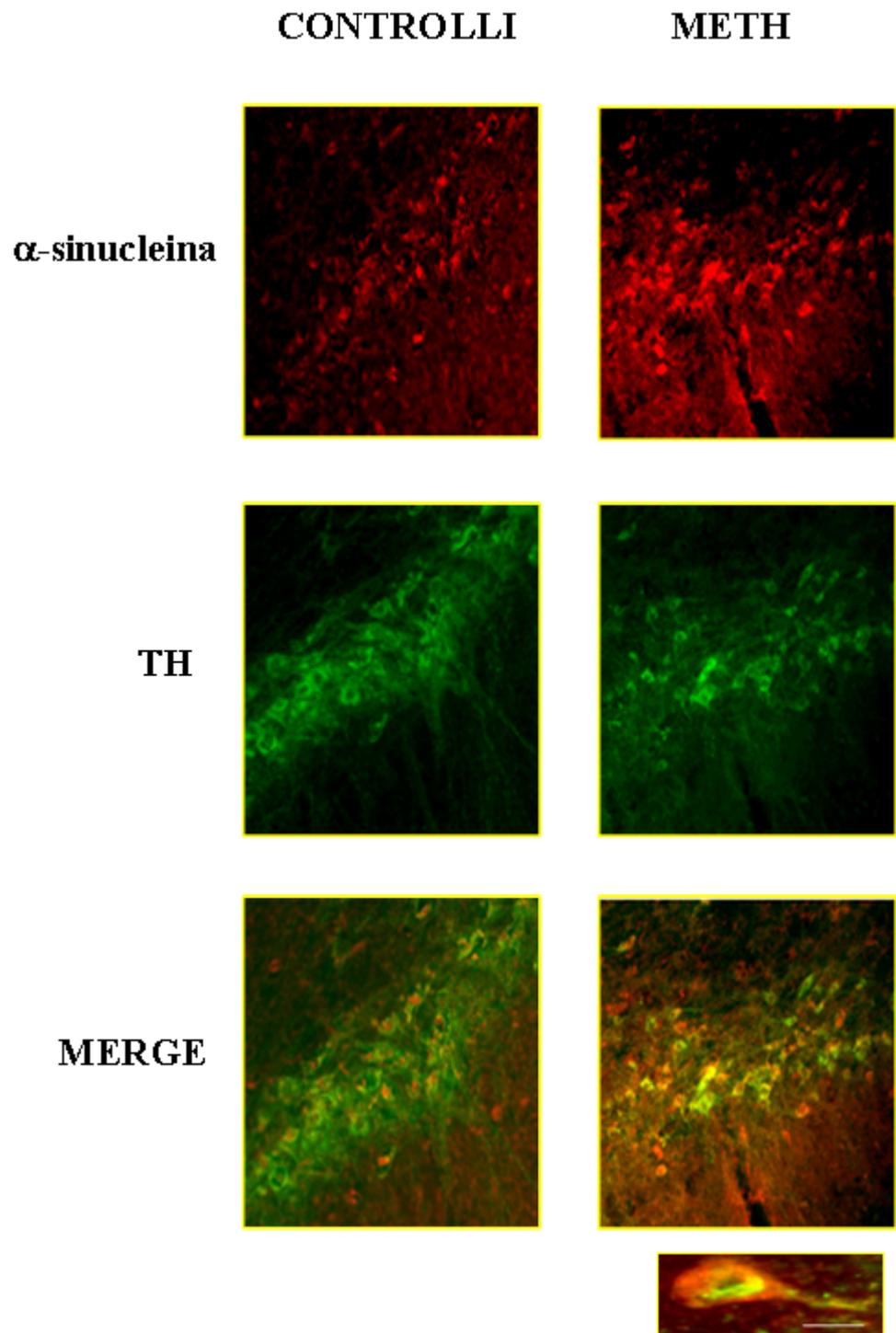


Fig 4.2.1B: Immagini di immunofluorescenza che evidenziano come l'aumento dell'espressione di α -sinucleina provocato dalla METH interessi esclusivamente i neuroni dopaminergici.

