

UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA



Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche
XXX ciclo

**Studio dei meccanismi neurotossici coinvolti nella
neurodegenerazione indotta da mutazione Lrrk2 o da α -sinucleina
in modelli *ex-vivo* o *in vitro* di malattia di Parkinson**

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Guendalina Bastioli

Relatore:

Dott.ssa Pasqualina Castaldo

Anno Accademico 2016/2017

Indice

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUZIONE | 4 |
| 1.1 | FATTORI AMBIENTALI:..... | 9 |
| 1.2 | FATTORI GENETICI:..... | 11 |
| 1.2.1 | <i>Forme monogeniche autosomiche dominanti:</i> | 12 |
| 1.2.2 | <i>Mutazioni a carico del dominio chinamico</i> | 16 |
| 1.2.3 | <i>Mutazioni a carico del dominio GTP-asico</i> | 17 |
| 1.3 | IL RUOLO DEL MITOCONDRIO | 20 |
| 1.4 | NCX..... | 24 |
| 1.5 | IL MODELLO G2019S | 26 |
| 2 | SCOPO DELLA TESI | 27 |
| 3 | MATERIALI E METODI | 30 |
| 3.1 | MODELLO ANIMALE..... | 30 |
| 3.2 | CULTURE CELLULARI..... | 31 |
| 3.3 | PREPARAZIONE DI FETTINE CORTICOSTRIATALI E PROCEDURA DI MANTENIMENTO IN VITRO..... | 31 |
| 3.4 | MODELLO DI EARLY PARKINSON..... | 31 |
| 3.5 | ELETTROFISIOLOGIA..... | 32 |
| 3.5.1 | <i>Registrazioni elettrofisiologiche extracellulari (field potentials)</i> | 32 |
| 3.5.2 | <i>Registrazioni con tecnica di patch clamp</i> | 32 |
| 3.6 | REGISTRAZIONI CON TECNICA AMPEROMETRICA (CPA)..... | 33 |
| 3.7 | REAL-TIME CONFOCAL IMAGING..... | 33 |
| 3.8 | AGENTI FARMACOLOGICI UTILIZZATI..... | 34 |
| 3.9 | ANALISI STATISTICA | 36 |
| 4 | RISULTATI | 37 |
| 4.1 | ANALISI DELLE PROPRIETÀ ELETTROFISIOLOGICHE DI BASE NEL MODELLO KI G2019S LRRK2 | 37 |
| 4.1.1 | <i>proprietà intrinseche di membrana</i> | 37 |
| 4.1.2 | <i>Attività glutamatergica spontanea</i> | 38 |
| 4.1.3 | <i>Rilascio presinaptico di neurotrasmettitore</i> | 39 |
| 4.1.4 | <i>Attività dei recettori postsinaptici glutamatergici</i> | 39 |
| 4.2 | STUDIO DEL RILASCIO DI DOPAMINA STRIATALE NEL MODELLO LRRK2 G2019S KI, D1994S KD E LRRK2 KO..... | 40 |
| 4.3 | STUDIO DELLE EPSC SPONTANEE ED EVOCATE NEL MODELLO LRRK2 KI G2019S, D1994S KD E LRRK2 KO..... | 42 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.4 | STUDIO DELLA TOSSICITÀ MITOCONDRIALE NELLE FETTINE CORTICOSTRIATALI DI LRRK2 KI G2019S, D1994S KD, E LRRK2 KO..... | 51 |
| 4.5 | STUDIO DELLA TOSSICITÀ MITOCONDRIALE IN UN MODELLO DI EARLY PARKINSON..... | 57 |
| 4.6 | VALUTAZIONE DEL CA ²⁺ MITOCONDRIALE NELLE SHSY5Y | 60 |
| 5 | DUSCUSSIONE..... | 61 |
| 6 | CONCLUSIONI | 65 |
| 7 | BIBLIOGRAFIA | 66 |

1 INTRODUZIONE

La malattia di Parkinson (MP) è una patologia neurodegenerativa cronica a carattere progressivo che colpisce circa l'1-2% della popolazione sopra i 65 anni e il 4-5% sopra gli 85 anni. E' la seconda patologia neurodegenerativa più frequente dopo la malattia di Alzheimer (Calabresi et al., 2012). La MP è complessa e multifattoriale, allo sviluppo della patologia concorrono sia fattori ambientali che genetici (figura 1).

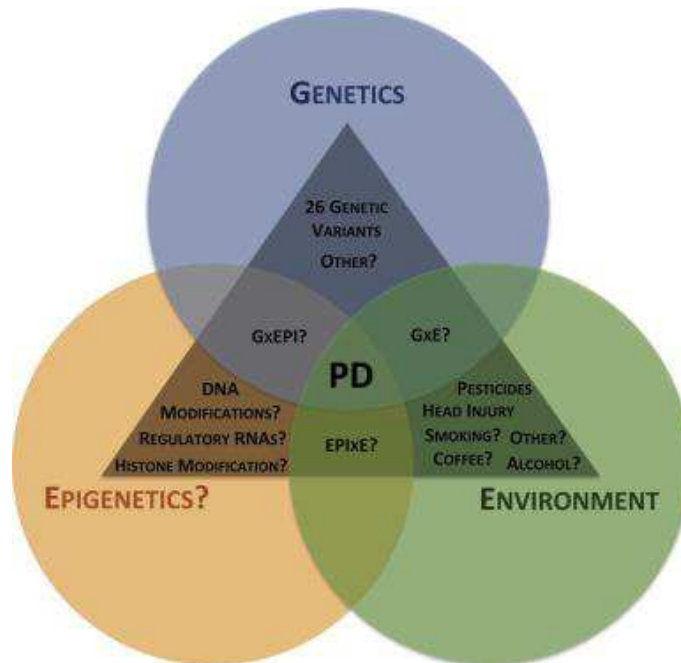


Figura 1 Panoramica schematica dell'interazione di domini genetici, ambientali ed epigenetici che potrebbero essere alla base della fisiopatologia della MP.

La MP è caratterizzata sia da sintomi motori come bradicinesia, instabilità posturale, rigidità e tremore, che da sintomi non motori come depressione, ansia, stanchezza, disturbi del sonno e disturbi cognitivi (Ahn et al., 2017).

Colpisce i Gangli della Base, un gruppo di nuclei subcorticali localizzati alla base di entrambi gli emisferi che comprendono: il Nucleo Striato, il Globo Pallido Esterno (GPe), il Globo Pallido Interno (GPi), il Nucleo Subtalamico (STN), la pars compacta della Sostanza Nera (SNc) e la pars reticulata (SNr). I GB sono coinvolti in numerose funzioni tra cui: controllo del movimento, apprendimento, pianificazione, memoria di lavoro ed emozioni. Il circuito più studiato è quello motorio che risulta coinvolto nella patogenesi della MP.

Classicamente, si riconoscono due vie motorie nei GB: la “via diretta” e la “via indiretta” (figura 2).

La via diretta è costituita dalle proiezioni dello striato al segmento interno del globus pallidus e alla pars reticulata della sostanza nera (che forma l’uscita dei nuclei della base), che a loro volta proiettano al talamo.

La via indiretta è costituita dal circuito che dal neostriato si porta al segmento esterno del GP e quindi al STN. A sua volta, questo nucleo proietta ad entrambi i segmenti del GP e alla SN.

La via diretta è composta da neuroni che utilizzano come neurotrasmettitori il GABA e la sostanza P, che sono inibitori, al pari dei neuroni che formano l’uscita dei nuclei della base diretta dal talamo, che utilizzano il GABA come neurotrasmettitore. Il movimento si genera quando i neuroni talamici vengono liberati dall’inibizione tonica esercitata dall’ efferenze dei nuclei della base. Ciò si verifica quando le afferenze corticostriatali eccitano i neuroni dello striato e quindi determinano una disinibizione fasica dei neuroni talamici, a seguito dell’inibizione delle cellule inibitorie che costituiscono l’uscita dei nuclei della base. Si ritiene che l’aumento dell’attività dei neuroni talamocorticali faciliterebbe il movimento perché provoca l’attivazione dei neuroni della corteccia premotoria e dell’area motrice supplementare e quindi dei neuroni che proiettano alla corteccia motrice, al tronco dell’encefalo e al midollo spinale.

La via indiretta dei nuclei della base agisce in modo diverso. L’eccitamento dei neuroni di proiezione corticostriatali determina l’inibizione dei neuroni del segmento

esterno del GP, che è mediata da GABA e da encefalina, e la disinibizione dei neuroni del STN mediata da GABA; questi neuroni a loro volta, determinano l'eccitamento, mediato dal glutammato, dei neuroni efferenti dei nuclei della base. Si produce quindi un'inibizione dei neuroni talamici e quindi una riduzione dell'eccitazione dei neuroni dell'area motrice supplementare. La proiezione dopaminergica proveniente dalla sostanza nera esercita azioni diverse sui neuroni del neostriato. La DA eccita i neuroni della via diretta, costituita dai neuroni striatali che utilizzano come neurotrasmettitori il GABA e la sostanza P e proiettano ai neuroni efferenti dei nuclei della base. Al contrario la DA inibisce la via indiretta, costituita dai neuroni che utilizzano come neurotrasmettitori il GABA e l'encefalina e proiettano al segmento esterno del GP. Poiché la via diretta facilita il movimento in quanto determina l'eccitamento dei neuroni dell'area motrice supplementare, mentre la via indiretta svolge l'azione opposta, la DA faciliterebbe il movimento agendo su entrambe le vie. L'attivazione dello striato può avere effetti opposti sull'uscita dei nuclei della base (e quindi sul talamo e sulla corteccia). La variazione dell'attività di parti diverse di queste due vie, porta alla MP.

I neuroni spinosi (MSNs) della via diretta e indiretta sono caratterizzati da differenti espressioni dei recettori della DA. I recettori della DA di tipo D1 sono espressi nella pathway della via diretta, mentre i recettori D2 sono coinvolti nella via indiretta (Calabresi et al., 2014). Questi due recettori sono associati a distinte proteine G che sono legate a differenti segnali intracellulari e portano a differenti risposte biochimiche. Questa segregazione neurochimica è considerata un dicotomo effetto di attivazione della via diretta e indiretta (Calabresi et al., 2014).

Ci sono inoltre molecole endogene come gli endocannabinoidi (CBs) e ossido nitrico (NO) che modulano l'attività degli MSNs attraverso vie non canoniche. Numerosi studi hanno dimostrato una stretta relazione tra l'attivazione del recettore D2 della dopamina post-sinaptico e la diminuzione del rilascio di glutammato pre-sinaptico dimostrando come tale relazione sia mediata dal rilascio di endocannabinoidi. L'attivazione del recettore D2 provocherebbe un aumento della concentrazione di calcio a livello del terminale post-sinaptico determinando la successiva liberazione di endocannabinoidi. Questi, interagendo con il recettore inibitorio CB1 al terminale pre-sinaptico, determinerebbero la diminuzione di

rilascio del neurotrasmettitore dalle terminazioni glutammatergiche (Calabresi et al., 2014).

La morte neuronale che si verifica a carico della pars compacta della SN è responsabile della deplezione dopaminergica che si viene a verificare nella MP. Tale deficit dopaminergico conduce a un'alterazione nella modulazione dei recettori D2 nello Striato e a un'iperattivazione del STN e del GPi determinando un'eccessiva inibizione delle proiezioni talamocorticali (Obeso et al., 2008).

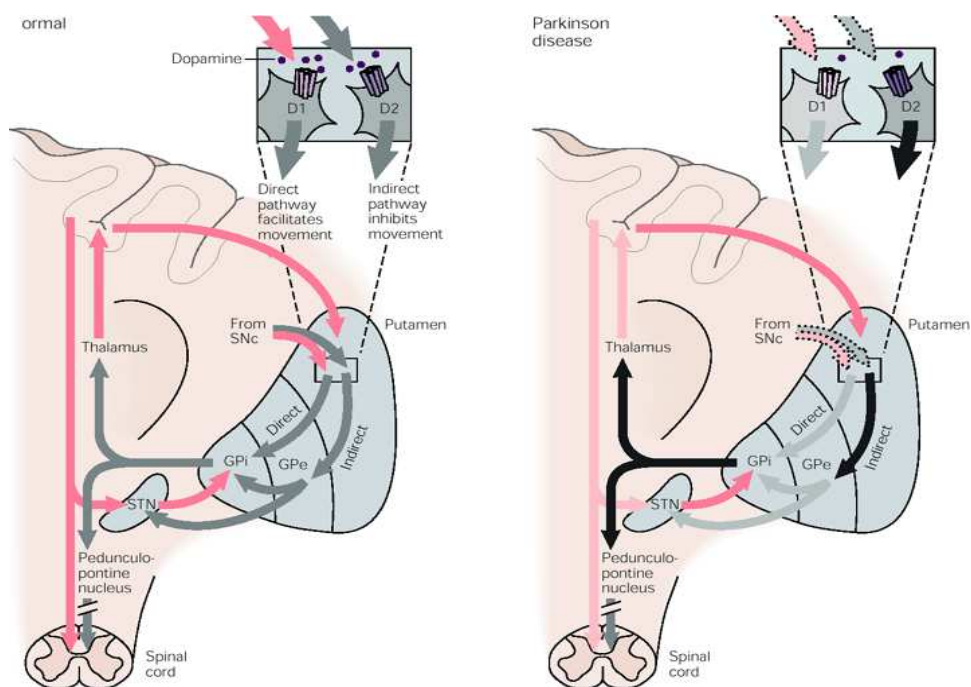


Figura 2 Principles of neural science, E.R. Kandel

La sintomatologia clinica si manifesta quando circa l'80% della DA striatale e il 50% dei neuroni della sostanza nera sono persi (Samii et al., 2004).

Tale modello classico, pur essendo un valido schematismo didattico, sembra essere troppo rigido e semplicistico. Infatti, recenti studi hanno dimostrato come le due vie siano strutturalmente e funzionalmente interconnesse.

Interneuroni colinergici, mediante il rilascio di Ach, interneuroni NOS-positivi, mediante il rilascio di NO, e interneuroni a rapida scarica, mediante il rilascio di GABA, andrebbero a scaricare sia a livello dei neuroni striatali della via diretta sia

in quelli facenti parte della indiretta, creando così connessioni a più livelli e un continuo dialogo tra le due vie.

Ciò che sembra essere determinante per l'inizio e l'esecuzione dell'attività motoria sarebbe quindi la coordinazione tra le due vie e non l'attivazione preferenziale di una rispetto all'altra (Calabresi et al., 2014) (figura 3).

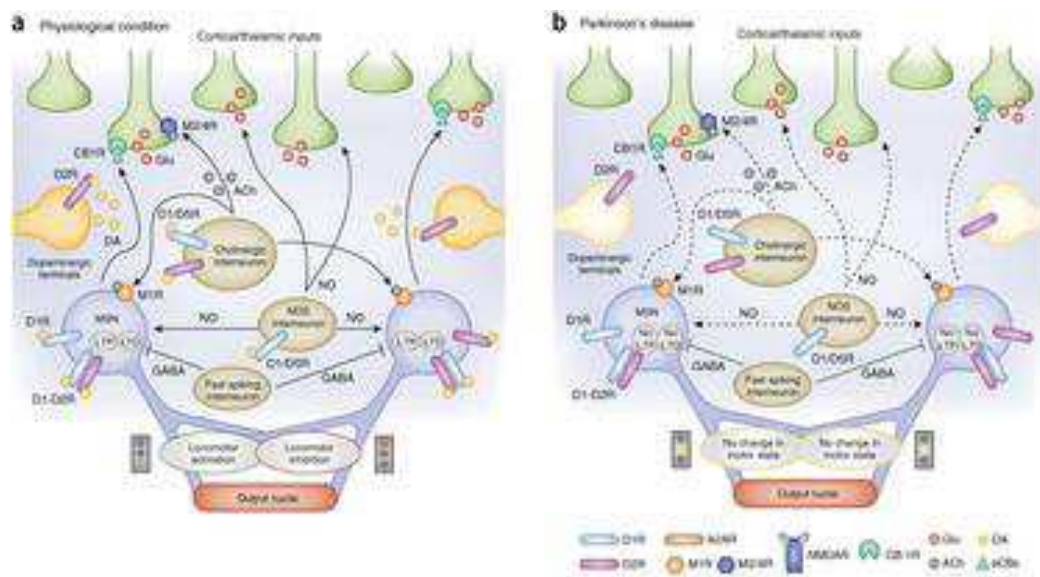


Figura 3 Rappresentazione dei diversi pathway della via diretta e indiretta Calabresi et al., 2014

La principale caratteristica anatomica della MP è la degenerazione dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta (SNc), che porta ad una perdita della DA endogena nello striato (Calabresi et al., 2012).

Poiché la MP è caratterizzata da una progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici, soprattutto a carico della SN, lo scopo della terapia sarà quello di andare a ripristinare una normale attività dopaminergica striatale. La DA, non essendo in grado di superare la barriera emato-encefalica, non può essere somministrata come tale ma viene somministrato un suo precursore fisiologico: la levodopa. La levodopa, a livello centrale, verrà rapidamente trasformata dalle decarbossilasi presenti nelle terminazioni presinaptiche dei neuroni dopaminergici

a livello striatale. Inizialmente la maggior parte dei pazienti rispondono molto bene alla terapia tuttavia, con il prolungarsi del trattamento negli anni, iniziano a comparire reazioni avverse a dosi prima tollerate e l'efficacia della terapia si riduce progressivamente (Calabresi et al., 2010)

Oltre alla degenerazione dopaminergica, la MP provoca anche la perdita di neuroni non dopaminergici in tutto il sistema nervoso. Per questo motivo studi preclinici e clinici neuroprotettivi sono stati focalizzati sulla protezione di neuroni dopaminergici che proiettano sullo striato o non dopaminergici coinvolti in modo critico nella fisiopatologia della malattia (Calabresi et al., 2012). Il mantenimento del corretto funzionamento dei circuiti sinaptici striatali e la conservazione della morfologia dei neuroni spinosi è stato studiato come un target secondario negli studi di neuro protezione (Calabresi et al., 2012). Si è ipotizzato che i neuroni MSNs siano esenti da patologia fino alla fase tardiva della malattia, quando mostrano una progressiva perdita di spine dendritiche (Stephens et al., 2005). La morfologia e la funzione delle spine striatali sono importanti perché la testa delle spine striatali riceve proiezioni glutammatergiche eccitatorie dalla corteccia celebrale, mentre le proiezioni dopaminergiche dal contatto SNc sul collo delle spine.

1.1 Fattori ambientali:

Nella maggioranza dei casi, la MP è sporadica, probabilmente dovuta ad una combinazione di fattori di rischio ambientali e fattori genetici.

Nel 1983, uno studio condotto da Langston e collaboratori riportò per la prima volta l'associazione tra l'esposizione al MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) e l'insorgenza della malattia (Langston et al., 1983). In particolare, un gruppo di tossicodipendenti sviluppò una patologia clinicamente indistinguibile dalla MP, in seguito all'assunzione di droghe iniettive contaminate con il suddetto tossico. Il MPTP passa liberamente la barriera emato-encefalica e, a livello centrale, viene convertito in MPP+ (1-metil-4-fenilpiridina) dagli astrociti. Successivamente viene captato selettivamente dai terminali delle cellule dopaminergiche e va ad inibire il Complesso I nella catena respiratoria mitocondriale (Samii et al., 2004). Tale studio individuò l'esposizione ad alcune sostanze tossiche, in particolare erbicidi e pesticidi, come possibili fattori di rischio per lo sviluppo della patologia e, con la

successiva comprensione dell'inibizione della catena respiratoria, vennero poste le basi per la futura identificazione del ruolo del mitocondrio nella patogenesi della MP. Inseguito molti altri fattori sono stati oggetto di studio tra i quali: l'esposizione a metalli, solventi organici, campi magnetici, fumo di sigaretta, assunzione di caffeina, alcool, ferro e vari nutrienti con la dieta, riportando risultati contrastanti (Wirdefeldt et al., 2011).

L'esposizione ai pesticidi, sono stati da tempo suggeriti come fattori eziologici nel MP (Gorell et al., 1998). Il Rotenone (ROT) è il membro più potente dei rotenoidi, una famiglia di isoflavonoidi estratti da piante Leguminosae, comunemente utilizzate come pesticidi naturali e un inibitore del complesso I mitocondriale (Gorell et al., 1998) (figura 4).

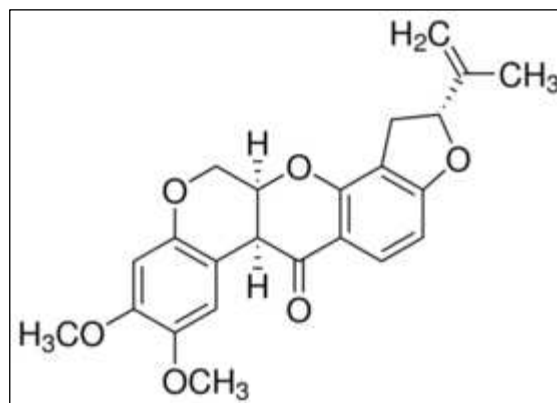


Figura 4 Molecola di Rotenone

Dato che l'inibizione del complesso I mitocondriale è una caratteristica ben documentata della MP idiopatica (Swerdlow et al., 1996), il sospetto che il ROT fosse una neurotossina dopaminergica. Molti studi hanno dimostrato che la somministrazione sistemica di ROT ricapitola accuratamente molte altre caratteristiche della MP, tra cui: degenerazione selettiva del sistema dopaminergico nigrostriatale, generazione di ROS, accumulo e aggregazione di α -sinucleina, corpi di Lewy, neurite di Lewy, attivazione di microglia, neuroinfiammazione e disturbi del movimento (Sherer et al., 2003) e ROT può anche portare alla fosforilazione e

all'aggregazione delle proteine tau e amiloide (Nandipati and Litvan, 2016). Altri studi sugli animali esposti al ROT hanno scoperto che, a seguito di somministrazioni di basse o alte dosi di ROT, la disfunzione motoria non era sempre associata alla perdita di cellule dopaminergiche, suggerendo che il ROT può causare disfunzione mitocondriale diffusa nelle cellule non dopaminergiche e periferiche centrali al di fuori del SNC (Nandipati and Litvan, 2016). Nian Xiong e colleghi hanno riferito che l'infusione stereotassica di ROT nella substantia nigra nel ratto riproduce un modello affidabile per la MP (Xiong et al., 2009).