5. DISCUSSIONE

Come abbiamo visto in precedenza, la somministrazione di METH, provoca un effetto duplice, rappresentato da un significativo incremento di α -sinucleina che coinvolge in maniera molto selettiva i neuroni dopaminergici della SNpc e da una massiva denervazione dei terminali dopaminergici a livello striatale. Il meccanismo molecolare attraverso il quale questo derivato anfetaminico provoca un innalzamento nei livelli di α -sinucleina nella SNpc, rimane tutt'ora oggetto di indagine. Tuttavia, è possibile ipotizzare che l' α -sinucleina intervenga nella regolazione del trasportatore di DA (DAT) inducendo in questo modo, una riduzione dei livelli intracellulari della DA stessa (Sidhu et al., 2004). L'incremento della DA intracellulare e di conseguenza, l'alterato metabolismo dopaminergico indotto dalla METH (Sulzer et al., 1993), potrebbe provocare cambiamenti di tipo compensatorio che spiegherebbero l'incremento di espressione dell' α -sinucleina stessa. Indipendentemente dalle ipotesi che possono essere avanzate riguardo al meccanismo d'azione, è certo che l'incremento di espressione di α -sinucleina provocato dalla METH va di pari passo con la tossicità e con i processi neurodegenerativi indotti da questa sostanza d'abuso.

Nonostante siano presenti in letteratura molti lavori che vedono nella maggiore espressione di α -sinucleina una delle principali cause della neurodegenerazione, recenti studi hanno evidenziato come questa proteina abbia in realtà un ruolo protettivo per la cellula (Machida et al., 2005; Mauceli et al., 2006). Inoltre, un recente lavoro ha messo in evidenza come l' α -sinucleina svolga un ruolo

protettivo per la cellula, studiando le interazioni esistenti tra questa proteina e la CSP- α (Cysteine-String Protein- α), un'altra proteina sinaptica.

La CSP- α è una co-chaperonina che contribuisce a formare una chaperonina enzimaticamente attiva (Tobaben et al., 2001). La funzione protettiva che viene svolta dalla CSP- α è dimostrata dal fatto che topi KO per questa proteina, dopo due o tre settimane dalla nascita, presentano disfunzioni dovute alla neurodegenerazione ed a deficienze nella trasmissione sinaptica che portano a morte gli animali entro pochi mesi.

L'espressione transgenica di α -sinucleina nei topi, elimina gli effetti letali della mancanza di CSP- α confermando in tal modo l'attività neuro protettiva svolta dall' α -sinucleina stessa (Chandra et al., 2005).

La duplicità di azione osservata per l' α -sinucleina è stata riscontrata anche per altre proteine che hanno un ruolo fondamentale nella fisiologia della cellula. Se infatti consideriamo esperimenti nei quali è stata utilizzata l'MPTP (1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetraidro-piridina) come neurotossina, possiamo osservare come ad esempio, la delezione del gene che codifica il DAT, induca una protezione dalla tossicità da MPTP (Gainetdinov et al., 1997). Analogamente, le monoaminoossidasi di tipo B (MAO-B), che svolgono un ruolo fondamentale nel metabolismo della DA, quando inattivate o quando vi è una delezione del gene che le codifica, si instaura una protezione dagli effetti deleteri dell'MPTP (Heikkila et al., 1985; Grimsby et al., 1997).

Nel caso dell' α -sinucleina, il suo comportamento sembra essere del tutto simile a quello della super ossido dismutasi Cu-Zn (SOD 1), la quale, in condizioni normali, svolge una funzione protettiva della cellula, andando a contrastare lo

stress ossidativo, ma se è aumentata la sua espressione, provoca danno neuronale ed è responsabile dell'insorgenza della sclerosi amiotrofica laterale ereditaria (SLA), la quale si caratterizza per la perdita dei motoneuroni del midollo spinale, dei neuroni della corteccia motoria ed infine della perdita dei neuroni dopaminergici della substantia nigra (Fornai et al., 2008).

Se consideriamo i risultati ottenuti dal nostro studio, è importante osservare che gli effetti neurotossici della METH, si manifestano principalmente a livello del terminale dopaminergico e non del corpo cellulare.