1.2 Fattori genetici:

In circa il 5-10% dei casi, è riconoscibile una forma monogenica di malattia con trasmissione mendeliana (Kalinderi et al., 2016). Le forme monogeniche sono causate dalla mutazione di un singolo gene ereditato con modalità dominante o recessiva. Tali mutazioni sono presenti nel 30% dei casi familiari e nel 3-5% dei casi sporadici. Ad oggi sono stati identificati 8 loci genici mutati, denominati PARK e numerati in senso crescente, in ordine cronologico secondo la loro identificazione (tabella 1). Le forme monogeniche sono causate dalla mutazione di un singolo gene ereditato con modalità dominante o recessiva.

| | Locus | Inheritance | Gene | Disorder |
|---------|--------------|--------------------|-----------------------|------------------------------------|
| PARK 1 | 4q21-22 | AD | α - sinucleina | EOPD |
| PARK 2 | 6q25.2-q27 | AR | Parkina | EOPD |
| PARK 3 | 2p13 | AD | ? | Classical PD |
| PARK 4 | 4q21-q23 | AD | α - sinucleina | EOPD |
| PARK 5 | 4p13 | AD | UCHL1 | Classical PD |
| PARK 6 | 1p35-36 | AR | PINK1 | EOPD |
| PARK 7 | 1p36 | AR | DJ- 1 | EOPD |
| PARK 8 | 12p12 | AD | LRRK2 | Classical PD |
| PARK 9 | 1p36 | AR | ATP13A2 | Atypical PD |
| PARK 10 | 1p32 | Risk Factor | ? | Classical PD |
| PARK 11 | 2q36-27 | AD | ? (no GIGYF2) | Late onset PD |
| PARK 12 | Xq21-q25 | Risk Factor | ? | Classical PD |
| PARK 13 | 2p12 | AD o Risk Factor | HTrA2 | Classical PD |
| PARK 14 | 22q13.1 | AR | PLA2G6 | EO dystonia parkinsonism |
| PARK 15 | 22q12-13 | AR | FBX07 | EO parkinsonian pyramidal syndrome |
| PARK 16 | 1q32 | Risk Factor | ? | Classical PD |
| PARK 17 | 16q11.2 | AD | VPS35 | Classical PD |
| PARK 18 | 3q27.1 | AD | EIF461 | Classical PD |

Tabella 1 Mutazioni monogeniche della MP

1.2.1 Forme monogeniche autosomiche dominanti:

a) PARK 1 e PARK 4 (α -sinucleina, SNCA)

Il gene dell' α - sinucleina (SNCA) è stato il primo ad essere identificato e ad essere correlato ad una forma di MP a trasmissione autosomica dominante. Tale gene venne mappato per la prima volta all'interno della famiglia Contursi (dal nome del paese campano di origine) che mostrava un'eredità chiaramente autosomica dominante della malattia e, poco tempo dopo, in due famiglie greche.

L' α -Sinucleina (α -Syn) è una proteina sinaptica costituita da 140 aminoacidi (Guhathakurta et al., 2017). Il gene che codifica per questa proteina risiede sul cromosoma 4 nell'uomo e si estende intorno a una regione di 114 kb nel genoma (Guhathakurta et al., 2017). L' α -Syn appartiene a una famiglia di proteine di sinucleina in cui sono presenti anche altri due membri, come β e γ sinuclein, e i geni che codificano per loro sono ben conservati attraverso la specie (George, 2002). L'espressione dell' α -Syn può essere regolata in varie fasi del suo sviluppo come

qualsiasi altro sistema di espressione genica. È interessante notare che la deregolazione di questo gene è da tempo associata a MP (Guhathakurta et al., 2017). Tale proteina presenta un dominio amino-terminale, responsabile dell'interazione con la membrana fosfolipidica; un dominio idrofobico centrale e un dominio carbossi-terminale caricato negativamente. Il gene è stato mappato a livello del braccio lungo del cromosoma 4 ed è stata identificata la prima mutazione missenso Ala53Thr. Successivamente altre due mutazioni puntiformi sono state identificate (Ala30Pro e Glu46Lys). Tutte e tre le mutazioni sono state riscontrate a livello della regione amino-terminale della proteina.

In seguito a tali mutazioni, è stato ipotizzato che la proteina aumenti la tendenza al ripiegamento anomalo a beta-foglietto, andando a determinare la formazione di aggregati come: oligomeri, protofibrille, fibrille e filamenti. Tra tutte, le fibrille e le protofibrille risulterebbero estremamente tossiche per la cellula.

L' α -Syn è una fosfoproteina presinaptica normalmente presente in uno stato non-ripiegato, coinvolta nel traffico intracellulare all'interno del network reticolo endoplasmatico/Golgi e che sarebbe fisiologicamente degradata dal sistema ubiquitina proteasoma e dai lisosomi.

L'anomalo ripiegamento determinerebbe un'impossibilità allo smaltimento fisiologico e la formazione dei corpi di Lewy sarebbe la testimonianza del tentativo fallimentare messo in atto dalla cellula per eliminazione dell' α -Syn anomala. Inoltre, il contributo di questo gene nella patogenesi del MP in modo dose dipendente è diventato ancora più chiaro quando è stato dimostrato che la triplicazione del gene produce una forma più grave della malattia rispetto alla duplicazione SNCA (Fuchs et al., 2008). Questa evidenza proveniente da casi familiari di MP chiaramente indica che qualsiasi meccanismo di regolazione alterato, che può portare ad una maggiore produzione di α -Syn nel cervello, può essere fortemente associato alla patogenesi della MP.

Sulla base di questo, è possibile immaginare che l'alterazioni nella regolazione di questo gene può portare ad un'espressione distorta di α -Syn, che in ultima analisi può produrre le sinucleopatie come osservato nella MP e in altri disturbi neurodegenerativi. Sulla base di queste considerazioni derivanti da casi familiari di MP, sono stati condotti diversi studi sui casi di MP idiopatici tesi a chiarire l'impatto

dei fattori genetici e epigenetici che possono regolare l'espressione α -Syn compromettendo la trascrizione e l'elaborazione post-trascrizionale del RNA in questa condizione patologica (Guhathakurta et al., 2017).

Inoltre, la proteina potrebbe interferire con il metabolismo mitocondriale, inibendo la formazione di ATP, e quindi un aumento di ROS e conseguente neurodegenerazione.

Oltre alle mutazioni missenso, sono state riscontrate in altre famiglie triplicazioni e duplicazioni dello stesso gene, sempre ereditate in forma autosomica dominante, suggerendo che la semplice duplicazione o triplicazione del gene è sufficiente a causare la malattia. Tale osservazione ha suggerito che il meccanismo di tossicità mediato dall' α -sinucleina potrebbe essere anche legato all'aumentata propensione all'aggregazione di tale proteina, non mutata, ma presente in concentrazione maggiore rispetto al livello fisiologico.

Il fenotipo di malattia riscontrato in pazienti con mutazioni missenso è una forma di Parkinson levodopa-responsiva, a esordio precoce, a rapida progressione e con un'alta prevalenza di disturbi psichiatrici, demenza e disturbi disautonomici.

I pazienti che presentavano l'amplificazione genica, riportavano un fenotipo simile di malattia. Tuttavia, in coloro che avevano una triplicazione genica l'età di esordio della malattia era intorno ai 30 anni, in quelli che riportavano una duplicazione l'esordio era intorno ai 50 anni, mostrando una correlazione tra i livelli di α -Syn e la precocità di sviluppo della malattia (Klein and Westenberger, 2012).

b) PARK 5 (UCHL1)

Altro gene mutato è quello dell'idrolasi l'1-ubiquitina-carbossi-terminale. Questo gene è stato identificato in una coppia di fratelli tedeschi con una forma di Parkinson autosomica dominante con fenotipo classico. La proteina UCHL1 sarebbe impiegata nella via di degradazione ubiquitina-proteasoma e, la mutazione, determinerebbe una riduzione dell'attività enzimatica della proteina (Wirdefeldt et al., 2011).

c) PARK 8 (LRRK2)

Nel 2002 venne individuato per la prima volta, in una famiglia giapponese con Parkinson AD, un difetto genico localizzato sul cromosoma 12. Il locus responsabile di tale mutazione fu chiamato PARK8. Nel 2004 due gruppi di ricerca indipendenti (Paisan-Ruiz et al., 2004) (Zimprich et al., 2004) riscontrarono la stessa mutazione in numerose altre famiglie ed identificarono il gene mutato.

Il fenotipo clinico riportato dai pazienti con tale mutazione era del tutto simile a quello di pazienti affetti da MP sporadico. Infatti, tali pazienti presentavano: bradicinesia, rigidità, tremore, instabilità posturale e una buona risposta alla levodopa. Il gene localizzato a livello del locus PARK8 consta di 51 esoni codificanti una proteina di 2527 aminoacidi (circa 285 kD) denominata “leucine ricche di chinasi 2” (LRRK2) o “dardarina” (dal Basco “dardara”, tremore). Le mutazioni in LRRK2, che agiscono anche in modo autosomico-dominante, sono le più frequenti nella MP (Lill, 2016). In LRRK2 (Asn1437His, Arg1441Cys/Gly/His, Tyr1699Cys, Gly2019Ser, Ile2020Thr) (Lill, 2016) sono state descritte almeno sei mutazioni patogene altamente penetranti, tra le quali la mutazione più comune, Gly2019Ser (rs34637584) frequenza del vettore del 4% in familiari e 1% nei pazienti "MP sporadici" (cioè nei pazienti che non hanno una storia familiare di MP) (Lill, 2016). È interessante notare che la frequenza della mutazione Gly2019Ser varia sostanzialmente tra le popolazioni con le stime più elevate riportate per gli arabi nord africani (familiari 36%, sporadici 39%) e pazienti ebrei Ashkenazi (familiare 28%, sporadici 10%) mentre la frequenza più bassa è stata riscontrata nei paesi asiatici 0,1% (Lill, 2016). Funzionalmente, gli esperimenti di sovraespressione in vitro suggeriscono che le mutazioni LRRK2 altamente penetranti possono esercitare il loro effetto attraverso un aumento tossico della funzione, probabilmente a causa di un aumento dell'attività di autofosforilazione/chinasi (Lill, 2016).

La proteina presenta numerosi domini ben conservati, tra questi ricordiamo:

- dominio LRR: dominio ricco di leucine
- dominio ROC: dominio GTPasico di Ras
- dominio COR: dominio C-terminale di Ras

- dominio Chinasico
- dominio WD40

Sia il dominio GTPasico che il chinasico sono funzionalmente attivi.

La proteina LRRK2 è espressa in modo ubiquitario con maggiori concentrazioni a livello renale e polmonare. Per quanto riguarda il SNC, sembra essere presente in concentrazione assai modesta nei neuroni dopaminergici della sostanza nera, ma in elevata concentrazione a livello striatale. LRRK2 sembra essere localizzata a livello citoplasmatico ed è anche associata alle membrane di diversi organelli tra i quali: mitocondri, apparato di Golgi e vescicole sinaptiche (Cirnaru et al., 2014). L'interessamento preferenziale della parte centrale del gene lascia intendere che l'attività enzimatica di LRRK2 giochi un ruolo importante nella patogenesi della malattia.