Tutte queste evidenze, inducono quindi ad ipotizzare che l'incremento di α -sinucleina che si ha dopo la somministrazione della METH, rappresenti un meccanismo compensatorio posto in essere per proteggere la cellula dal danno ossidativo. A tal proposito, è stato osservato sperimentalmente che se la METH viene somministrata per un lungo periodo di tempo, dando così alla cellula un margine temporale per incrementare l'espressione dell' α -sinucleina, la neurotossicità riscontrata a livello dei terminali dopaminergici è molto meno intensa rispetto ad una ripetuta somministrazione di questa sostanza ad intervalli di due ore (Mauceli et al., 2006). In quest'ultimo caso infatti, la cellula non ha il tempo di sintetizzare nuova α -sinucleina e ciò la espone maggiormente agli effetti dannosi della METH.

6. CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato che la METH:

- 1- Induce una significativa denervazione dopaminergica striatale.
- 2- Non induce perdita di neuroni dopaminergici nigrali.
- 3- Provoca un aumento di immunopositività per l' α -sinucleina nella substantia nigra.
- 4- Induce un selettivo aumento di immunopositività per l' α -sinucleina all'interno dei neuroni TH-positivi, quindi esclusivamente quelli che costituiscono la pars-compacta.
- 5- Induce la presenza di inclusioni α -sinucleina-positiva nei neuroni dopaminergici della substantia nigra.

7. BIBLIOGRAFIA

Abeliovich A., Schmitz Y., Fariñas I., Choi-Lundberg D., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron.*, 25(1):239-52.

Adams J., Palombella V.J., Elliott P.J. (2000). Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Invest New Drugs.*, 18(2):109-21.

Albers D.S. Sonsalla P.K. (1995). Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: pharmacological profile of protective and nonprotective agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 275(3):1104-14.

Axt K.J., Commins D.L., Vosmer G., Seiden L.S. (1990). alpha-Methyl-p-tyrosine pretreatment partially prevents methamphetamine-induced endogenous neurotoxin formation. *Brain Res.*, 515(1-2):269-76.

Barr A.M., Panenka W.J., MacEwan G.W., Thornton A.E., Lang D.J., Honer W.G., Lecomte T. (2006). The need for speed: an update on methamphetamine addiction. *J Psychiatry Neurosci.*, 31(5):301-13.

Betarbet R., Sherer T.B., Greenamyre J.T. (2005). Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Exp Neurol*, 191 (1):17-27.

Boveris A., Costa L.E., Poderoso J.J., Carreras M.C., Cadenas E. (2000). Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.*, 899:121-35.

Bowyer J.F., Tank A.W., Newport G.D., Slikker W. Jr, Ali S.F., Holson R.R. (1992). The influence of environmental temperature on the transient effects of methamphetamine on dopamine levels and dopamine release in rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther.* 260(2):817-24.

Braak H., Braak E., Yilmazer D., Schultz C., de Vos R.A., Jansen E.N. (1995). Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm.*, 46: 15-31.

Brown J.M., Hanson G.R., Fleckenstein A.E. (2001). Regulation of the vesicular monoamine transporter-2: a novel mechanism for cocaine and other psychostimulants. *J Pharmacol Exp Ther.*, 296(3):762-7.

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

Chandra S., Fornai F., Kwon H.B., Yazdani U., Atasoy D., Liu X., Hammer R.E., Battaglia G., German D.C., Castillo P.E., Südhof T.C. (2004). Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(41):14966-71.

Chandra S., Gallardo G., Fernández-Chacón R., Schlüter O.M., Südhof T.C. (2005). Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*, 123(3):383-96.

Charles V., Mezey E., Reddy P.H., Dehejia A., Young T.A., Polymeropoulos M.H., Brownstein M.J., Tagle D.A. (2000). Alpha-synuclein immunoreactivity of huntingtin polyglutamine aggregates in striatum and cortex of Huntington's disease patients and transgenic mouse models. *Neurosci.Lett.*, 289:29-32.

Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med.*, 4(11):1318-20.

Conway K.A., Lee S.J., Rochet J.C., Ding T.T., Williamson R.E., Lansbury P.T. Jr. (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*, 97(2):571-6.

Conway K.A., Rochet J.C., Bieganski R.M., Lansbury P.T. Jr. (2001). Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science*, 294(5545):1346-9.

Cookson M.R., Dauer W., Dawson T., Fon E.A., Guo M., Shen J. The Roles of Kinases in Familial Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience*; 27(44):11865–11868.

Cooper A.A., Gitler A.D., Cashikar A., Haynes C.M., Hill K.J., Bhullar B., Liu K., Xu K., Strathearn K.E., Liu F., Cao S., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Marsischky G., Kolodner R.D., Labaer J., Rochet J.C., Bonini N.M., Lindquist S. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, 313(5785):324-8.