1.2.2 Mutazioni a carico del dominio chinasico

Sono state individuate due possibili mutazioni in questo dominio: la G2019S e la I2020T. Associata alla MP la mutazione più comune è la G2019S e ha una frequenza dell'1% nei pazienti con Parkinson sporadico e del 4% con forma ereditaria. Tra i pazienti che presentano mutazioni a carico di LRRK2, l'85% ha la mutazione G2019S. Il rischio di sviluppare la malattia in una persona con tale mutazione cresce con l'età. Si va dal 28% a 59 anni fino al 74% a 79 anni. Alla mutazione G2019S corrisponde un aumento dell'attività chinasica della proteina. Numerosi studi sono stati condotti per individuare i substrati del dominio chinasico di LRRK2 con l'intento di individuare il possibile meccanismo patogenetico sotteso allo sviluppo della MP. Tra i substrati individuati, la proteina Moesina, appartenente alla famiglia ERM (ezrin, radixin and moesin), coinvolta fisiologicamente nell'ancoraggio del citoscheletro alla membrana citoplasmatica, è stata individuata come possibile bersaglio dell'attività chinasica di LRRK2. Infatti, è stato dimostrato un aumento di ERM-fosforilate in neuroni in coltura di topi transgenici G2019S che determinerebbe un ritardo di crescita neuronale.

Altro possibile substrato è la β -tubulina che suggerisce ancora un ruolo di LRRK2 nella regolazione della stabilità citoscheletrica. Anche la fosforilazione della proteina legante il fattore d'iniziazione eucariotico 4E (4E-BP) sarebbe determinato

da LRRK2, andando a prevenire il legame inibitorio di questa con eIF4E con successiva attivazione della traduzione proteica e aumento della tossicità nei neuroni dopaminergici indotta dallo stress ossidativo. L'interazione con proteine della famiglia MAPKK, in particolare MKK3, 4, 6 e 7, suggerisce che il dominio chinasi possa funzionare con meccanismo Ser/Thr chinasi, come una MAPKKK. La struttura dimerica della proteina LRRK2 suggerisce, oltre che un ruolo di regolazione intracellulare mediante l'interazione con altre proteine, anche una possibile autoregolazione, attraverso un meccanismo di auto-fosforilazione.

Come precedentemente menzionato, LRRK2 regola il processo patogenetico di malattia in modo età-dipendente ed è interessante notare come soggetti con mutazione congenita sviluppino malattia dall'età di 50-60 anni. I meccanismi molecolari sottesi a questo fenomeno non sono ancora noti. Un'ipotesi che è stata avanzata riguarda il possibile coinvolgimento di mTOR nella cascata patogenetica. mTOR è coinvolto sia nei processi di sintesi proteica ed autofagia, mostrando dei cambiamenti età-dipendenti, sia nel processo d'invecchiamento, mostrando un aumento della durata di vita in seguito alla sua inibizione con rapamicina o delezione di alcune sue componenti. Poiché uno dei target di mTOR è la proteina 4E-BP, attraverso questa connessione, si potrebbe spiegare il nesso tra LRRK2 e l'invecchiamento ma per ora resta solo un'ipotesi in attesa di ulteriori conferme.

Il dominio chinasi della proteina sembra giocare un ruolo fondamentale anche nella regolazione del rilascio delle vescicole sinaptiche. LRRK2 sarebbe responsabile, mediante un complesso meccanismo d'interazione proteina-proteina che vede il coinvolgimento anche della sinapsina I e del citoscheletro, del reclutamento delle vescicole al versante pre-sinaptico e la successiva liberazione. Ciò è stato dimostrato con esperimenti che, andando a inibire la chinasi di LRRK2, hanno dimostrato una diminuzione della frequenza delle correnti sinaptiche spontanee, del traffico vescicolare sinaptico e del rilascio dei neurotrasmettitori (Cinraru et al., 2014).

1.2.3 Mutazioni a carico del dominio GTPasico

Il dominio GTPasico di LRRK2 può presentarsi in forma attiva, legante GTP, e in forma inattiva quando lega GDP. Le mutazioni a suo carico, in particolare la

R1441C, hanno mostrato una diminuzione dell'attività di idrolisi del GTP con conseguente aumento della permanenza dell'enzima nella forma attivata. Ad oggi pare che l'attività del dominio GTPasico non sia un requisito necessario per il funzionamento del dominio chinasico ma, al contrario, sia il dominio chinasico che vada a fosforilare il dominio GTPasico. Per questo si attribuisce al dominio chinasico la capacità di regolare l'intera attività di LRRK2.

Le potenziali interazioni proteiche di LRRK2 sono state suddivise (Dachsel et al., 2007) in tre grandi gruppi principali:

- proteine correlate alla risposta chaperon mediata
- proteine implicate nel traffico intracellulare e nella stabilità del citoscheletro
- proteine con attività chinasica

Tra queste ricordiamo:

-la α/β -tubulina che, oltre ad essere un substrato della chinasi, ha anche un'interazione con il dominio GTPasico.

-la Hsp90 (heat shock protein 90) che, quando inibita, non interagisce con LRRK2 e promuove la degradazione proteasomica di LRRK2.

-la CHIP (carboxyl terminus of Hsp-70-interacting protein) che, mediante l'ubiquitinazione, promuove la degradazione di LRRK2 sempre attraverso il proteasoma.

Sono state anche descritte interazioni tra queste proteine. In particolare, Hsp90 attenuerebbe la degradazione di LRRK2 mediata da CHIP andando a configurare un importante meccanismo di regolazione dell'espressione di LRRK2.

-la FADD (Fas-associated protein with death domain), proteina critica nell'attivazione dell'apoptosi, che interagendo con LRRK2 potrebbe collegare la degenerazione neuronale LRRK2 mediata e l'apoptosi.

-la DVL1-3 (dishevelled family), proteina chiave della via di segnalazione Wnt, che farebbe pensare ad un ruolo di LRRK2 nella regolazione delle vie trasduzionali che portano alla crescita assonale, alla formazione sinaptica e al mantenimento neuronale.

Particolarmente interessante è l'interazione che sembra esistere tra LRRK2 e le altre proteine coinvolte nella patogenesi delle forme monogeniche di Parkinson, in particolar modo con l' α -Syn, PINK-1 e DJ-1.

La maggior parte dei pazienti parkinsoniani con LRRK2 mutato sottoposti ad autopsia hanno mostrato inclusioni di α -Syn, suggerendo una via patogenetica comune tra LRRK2 e α -Syn (Dawson et al., 2010). Per supportare quest'ipotesi sono stati creati modelli di topi che presentavano sia la mutazione di LRRK2 sia di SNCA ed è stato osservato un aumento di deposizione di α -Syn rispetto a quanto avveniva nei topi che presentavano la sola mutazione di PARK1. Sono comunque necessari altri studi per chiarire tale meccanismo, ancora non ben definito.

In conclusione, numerosi studi sono stati condotti per studiare la proteina LRRK2 sia in condizioni wild type, sia in presenza di mutazioni da cui si evidenzia che l'over-espressione del gene LRRK2 wild-type si associa ad alterazioni a carico di: trasporto vescicolare, maturazione degli endosomi, crescita assonale e neuritica, trasmissione sinaptica, aggregazione proteica e aumento dei ROS intracellulari con conseguente morte cellulare indotta dallo stress ossidativo. L'over-espressione di LRRK2 mutato, specialmente con mutazione G2019S, determina un aggravarsi dei fenomeni sopra elencati mentre, modelli che presentano inattivazione del dominio chinasi di LRRK2, determinano l'abolizione di tali fenomeni suggerendo che un ruolo cruciale nello sviluppo della patologia è da attribuire al dominio chinasi (Seol, 2010) (Cookson, 2010) (figura 5).

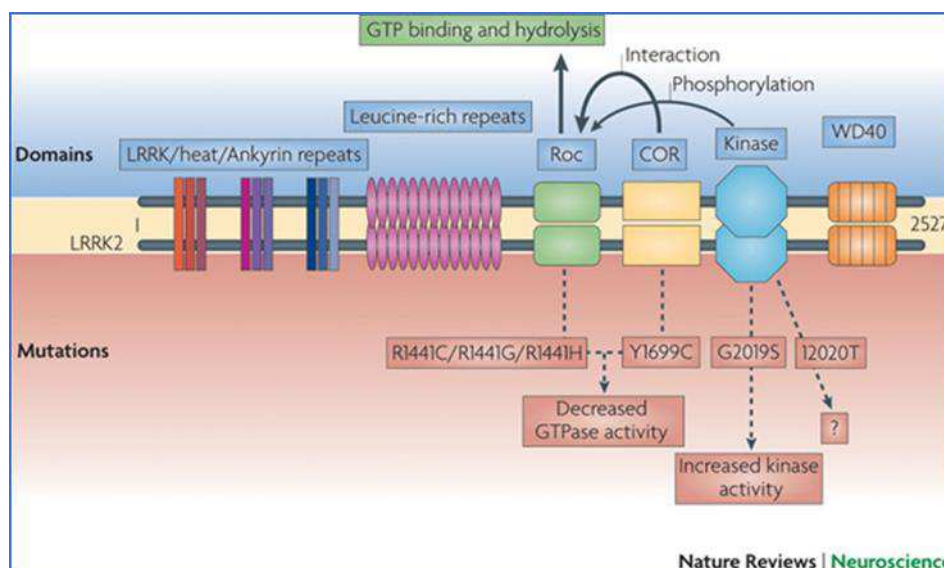


Figura 5 Ruolo della leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) nella MP, M.R. Cookson et al., 2010

1.3 Il ruolo del mitocondrio

Un ruolo chiave nella patogenesi della malattia di Parkinson è rivestito dal mitocondrio.

La prima anomalia che venne rilevata nei neuroni della substantia nigra di pazienti parkinsoniani è stato un deficit a carico del Complesso I della catena respiratoria mitocondriale. Questo modello trova riscontro nelle evidenze che l'inibizione dell'attività mitocondriale mediante l'1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), può causare acuti e irreversibili sintomi parkinsoniani nell'uomo. e alcuni studi lo hanno evidenziato sia nei topi che nei primati non umani (Trancikova et al., 2011). L'inibizione del complesso I e l'ostruzione del normale trasferimento di elettroni può portare ad una maggiore generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di riduzione della produzione di ATP. Ulteriori tossine mitocondriali (vale a dire rotenone, paraquat/maneb) sono stati descritti in seguito per indurre la perdita neuronale selettiva e l'aggregazione proteica simile a MPTP nei roditori (Trancikova et al., 2011). Modelli animali basati sulle tossine sono ampiamente usati per indurre acute e croniche perdite neuronali dopaminergiche, per studiare i mitocondriali, e i percorsi che potenzialmente portano a MP (Trancikova et al., 2011). Anche se il contributo delle tossine mitocondriali al rischio di MP non è chiaro, i modelli animali basati su queste tossine forniscono prova convincente che i neuroni dopaminergici sono selettivamente vulnerabili ad attività mitocondriale compromessa (Trancikova et al., 2011). In particolare, la somministrazione sistemica di ROT, un inibitore specifico del Complesso I, induce cambiamenti neuronali e comportamentali nei ratti trattati del tutto simili a quelli riscontrati nei malati di Parkinson. In aggiunta, l'aumento dello stress ossidativo nei neuroni è stato associato alla neurodegenerazione tipica della MP.

Anche alterazioni a carico di chinasi mitocondriali, della proteina chaperone mortalina/GRP75/mtHSP70 e dell' α -chetoglutarato sono state individuate nei neuroni dopaminergici di pazienti parkinsoniani sottoposti ad autopsia, suggerendo che la funzione mitocondriale possa essere molto compromessa nella MP.

Inoltre, l'identificazione di forme monogeniche di Parkinson ha sottolineato ulteriormente il ruolo critico giocato dal mitocondrio nella patogenesi. Mutazioni sono state individuate sia in geni codificanti proteine mitocondriali, sia in proteine

coinvolte nella funzionalità mitocondriale, nella risposta allo stress ossidativo e nella degradazione dei mitocondri danneggiati. I geni maggiormente coinvolti sono PINK1, DJ-1, PARK1, PARK2 e LRRK2.

Numerosi studi hanno dimostrato che mutazioni a carico del gene della Parkina determinano una profonda alterazione dell'omeostasi mitocondriale, nonostante tale proteina non sia localizzata primariamente a livello di tale organello. Quest'ultima osservazione lascia intendere che la proteina faccia parte di un ben più complesso meccanismo finalizzato al mantenimento della funzionalità mitocondriale. Tra i principali effetti osservati in seguito a mutazione di PARK2 ricordiamo: aumentata sensibilità allo stress ossidativo, vacuolizzazione mitocondriale, degenerazione delle membrane, anomalie morfologiche, alterazioni della catena respiratoria e aumentata sensibilità all'effetto tossico del rotenone sulla catena mitocondriale. La Parkina giocherebbe anche un ruolo nel turnover dei mitocondri danneggiati andando a mediare una distruzione attraverso i lisosomi.

PINK1 ha come target la proteina TRAP1 (TNF-receptor-associated protein 1) che è presente a livello dello spazio intermembrana mitocondriale. TRAP1, fosforilata da PINK1, previene lo stress ossidativo indotto dal rilascio di citocromo c e dall'apoptosi. La mutazione di PINK1 determina la riduzione della capacità di fosforilazione di TRAP1 con conseguente diminuzione della sopravvivenza cellulare. Inoltre, PINK1 e parkina sembrano essere tra loro funzionalmente correlate. PINK1 andrebbe a controllare la localizzazione mitocondriale della Parkina attraverso la fosforilazione della treonina in posizione 175. In studi cellulari si è osservato che la localizzazione della Parkina è prevalentemente citoplasmatica, quando espressa da sola, mentre viene redistribuita all'interno dei mitocondri, quando co-espressa con PINK1. Tale redistribuzione non avviene nel caso in cui la porzione chinastica di PINK1 è inattiva, dimostrando che sia la fosforilazione della Parkina il fattore necessario per la traslocazione.

Altra proteina coinvolta nelle dinamiche mitocondriali è la DJ-1. In condizioni basali è localizzata a livello citoplasmatico ma, in seguito ad aumento dello stress ossidativo, trasloca all'interno dei mitocondri e successivamente nel nucleo esercitando il suo compito di neuroprotezione. La mutazione con perdita di funzione di DJ-1 non è sufficiente da sola a indurre morte neuronale ma, se a questa

si associa somministrazione di MPTP, allora la degenerazione a carico dei neuroni dopaminergici della sostanza nera si verifica. Altro possibile target di DJ-1 è la catena respiratoria, in particolare il Complesso I. Si è dimostrato che mutazioni determinanti perdita di funzione di DJ-1 si associano ad aumentata sensibilità cellulare nei confronti degli inibitori selettivi del Complesso I. Infine, DJ-1 preverrebbe l'aggregazione e la conseguente tossicità dell' α -Syn, in modo ossidazione-dipendente. Tale quadro lascia intendere una cooperazione a più livelli tra le suddette proteine nel mantenimento dell'integrità mitocondriale.

Anche per l' α -Syn è stato ipotizzato un ruolo nell'omeostasi mitocondriale. In particolare, le protofibrille, formate dall'aggregazione di tale proteina, sarebbero responsabili della formazione di pori a livello delle membrane cellulari anche interne, come quelle dei mitocondri e delle vescicole sinaptiche determinando un effetto tossico. Inoltre, in numerosi modelli di topi con mutazioni indotte di PARK1, sono state individuate numerose anomalie tra cui: degenerazione di mitocondri contenenti α -Syn, riduzione dell'attività del Complesso IV, danno al DNA mitocondriale e aumento della sensibilità all'esposizione con MPTP. È stata anche vista una maggiore affinità di legame tra l' α -Syn e il Complesso I della catena mitocondriale nei soggetti con MP confrontati con soggetti sani, suggerendo che l'accumulo mitocondriale della proteina possa contribuire al deficit del Complesso I. I meccanismi di neurotossicità mediati dall' α -Syn potrebbero agire sia a livello dell'aumentato uptake di MPP⁺ all'interno dei neuroni dopaminergici e dell'alterazione del traffico di vescicole sinaptiche, sia a valle, andando a stimolare la sintesi mitocondriale di NO e l'aggregazione proteica a seguito della cronica inibizione del Complesso I (Van Laar and Berman, 2009) (Bueler, 2009).

Negli ultimi anni numerosissimi studi sono stati portati avanti per capire le funzioni della proteina LRRK2 e il suo eventuale rapporto con le dinamiche mitocondriali. LRRK è stata localizzata anche a livello della membrana esterna mitocondriale. Alcune osservazioni fatte su fibroblasti umani derivanti da pazienti parkinsoniani con mutazione G2019S, che presentavano diminuzione della funzionalità mitocondriale e anomalie morfologiche, hanno portato ad ipotizzare che LRRK2 abbia un ruolo cruciale nello sviluppo di anomalie mitocondriali in corso di patologia. Inoltre, l'osservazione che la morte neuronale, provocata da mutazioni a

carico della proteina, potesse essere bloccata da inibitori delle caspasi in presenza di Apaf1, suggerì che la mutazione di LRRK2 causava apoptosi nei neuroni dopaminergici in modo mitocondrio-dipendente.

Particolarmente interessante è l'interazione che sembra verificarsi tra la proteina LRRK2 e DLP1 (dynamamin-like-protein1). Quest'ultima è essenziale per lo sviluppo e il mantenimento della morfologia mitocondriale e per una normale distribuzione degli organelli. In particolare, DLP1 svolge un ruolo cruciale nella duplicazione dei mitocondri e una sua over-espressione porterebbe a un'alterata omeostasi mitocondriale con conseguente frammentazione.

LRRK2, per interazione diretta, aumenterebbe la concentrazione di DLP1 determinando alterazioni delle attività mitocondriali.

Tale fenomeno sarebbe notevolmente aumentato nei geni LRRK2 presentanti mutazione G2019S (che, ricordiamo, determina aumento dell'attività chinasi della proteina). È importante sottolineare come lo stesso fenomeno non si verifica se il dominio chinasi di LRRK2 è inattivo, ribadendo ancora il ruolo chiave di tale dominio (Bueler, 2009).

Un ulteriore meccanismo che determina un danno mitocondriale LRRK2-dipendente è quello mediato dalle proteine uncoupling protein 2 and 4 (UCP2 e 4). In particolare, la mutazione G2019S, mediante l'interazione con la subunità chinasi, andrebbe ad aumentare la concentrazione di tali proteine. Le UCPs sono una famiglia di proteine, localizzate a livello della membrana mitocondriale interna, deputate a regolare la permeabilità mitocondriale ai protoni. Il loro aumento determinerebbe disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa con tre principali conseguenze: una diminuzione del potenziale di membrana del mitocondrio, un aumento dell'utilizzazione di ossigeno e la diminuzione della produzione di ATP a livello mitocondriale con conseguente diminuzione della concentrazione di ATP in tutta la cellula e successiva compromissione delle funzioni cellulari (Papkovskaia et al., 2012). Uno studio recente ha indagato la relazione esistente tra LRRK2 mutato e l'omeostasi del calcio intracellulare. Dai risultati emersi si evince che la mutazione di LRRK2 determina un deficit nel recupero di calcio in seguito a depolarizzazione cellulare con conseguente aumento della concentrazione intracellulare dello ione calcio. Poiché un'adeguata concentrazione di calcio

rappresenta un requisito fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi mitocondriale, tale aumento andrebbe a determinare un'alterazione della funzionalità di tali organelli che andrebbero in contro a depolarizzazione e, in tempi successivi, a degradazione.

La deplezione e alterazioni dell'attività mitocondriale comporterebbe l'aumento dell'autofagia con conseguente accorciamento dendritico, alterazione tipica dei neuroni dei pazienti parkinsoniani con mutazione LRRK2. Tale meccanismo è stato confermato con l'uso di chelanti e inibitori dei canali L del calcio. I quali sono in grado di ridurre la degradazione mitocondriale e quindi la successiva alterazione morfologica neuronale (Cherra et al., 2012).

1.4 NCX

Nelle cellule neuronali lo scambiatore sodio calcio (NCX) gioca un ruolo fondamentale nel controllo dell'omeostasi del Na^+ e del Ca^{2+} . Esso è presente sia nel plasmalemma che nel mitocondrio (Castaldo et al., 2009). Lo scambiatore Na^+ - Ca^{2+} (NCX) è un antiporto che regola la concentrazione intracellulare degli ioni Na^+ e Ca^{2+} nelle cellule eccitabili. L'entità e la direzione del movimento del Ca^{2+} dipendono dai gradienti di Na^+ e di Ca^{2+} e dal potenziale di membrana. Poiché lo scambio avviene con una stechiometria di $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ il sistema è elettrogenico, e lo scambiatore $\text{Na}^+ \text{Ca}^{2+}$ accoppia l'estrusione di ioni Ca^{2+} all'ingresso di ioni Na^+ nella cellula, secondo il loro gradiente elettrochimico (figura 6). Questo modo di operare è definito "*forward mode*" (Blaustein and Santiago, 1977). Al contrario in differenti condizioni fisiologiche, quando la concentrazione intracellulare di ioni Na^+ aumenta o si ha una depolarizzazione della membrana plasmatica in grado di ridurre il gradiente elettrochimico transmembrana per il Na^+ , lo scambiatore Na^+ - Ca^{2+} media l'estrusione di ione Na^+ e l'ingresso di ioni Ca^{2+} . Questo modo di operare viene definito "*reverse mode*" (Baker and McNaughton, 1976). Regola i cambiamenti di concentrazione ionica del Na^+ e del Ca^{2+} sia in condizioni fisiologiche, come per esempio per la neurotrasmissione o per il rilascio di ormoni, che in stati patofisiologici, come malattie neurodegenerative e stati di ipossia-anossia. Studi morfologici hanno evidenziato che nel CNS sono presenti tre isoforme di NCX e sono: NCX1, NCX2, NCX3 (Papa et al., 2003). NCX1 è

espressa nel cervello ma anche in altri tessuti incluso il cuore, i geni per NCX2 e NCX3 sono stati trovati esclusivamente nel tessuto neuronale e nel muscolo scheletrico. Come menzionato sopra, nella MP la deregolazione di Ca^{2+} sembra giocare un ruolo particolarmente importante. Alcuni studi mostrano come NCX sia coinvolto in questa patologia e giochi un ruolo importante nella disregolazione del calcio in corso di malattia di MP (Ago et al., 2011). Non ci sono però ancora evidenze del coinvolgimento di NCX mitocondriale nella MP.