Crossman A.R., Clarke C.E., Boyce R., Robertson R.G., Sambrook M.A. (1987). MPTP-induced parkinsonism in the monkey: neurochemical pathology, complications of treatment and pathophysiological mechanism. *Can J Neurol Sci.*, 14:428-435.

Cubells J.F., Rayport S., Rajendran G., Sulzer D. (1994). Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J Neurosci.*, 14(4):2260-71.

DeLong M.R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.*, 13: 281-285.

Dev K.K., Hofele K., Barbieri S., Buchman V.L., Van Der Putten H. (2003). Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, 45: 14-44.

El-Agnaf O.M., Irvine G.B. (2000). Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins. *J Struct Biol.*, 130(2-3):300-9.

Eliezer D., Kutluay E., Bussell R. Jr, Browne G. (2001). Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol.*, 307(4):1061-73.

Feany M.B., Bender W.W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404: 394-398.

Fleckenstein, A.E., Metzger, R.R., Gibb, J.W., and Hanson, G.R. (1997). A rapid and reversible change in dopamine transporters induced by methamphetamine. *European journal of pharmacology* 323, R9-10.

Fornai F., Lenzi P., Ferrucci M., Lazzeri G., Bandettini di Poggio A., Natale G., Busceti C.L., Biagioni F., Giusiani M., Ruggieri S., Paparelli A. (2005). Occurrence of neuronal inclusions combined with increase nigral expression of α -synuclein within dopaminergic neurons following treatment with amphetamine derivatives in mice. *Brain Research Bulletin*; 65: 405-413.

Fornai F., Lenzi P., Frenzilli G., Gesi M., Ferrucci M., Lazzeri G., Biagioni F., Nigro M., Falleni A., Giusiani M., Pellegrini A., Blandini F., Ruggieri S., Paparelli A. (2004). DNA damage and ubiquitinated neuronal inclusions in the substantia nigra and striatum of mice following MDMA (ecstasy). *Psychopharmacology*, 173(3-4):353-63.

Fornai F., Soldani P., Lazzeri G., Bandetti di Poggio A., Biagioni F., Fulceri F., Batini S., Ruggieri S., Paparelli A. (2005). Neuronal inclusions in degenerative disorders Do they represent static features or a key to understand the dynamics of the disease?. *Brain Research Bulletin*, 65: 275-290.

Fornai, F., Lenzi, P., Gesi, M., Soldani, P., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Capobianco, L., Battaglia, G., De Blasi, A., Nicoletti, F., and Paparelli, A. (2004). Methamphetamine produces neuronal inclusions in the nigrostriatal system and in PC12 cells. *J Neurochem* 88, 114-123.

Fornai F., Longone P., Ferrucci M., Lenzi P., Isidoro C., Ruggieri S., Paparelli A. (2008). Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy*, 4(4):527-30.

Franklin K.B.J., Paxinos G. (1997). The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, London.

Gainetdinov R.R., Fumagalli F., Jones S.R., Caron M.G. (1997). Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J Neurochem.*, 69(3):1322-5.

Giasson B.I., Uryu K., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (1999). Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *J Biol Chem.*, 274(12):7619-22.

Giorgi F.S., Bandettini di Poggio A., Battaglia G., Pellegrini A., Murri L., Ruggieri S., Paparelli A, Fornai F. (2006). A short overview on the role of alpha-synuclein and proteasome in experimental models of Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.*; 70: 105-109.

Gómez-Tortosa E., Newell K., Irizarry M.C., Sanders J.L., Hyman B.T. (2000). alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. *Acta Neuropathol.*, 99(4):352-7.

Greenamyre J.T. (1993). Glutamate-dopamine interactions in the basal ganglia: relationship to Parkinson's disease. *J Neural Transm Gen Sect.*, 91: 255-269.

Grimsby J., Toth M., Chen K., Kumazawa T., Klaidman L., Adams J.D., Karoum F., Gal J., Shih J.C. (1997). Increased stress response and beta-phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nat. Genet.*, 17(2):206-10.

Hara T., Nakamura K., Matsui M., Yamamoto A., Nakahara Y., Suzuki-Migishima R., Yokoyama M., Mishima K., Saito I., Okano H., Mizushima N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095):885-9.