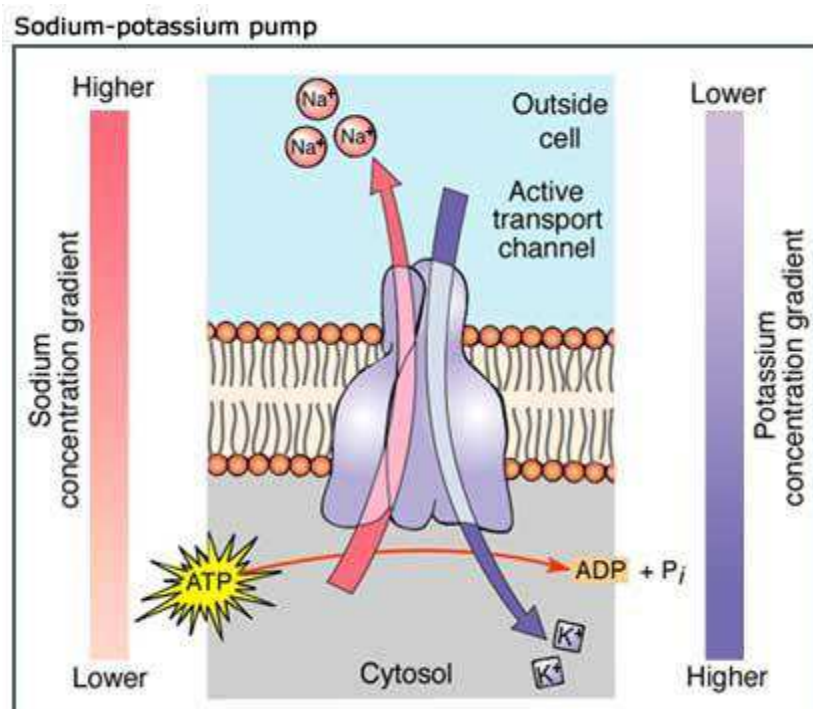


Figura 6 Scambiatore sodio calcio NCX

1.5 Il Modello G2019S

La mutazione G2019S (sostituzione del glutammato con la serina in posizione 2019) è la più studiata in quanto è la più comune e perché, in vivo ed in vitro, determina un aumento dell'attività chinasi di LRRK2 con conseguente tossicità neuronale. Studi condotti con inibitori di LRRK2 hanno mostrato un ruolo protettivo contro la neurodegenerazione LRRK2 G2019S-indotta, facendo così ipotizzare che l'inibizione dell'attività di LRRK2 possa rappresentare un target terapeutico futuro per la MP (Longo et al., 2014).

Sono stati creati per questo numerosi modelli transgenici che esprimono la mutazione G2019S con conseguente iper-attivazione del dominio chinasi. Esperimenti condotti su modelli di colture cellulari, sistemi invertebrati, *Drosophila*, Nematodi, *Caenorhabditis elegans*, topi e ratti knock-out e knock-in hanno contribuito in modo sostanziale alla definizione di alcuni meccanismi patogenetici sottesi a LRRK2 ma ancora molto resta da chiarire. Poiché la mutazione è presente non solo nella forma monogenica ma anche nel 4% di quelle sporadiche con un quadro clinico sovrapponibile tra le due forme, la comprensione delle vie trasduzionali sottese a LRRK2 potrebbe contribuire anche alla comprensione della patogenesi delle forme sporadiche.

2 SCOPO DELLA TESI

La MP è una malattia neurodegenerativa multifattoriale cronica progressiva che colpisce circa l'1% della popolazione oltre i 65 anni e il 5% oltre gli 80 anni. I tratti clinici distintivi che si possono riscontrare sono la bradicinesia, rigidità, tremore e perdita di equilibrio. In questa malattia si osserva una riduzione delle proiezioni dopaminergiche della sostanza nera. Considerato che la *pars compacta* della sostanza nera contiene una considerevole parte dei neuroni dopaminergici cerebrali, questa osservazione suggerisce che la via dopaminergica dalla sostanza nera allo striato sia interessata dall'alterazione patologica che determina la MP. Questa malattia presenta anche inclusioni proteinacee acidofile citoplasmatiche dette corpi di Lewy. Nella maggior parte dei casi (90-95%) la malattia si trasmette in forma sporadica, senza che sia possibile identificare correlazioni con particolari eventi, condizioni o alterazioni genetiche. Esistono però anche forme ereditarie (<10%) in cui sono coinvolti alcuni geni specifici: PARK1 (α -sinucleina), PARK2 (PARKIN), PARK7 (DJ-1), PARK6 (PINK), PARK8 (LRRK2) (Wood-Kaczmar et al., 2012). Un aspetto importante osservato nella MP è la relazione tra la presenza di tali mutazioni e l'alterazione dell'omeostasi mitocondriale tipica della MP (Schapira, 2008). Oltre a fattori genetici anche quelli ambientali, come l'esposizione ad alcune tossine come il ROT o MPTP, possono causare la MP .

Un primo obiettivo della tesi sarà quello di approfondire il meccanismo patogenetico di neurotossicità proprio della MP anche in relazione all'attività mitocondriale nei modelli di topi KI G2019S che determina un aumento dell'attività chinasica di Lrrk2 con conseguente tossicità neuronale. Per questo sarà testata la sensibilità di ceppi KI, confrontati con quelli wild-type, D1994S KD e Lrrk2 KO, al ROT; attraverso esperimenti di elettrofisiologia extracellulare andando a valutare i FP striatali, e sarà poi testato il coinvolgimento del recettore D2 sulla neurotossicità mitocondriale indotta da ROT.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'attivazione del recettore D2 provoca un aumento della concentrazione di Ca^{2+} a livello del terminale post-sinaptico determinando la successiva liberazione di endocannabinoidi. Quest'ultimi, interagendo con il recettore inibitorio CB1 al terminale pre-sinaptico,

determineranno la diminuzione di rilascio del neurotrasmettitore dalle terminazioni glutammatergiche (Calabresi et al., 2014). Altri studi hanno dimostrato una stretta relazione tra l'attivazione del recettore D2 della dopamina post-sinaptico e la diminuzione del rilascio di glutammato pre-sinaptico suggerendo che tale relazione sia mediata dal rilascio di endocannabinoidi. Un ulteriore obiettivo della mia tesi sarà quello di studiare come la mutazione del gene *Lrrk2* G2019S interferisce con tale meccanismo. A questo scopo saranno preparate slices striatali di topi KI G2019S, D1994S KD e *Lrrk2* KO per studiare il meccanismo sotteso al recettore D2. Tali modelli saranno studiati con tecnica di patch clamp whole-cell, per valutare variazioni delle correnti glutammatergiche.

Come già detto in precedenza la MP è una malattia multifattoriale, e un altro fattore molto importante è la presenza di α -Syn. Tale proteina si trova normalmente nelle terminazioni nervose presinaptiche ed in particolari situazioni, come in presenza di modificazioni post-traduzionali (fosforilazione, nitrificazione), viene alterata la sua struttura conformazionale ed aggrega formando oligomeri. Il suo ruolo fisiologico rimane ancora incerto, ma la sua azione citotossica è stata evidenziata in varie linee cellulari neuronali. Uno degli effetti studiati di questa proteina è la sua neurotossicità mitocondriale. Nelle cellule neuronali NCX ha un importante ruolo nel controllo dell'omeostasi di Na^+ e di Ca^{2+} , esso è presente sia nel plasmalemma che nel mitocondrio (Castaldo et al., 2009). Pertanto, un importante obiettivo del presente studio sarà quello di valutare il ruolo svolto da NCX nella eziogenesi della MP. In particolare si valuterà il ruolo che questo trasportatore svolge nelle fasi precoci della malattia, utilizzando un modello *in vitro* di *early* Parkinson. Tale modello si basa sull'esposizione per tempi brevi (1h) di α -Syn e ROT di fettine corticostriatali di ratto. Andremo poi a valutare il coinvolgimento di NCX nell'effetto neurotossico indotto da questo trattamento. La valutazione della neurotossicità sarà effettuata misurando, attraverso esperimenti di elettrofisiologia extracellulare, le correnti che sottendono all'FP che rappresenta un parametro importante per la valutazione del danno neuronale (Costa et al., 2008). Il ruolo specifico di NCX in questo modello di *early* Parkinson sarà valutato utilizzando un bloccante di NCX di membrana l'SN6, e un bloccante di NCX mitocondriale il CGP37157 (Magi et al., 2012). Considerato che NCX regola i livelli di Ca^{2+}

mitocondriali, ulteriori esperimenti saranno condotti per investigare alterazioni nell'attività di NCX mitocondriale ed eventuali variazioni nell'omeostasi del Ca^{2+} . Per effettuare queste valutazioni, come modello sarà utilizzata una linea cellulare di neuroblastoma umano le SH-SY5Y, differenziate per 7 giorni con acido retinoico. Il ruolo di NCX sarà evidenziato dall'utilizzo dell'inibitore mitocondriale CGP37157. I risultati di questo studio rivestono un'enorme importanza in quanto consentirebbero di identificare un nuovo meccanismo coinvolto nella MP che a sua volta potrebbe aprire nuove prospettive per lo sviluppo di terapie innovative.

3 MATERIALI E METODI

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in conformità alla Direttiva del Consiglio della Comunità Europea del Novembre 1986 (86/609/ECC), secondo un protocollo approvato dall'Organismo per il Benessere degli Animali e dal Ministero della Salute. In tutti gli esperimenti sono presi degli accorgimenti per ridurre al minimo la sofferenza degli animali.

3.1 Modello animale

Gli animali utilizzati sono stati sia topi C57Bl/6J che ratti Wistar.

I topi sono stati forniti dal Dipartimento di Scienze Mediche, sezione di farmacologia, dell'Università di Ferrara. Le colonie utilizzate sono composte da topi di sesso maschile di 3-4 mesi di età stabulati presso lo Stabulario Centralizzato dell'Università di Perugia in gabbie mantenute a temperatura costante di 23°C, con libero accesso a cibo ad acqua e sottoposti ad un ciclo luce-buio di 12 ore.

I ceppi murini utilizzati comprendevano:

- topi Knock-In omozigoti per la mutazione G2019S, (KI G2019S)
- topi con background genetico C57Bl/6J knock-In per mutazione inattivante il sito chinasi di LRRK2 (kinase-dead), (D1994S KD)
- topi, con stesso background genetico dei precedenti, Knock-Out per il gene *Lrrk2* (LRRK2 KO)
- topi non transgenici wild-type (WT)

Per quanto riguarda i ratti Wistar sono stati utilizzati ratti maschi di età compresa tra i 2-4 mesi, stabulati presso lo Stabulario Centralizzato dell'Università di Perugia sempre in gabbie mantenute a temperatura costante di 23°C, con libero accesso a cibo ad acqua e sottoposti ad un ciclo luce-buio di 12 ore

3.2 *Culture cellulari*

Le cellule SH-SY5Y (acquistate da American Type Culture Collection), sono mantenute in coltura in piastre petri da 100mm di diametro e coltivate nel mezzo Ham's F-12 Nutrient MIX and Minimum Essential Medium (F12/MEM, ratio 1:1) contenente il 10% siero bovino fetale (FBS; Invitrogen), 1% L-glutamine (200 mM) (Invitrogen), 1% penicillin (Invitrogen), and 1% streptomycin (Invitrogen) (Magi et al., 2012). Le SH-SY5Y sono state poi differenziate per 7 giorni con acido retinoico 10 μ M prima degli esperimenti. Le cellule sono poi mantenute nell'incubatore umidificato a 37°C in 5% CO₂ e 95% di O₂.

3.3 *Preparazione di fettine corticostriatali e procedura di mantenimento in vitro*

Gli animali sono stati anestetizzati con alotano (2-bromo-2cloro1,1,1, trifluoroetano) e successivamente sacrificati per dislocazione cervicale. Il cervello è quindi rimosso rapidamente e immerso in una soluzione di liquido cerebrospinale artificiale (ACSF) mantenuta costantemente satura con una miscela gassosa al 95% di O₂ e 5% di CO₂ a pH 7.4, contenente (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.2 MgCl₂, 2.4 CaCl₂, 10 glucosio e 25 NaHCO₃.

Per studiare il nucleo striato si procede al suo sezionamento mediante vibratomo in fettine coronali dello spessore di 270 μ m per le registrazioni extracellulari e di 220 μ m per le registrazioni di patch clamp.

Le fettine così ottenute vengono poi singolarmente trasferite nella camera di registrazione, immerse nella soluzione ACSF a flusso continuo (2.4-2.5ml/min), mantenuta alla temperatura costante di 32°C e ossigenata con la miscela gassosa descritta precedentemente (Calabresi et al., 1992) (Costa et al., 2008).

3.4 *Modello di early Parkinson*

Per riprodurre un modello *in vitro* di early MP le slices e le cellule sono esposte a α -Syn 3nM and ROT 0,3 μ M. Per modulare l'attività di NCX le cellule e le slices sono preincubate con SN6 10 μ M o CGP37157 3 μ M.

3.5 Elettrofisiologia

3.5.1 Registrazioni elettrofisiologiche extracellulari (field potentials)

Le registrazioni elettrofisiologiche extracellulari sono ottenute mediante un elettrodo registrante costituito da un capillare di vetro borosilicato riempito con una soluzione NaCl 2M, avente resistenza di 15-25 M Ω e collegato ad un amplificatore. I potenziali di campo registrati sono evocati ogni 10 secondi da due elettrodi stimolanti disposti a livello del corpo calloso, così da attivare le fibre cortico-striatali. L'elettrodo registrante è posto in corrispondenza del nucleo striato. L'ampiezza del potenziale di campo registrato è data dalla media delle ampiezze tra il primo picco positivo e il picco negativo e dal picco negativo al positivo successivo. Prima di effettuare le sperimentazioni si attende un periodo di 15-20 minuti per avere una risposta di controllo stabile (Costa et al., 2008). La visualizzazione del potenziale di campo evocato è ottenuta grazie al software Clampex (Axon Instruments, USA). L'elaborazione successiva dei dati è eseguita utilizzando il software Clampfit (Axon Instruments, USA).

3.5.2 Registrazioni con tecnica di patch clamp

Per la tecnica di patch-clamp, i neuroni sono visualizzati usando un contrasto differenziale di interferenza (Nomarski) e microscopia a raggi infrarossi (Olympus).

Le registrazioni sono effettuate in modalità "whole-cell", mantenendo i neuroni al potenziale di -80mV, con un elettrodo di vetro borosilicato avente resistenza di 4-7 M Ω e riempito con soluzione contenente: 145 K⁺-gluconato, 0.1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 0.1 EGTA, 10 HEPES, 0.3 Na⁺-GTP e 2 Mg²⁺-ATP, regolata a pH 7.3 con KOH.

I segnali registrati sono amplificati con amplificatore Multiclamp (Molecular Devices), e memorizzati su computer utilizzando il software pClamp10.

Come resistenza di accesso alla cellula è stato utilizzato il valore di 15-30M Ω (Di Filippo et al., 2014). Le correnti eccitatorie post-sinaptiche (EPSC), registrate a livello dello striato dorsale, sono evocate ogni 10 secondi da due elettrodi collegati ad un'unità di stimolazione (Grass Telefactor, USA).

L'analisi dei dati viene effettuata per mezzo del software Clampfit (Axon Instruments, USA).

3.6 Registrazioni con tecnica amperometrica (CPA)

Le registrazioni con tecnica amperometrica sono state effettuate per misurare il rilascio di dopamina striatale evocato da stimolazione elettrica in slices di modelli murini KI, KD e KO. La tecnica prevede la disposizione di due elettrodi stimolanti a livello del nucleo striato e un elettrodo in fibra di carbonio (World Precision Instruments, CF10), avente diametro di 30 μm e lunghezza di 100 μm , a livello della parte dorsale del nucleo striato ad una profondità di 100-150 μm , in vicinanza degli elettrodi registranti. La misurazione è stata effettuata ad un voltaggio imposto di 0.55V. Per ottenere il voltaggio necessario e per registrare la corrente evocata, gli elettrodi sono stati collegati ad un potenziostato (MicroC, World Precision Instruments). Al termine di ogni esperimento è stata eseguita la calibrazione degli elettrodi in ACSF contenente dopamina alla concentrazione di 10 μM . La stimolazione è stata effettuata mediante singoli impulsi elettrici erogati mediante amplificatore Axoclamp2B ogni 3 minuti. Per la lettura dei segnali registrati e la successiva analisi sono stati utilizzati il sistema di acquisizione Digidata (Digidata 1440) e il software Clampex 10 (Federici et al., 2013).

3.7 Real-time confocal imaging

Analisi del calcio mitocondriale (Ca^{2+} mit). Le SH-SY5Y sono state marcate con 5 mM Rhod-2 AM (Invitrogen) nel mezzo di coltura per 60 min at 37°C. Rhod-2 è stato eccitato a 543 nm e l'emissione fluorescente è stata misurata da 560 nm a 600 nm (Magi S. et al., 2012). Le cellule sono state perfuse con uno standard buffer contenente 140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl_2 , 0.5mM MgCl_2 , 10mM HEPES, and 5.5mM glucose (pH 7.4) per il controllo e con standard buffer più $\alpha\text{-Syn}$ 3nM, CGP-37157 3 μM and ROT 0.3 μM .

3.8 Agenti farmacologici utilizzati

Rotenone (SIGMA-ALDRICH): è un pesticida naturale utilizzato in agricoltura. Presenta alta affinità per uno dei cinque complessi enzimatici localizzati a livello della membrana mitocondriale interna coinvolti nella fosforilazione ossidativa: il Complesso I, di cui è potente inibitore. Vista la sua estrema idrofobicità riesce facilmente a passare le membrane biologiche. Contrariamente a quanto accade per l'MPTP, il ROT riesce a raggiungere il citoplasma cellulare in modo totalmente indipendente dal trasportatore della dopamina (DAT), per questo viene ampiamente utilizzato per indurre un'inibizione sistemica del Complesso I in modelli animali sperimentali.

Poiché una delle ipotesi patogenetiche della MP è rappresentata dall'inibizione di tale complesso, evidenza supportata anche da analisi post-mortem condotte su campioni biologici di pazienti parkinsoniani, l'effetto del ROT su modelli animali è stato studiato sia dal punto di vista dei cambiamenti istologici da questo indotti, sia dal punto di vista delle alterazioni comportamentali in modelli animali in seguito alla sua somministrazione sistemica (Bonsi et al., 2006).

In questo studio l'impiego di tale sostanza, in concentrazione di 0.3 μ M, sarà finalizzato ad indagare una diversa suscettibilità alla tossicità mitocondriale rotenone-mediata dei neuroni striatali di topi LRRK2 KI rispetto a quelli KD, LRRK2 KO e WT.

Quinpirolo (TOCRIS): sostanza dopamino agonista con alta affinità per i recettori D2 e D3 della dopamina. Vista l'alta concentrazione di recettori presenti, il quinpirolo si lega preferenzialmente a livello dei neuroni del nucleo striato, del nucleo accumbens e del tratto olfattorio. E' l'agonista D2 più usato in studi *in vivo* ed *in vitro*. In questo studio, mediante registrazione elettrofisiologica extracellulare, il quinpirolo sarà utilizzato, alla concentrazione di 10 μ M, per valutare l'ipotetico effetto neuroprotettivo esercitato sulla membrana post-sinaptica in seguito a somministrazione di ROT. Inoltre, verrà impiegato per studiare, mediante registrazione con tecnica di patch clamp, le EPSC evocate in topi KI confrontando i dati ottenuti con quelli di topi KD, KO e WT.

AM 251 (TOCRIS): è un antagonista del recettore CB1 degli endocannabinoidi, localizzato a livello delle terminazioni glutammatergiche che proiettano al nucleo striato. L'impiego di 3 μ M dell'AM 251 sarà finalizzato allo studio della variazione degli EPSC in topi KI, KD, KO e WT in seguito a somministrazione di quinpirolo.

GSK (TOCRIS) è un bloccante del sito chinasi LRRK2 1 μ M

WIN (TOCRIS) è un agonista del recettore degli endocannabinoidi CB1 3 μ M.

U73122 (TOCRIS) è un inibitore della fosfolipasi C 10 μ M.

H89 (TOCRIS): è un potente e selettivo inibitore della protein-chinasi cAMP-dipendente PKA. Tale chinasi è coinvolta nella via trasduzionale posta a valle del recettore D2. In particolare, l'attivazione del recettore della dopamina determinerebbe una diminuzione dei livelli di cAMP e conseguente inibizione della PKA. Per dimostrare che è proprio questa via quella coinvolta nella neuroprotezione quinpirolo dipendente, si è andati ad inibire farmacologicamente la chinasi e a studiarne l'effetto con tecnica di registrazione extracellulare.

L'H89 è stato somministrato alla concentrazione di 10 μ M.

Sulpiride (TOCRIS): è un'antagonista del recettore D2 della dopamina ed è stata impiegata in terapia come antidepressivo, antipsicotico e nel trattamento di disturbi gastroenterici. In questo studio la sulpiride, avendo effetto opposto al quinpirolo, verrà utilizzata come controprova della relazione esistente tra stimolazione del D2 e variazione degli EPSC registrati mediante tecnica di patch clamp. Inoltre, mediante tecnica di registrazione extracellulare, verrà impiegata per studiare la variazione del field in seguito a somministrazione di ROT e quinpirolo.

Forskolina (TOCRIS): è un attivatore dell'adenilato ciclasi con effetto ipotensivo e vasodilatatorio. Induce la differenziazione neuronale in cellule staminali e nel neuroblastoma. In questo studio la forskolina (10 μ M) verrà utilizzato come attivatore dell'adenilato ciclasi al fine di studiare il coinvolgimento della via

trasduzionale sottesa al recettore D2, nella neuroprotezione quinpirolo dipendente, in seguito alla somministrazione di ROT. Le registrazioni relative verranno effettuate con tecnica di registrazione extracellulare.

SN6 (TOCRIS): è un bloccante dello scambiatore NCX1 di membrana citoplasmatica (10 μ M)

CGP37157 (TOCRIS): è un bloccante dello scambiatore NCX mitocondriale (3 μ M)

3.9 Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il programma GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Per evidenziare le differenze statisticamente significative dei campioni trattati rispetto ai controlli per le analisi elettrofisiologiche, è stata utilizzata l'analisi statistica condotta con il sistema oneway ANOVA seguita dal test Bonferroni. Il livello di significatività è dato da $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). Per l'analisi del calcio mitocondriale le differenze statisticamente significative dei campioni trattati rispetto ai controlli è stata utilizzata l'analisi statistica condotta con il sistema oneway ANOVA seguita il test di Dunnet's * $P < 0,0001$, # $P < 0,001$.