Hart C.L., Ward A.S., Haney M., Foltin R.W., Fischman M.W. (2001). Methamphetamine self-administration by humans. *Psychopharmacology (Berl)*, 157(1):75-81.

Heikkila R.E., Nicklas W.J., Vyas I., Duvoisin R.C. (1985). Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci. Lett.*, 18;62(3):389-94.

Hornykiewicz O. (2001). Dopamine and Parkinson's disease. A personal view of the past, the present, and the future. *Adv. Neurol.*; 86: 1-11.

Hsu L.J., Sagara Y., Arroyo A., Rockenstein E., Sisk A., Mallory M., Wong J., Takenouchi T., Hashimoto M., Masliah E. (2000). alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol.*, 157(2):401-10.

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.*, 201(1):24-31.

Imam S.Z., el-Yazal J., Newport G.D., Itzhak Y., Cadet J.L., Slikker W. Jr, Ali S.F. (2001). Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. *Ann N Y Acad Sci.*, 939:366-80.

Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M., Ge N., Flanagan L., de Silva H.A., Kittel A., Saitoh T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*, 14(2):467-75.

Izenwasser S. (2004). The role of the dopamine transporter in cocaine abuse. *Neurotox Res.*;6(5):379-83.

Jellinger K.A. (2003). Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov.Disord*; 18:S2-S12.

Kilbourn M.R., Sherman P., Abbott L.C. (1998). Reduced MPTP neurotoxicity in striatum of the mutant mouse tottering. *Synapse*, 30: 205-210.

Khoshbouei H., Wang H., Lechleiter J.D., Javitch J.A., Galli A. (2003). Amphetamine-induced dopamine efflux. A voltage-sensitive and intracellular Na⁺-dependent mechanism. *J Biol Chem.*, 278(14):12070-7.

Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676):544-5.

Klivenyi, P., Siwek, D., Gardian, G., Yang, L., Starkov, A., Cleren, C., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Abeliovich, A. Beal, M.F. (2006). Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins. *Neurobiol. Dis.*, 21, 541–548.

Kruger R., Kuhn W., Muller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Eppelen J.T., Schols L., Riess O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.*, 18, 106–108.

Kuczenski R., Segal D.S., Cho A.K., Melega W. (1995). Hippocampus norepinephrine, caudate dopamine and serotonin, and behavioral responses to the stereoisomers of amphetamine and methamphetamine. *J Neurosci.*, 15(2):1308-17.

Lemasters J.J., Qian T., Bradham C.A., Brenner D.A., Cascio W.E., Trost L.C., Nishimura Y., Nieminen A.L., Herman B. (1999). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr.*, 31(4):305-19.

Lewy F.H. (1912). Paralysis agitans. In : *Handbuch der Neurologie*, Springer, Berlin. 920-933.

Liu Y., Fallo L., Lashuel H. A., Liu Z., Lansbury, P. T. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99:10813.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, (1):265-75.

Lukas S.E. (1997). *Proceedings of the national consensus meeting on the use, abuse and sequelae of abuse of methamphetamine with implications for prevention, treatment and research*. Substance Abuse and Mental Health Administration; DHHS Publication SMA 96-8013, Rockville, MD.

Machida Y., Chiba T., Takayanagi A., Tanaka Y., Asanuma M., Ogawa N., Koyama A., Iwatsubo T., Ito S., Jansen P.H., Shimizu N., Tanaka K., Mizuno Y., Hattori N. (2005). Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 332(1):233-40.

Mantle T.J., Tipton K.F., Garrett N.J. (1976). Inhibition of monoamine oxidase by amphetamine and related compounds. *Biochem Pharmacol.*, 25(18):2073-7.

Mariño G, López-Otín C (2004). Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci.*, 61(12):1439-54.

Martin, L.J., Pan, Y., Price, A.C., Sterling, W., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Lee, M.K. (2006) Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J. Neurosci.*, (26): 41–50.

Mauceli G., Busceti C.I., Pellegrini A., Soldani P., Lenzi P., Paparelli A., Fornai F. (2006). Overexpression of alpha-synuclein following methamphetamine: is it good or bad? *Ann N Y Acad Sci.*, 1074:191-7.

Meredith G.E., Halliday G.M., Totterdell S. (2004). A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: new insights into Lewy body formation. *Parkinson Relat Des.*, 10: 191-202.

Miller D.B., 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(2):752-60.

Mosharov E.V., Staal R.G., Bové J., Prou D., Hananiya A., Markov D., Poulsen N., Larsen K.E., Moore C.M., Troyer M.D., Edwards R.H., Przedborski S., Sulzer D. (2006). Alpha-synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *J Neurosci.*, 26(36):9304-11.

Murphy D.D., Rueter S.M., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci.*, 20(9):3214-20.

Myung J., Kim K.B., Crews C.M. (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev.*, 21(4):245-73.

Narhi L., Wood S.J., Steavenson S., Jiang Y., Wu G.M., Anafi D., Kaufman S.A., Martin F., Sitney K., Denis P., Louis J.C., Wypych J., Biere A.L., Citron M. (1999). Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem*, 274(14):9843-6.

Nordahl T.E., Salo R., Leamon M. (2003). Neuropsychological effects of chronic methamphetamine use on neurotransmitters and cognition: a review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 15(3):317-25.

Norris E.H., Giasson B.I., Lee V.M. (2004). Alpha-synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol.*, 60:17-54.

Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L.(1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045–2047.

Riddle E.L., Fleckenstein A.E., Hanson G.R. (2006). Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *AAPS J.*, 8(2):E413-8.

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

Rothman R.B., Baumann M.H. (2003). Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol.*, 479(1-3):23-40.

Rothman R.B., Jayanthi S., Wang X., Dersch C.M., Cadet J.L., Prisinzano T., Rice K.C., Baumann M.H. (2003). High-dose fenfluramine administration decreases serotonin transporter binding, but not serotonin transporter protein levels, in rat forebrain. *Synapse*, 50(3):233-9.

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

Serpell L.C., Berriman J., Jakes R., Goedert M., Crowther R.A. (2000). Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(9):4897-902.

Shimura H., Hattori N., Kubo S., Mizuno Y., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Iwai K., Chiba T., Tanaka K., Suzuki T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.*, 25(3):302-5.

Shults C.W. (2006). Lewy bodies. *PNAS*, 103(6): 1661-1668.

Sidhu A., Wersinger C., Moussa C.E., Vernier P. (2004). The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 1035:250-70.

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blacato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. (2003). α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302, 841.

Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.*, 28: 839-840.

Stefanis L., Larsen K.E., Rideout H.J., Sulzer D., Greene L.A. (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci.*, 21(24):9549-60.

Stefanova N., Klimaschewski L., Poewe W., Wenning G.K., Reindl M. (2001). Glial cell death induced by overexpression of alpha-synuclein. *J Neurosci Res.*, 65(5):432-8.

Stichel, C.C., Zhu, X.R., Bader, V., Linnartz, B., Schmidt, S., Lubbert, H. (2007) Mono- and double-mutant mouse models of Parkinson's disease display severe mitochondrial damage. *Hum. Mol. Genet.*, 16(20):3377-93.

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

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

Sulzer D., Maidment N.T., Rayport S. (1993). Amphetamine and other weak bases act to promote reverse transport of dopamine in ventral midbrain neurons. *J Neurochem.*, 60(2):527-35

Sulzer D., Sonders M.S., Poulsen N.W., Galli A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol.*, 75(6):406-33.

Thomas B., Beal M.F. (2007). Parkinson's Disease. *Human Molecular Genetics*; 16: 183-194.

Tobaben S., Thakur P., Fernández-Chacón R., Südhof T.C., Rettig J., Stahl B.A. (2001). trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron.*, 31(6):987-99.

Uversky V.N., Fink A.L. (2002). Amino acid determinants of alpha-synuclein aggregation: putting together pieces of the puzzle. *FEBS Lett.*, 522(1-3):9-13.

Wagner G.C., Ricaurte G.A., Seiden L.S., Schuster C.R., Miller R.J., and Wetley J. (1980). Long-lasting depletions of striatal dopamine and loss of dopamine uptake sites following repeated administration of methamphetamine. *Brain Res.*181, 151-160.

Wagner G.C., Schuster C.R., Seiden L.S. (1979). Methamphetamine induced changes in brain catecholamines in rats and guinea pigs. *Drug Alcohol Depend.* 4, 435-438.

Wolf D.H., Hilt W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3):19-31.