4 RISULTATI

4.1 *Analisi delle proprietà elettrofisiologiche di base nel modello KI G2019S LRRK2*

Per caratterizzare le proprietà di base dei diversi modelli e per indagare eventuali alterazioni del modello KI G2019S, sono state studiate le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni striatali prendendo in considerazione:

- le proprietà intrinseche di membrana,
- l'attività glutammatergica spontanea,
- il rilascio presinaptico di neurotrasmettitore e
- l'attività dei recettori postsinaptici glutammatergici.

4.1.1 Proprietà intrinseche di membrana

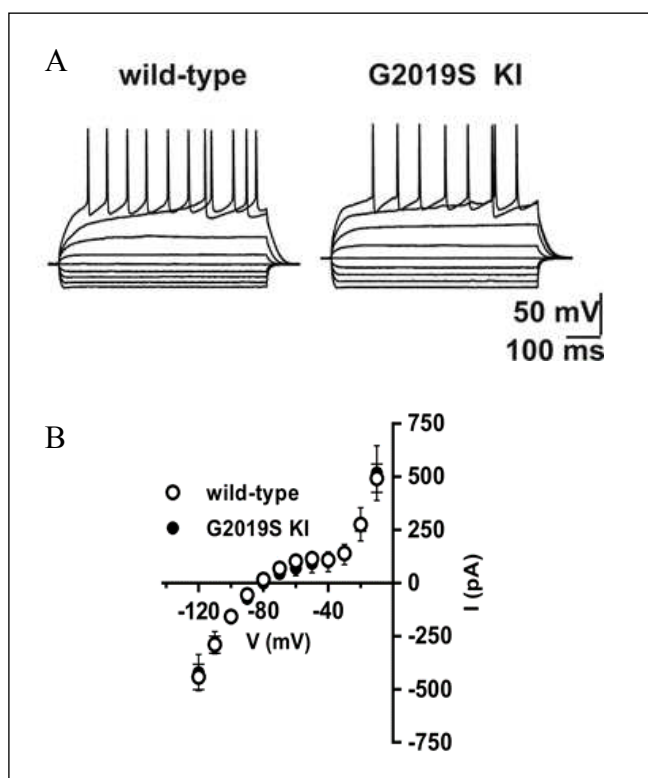


Figura 7 **A**, Proprietà di firing: confronto ceppi WT e KI. **B**, Curve corrente-voltaggio: confronto ceppi WT e KI

Lo studio delle proprietà intrinseche è stato effettuato mediante tecnica di patch-clamp. La figura 7A mostra una marcata somiglianza tra le proprietà di firing nel modello WT e KI, e la figura 7B mostra le curve corrente-voltaggio assolutamente sovrapponibili nei due ceppi murini, (n=9) e di topi G2019S KI (n=9) (WT vs G2019S KI, $P>0.05$). Queste evidenze elettrofisiologiche dimostrano che non sussistono differenze statisticamente significative nelle proprietà intrinseche di membrana nei neuroni spinosi striatali nei modelli KI e WT.

4.1.2 Attività glutammatergica spontanea

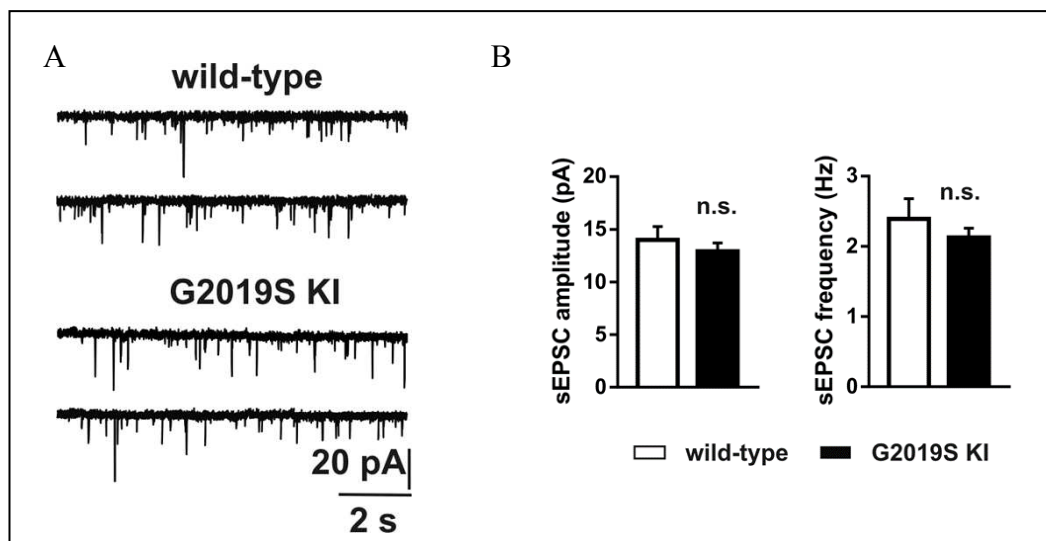


Figura 8 **A**, Traccia sEPSC: confronto KI e WT, **B**, Ampiezza e frequenza sEPSC: confronto KI e WT

Successivamente ho studiato, mediante la medesima tecnica, la trasmissione sinaptica striatale glutammatergica. A questo scopo sono state misurate le correnti postsinaptiche eccitatorie spontanee (sEPSCs) nei neuroni spinosi striatali di topi KI e nei ceppi WT. Le sEPSCs sono state studiate considerando come parametri sia l'ampiezza che la frequenza e, la figura 8A, B mostra che non ci sono differenze statisticamente significative ne' per l'ampiezza WT (n=14) e G2019S KI (n=16) fettine (WT vs G2019S KI, $t(28)=0.756$, $P>0.05$) ne' per la frequenza WT (n=14) and G2019S KI (n=16) mice (WT vs G2019S KI, $t(28)=0.870$, $P>0.05$) tra i ceppi KI e i WT, almeno fino all'età considerata (3-4 mesi).

4.1.3 Rilascio presinaptico di neurotrasmettitore

IL protocollo della paired-pulse facilitation è stato utilizzato per indagare sul rilascio presinaptico del glutammato.

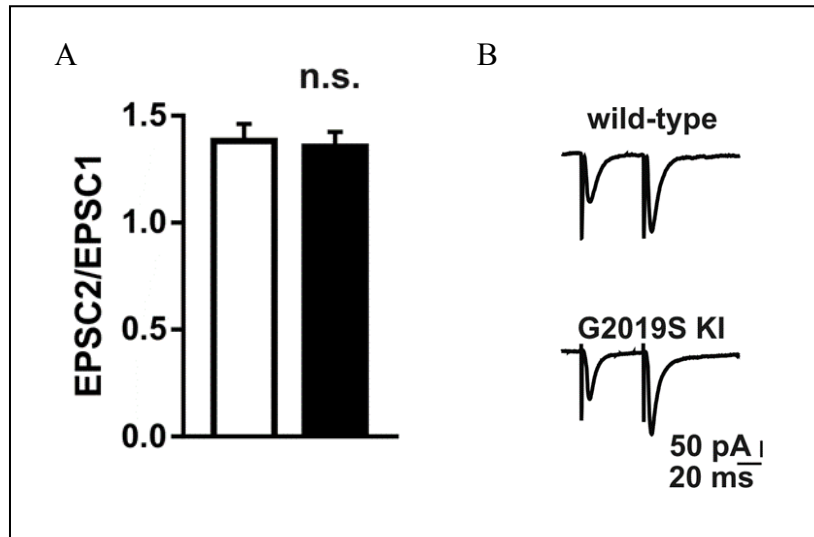


Figura 9 A, Paired-pulse facilitation: confronto EPSC WT e KI, B tracce paired-pulse facilitation.

Come mostrato nella figura 9, in seguito all'analisi delle correnti registrate, abbiamo osservato che non ci sono differenze statisticamente significative tra i WT e i KI, WT (n=9) e G2019S KI (n=7) (WT vs G2019S KI, $t(14)=0.242$, $P>0.05$), lasciando intendere una normale attività di rilascio del neurotrasmettitore presinaptico del modello KI comparata con quella dei ceppi WT.

4.1.4 Attività dei recettori postsinaptici glutamatergici

Per completare lo studio delle proprietà elettrofisiologiche del modello KI ho studiato l'attività dei recettori postsinaptici glutamatergici, considerando il rapporto delle correnti evocate NMDA/AMPA. A questo scopo ho misurato il rapporto tra le correnti glutamatergiche evocate attraverso l'attivazione dei recettori NMDA e AMPA.

La figura 10A, e B dimostra una non differenza statisticamente significativa ($p>0.05$) nell'attività dei recettori postsinaptici glutammatergici nei neuroni spinosi striatali del modello KI rispetto ai WT.

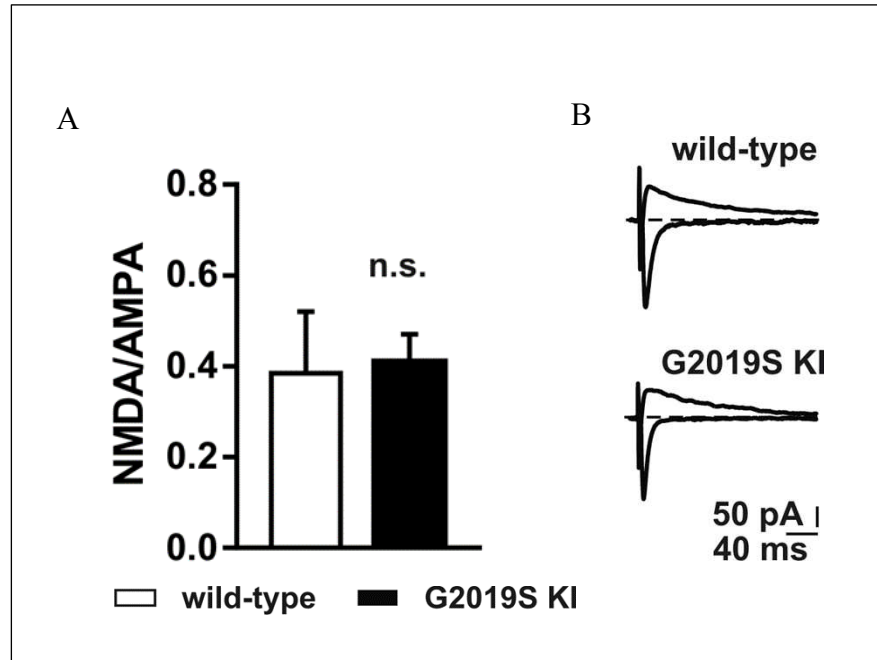


Figura 10 A, Rapporto NMDA/AMPA: confronto KI e WT, B tracce delle correnti NMDA AMPA

In conclusione, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra il KI e il WT per quello che riguarda le proprietà elettrofisiologiche di base WT (n=4) e G2019S KI (n=8) (WT vs G2019S KI, $t_{(10)}=0.186$, $P>0.05$). Si può quindi dedurre che il KI non presenta anomalie di trasmissione sinaptica spontanea o evocata rispetto al ceppo WT.

4.2 Studio del rilascio di dopamina striatale nel modello *LRRK2 G2019S KI, D1994S KD e LRRK2 KO*

Poiché la deplezione dopaminergica rappresenta una delle caratteristiche fisiopatologiche di base della MP, abbiamo studiato per prima cosa la capacità di rilascio di dopamina nel nucleo striato confrontando ceppi KI e ceppi WT. A tale

scopo, mediante tecnica amperometrica a potenziale costante (CPA), si sono rilevati i livelli di dopamina striatale evocata a seguito di stimolazioni elettriche.

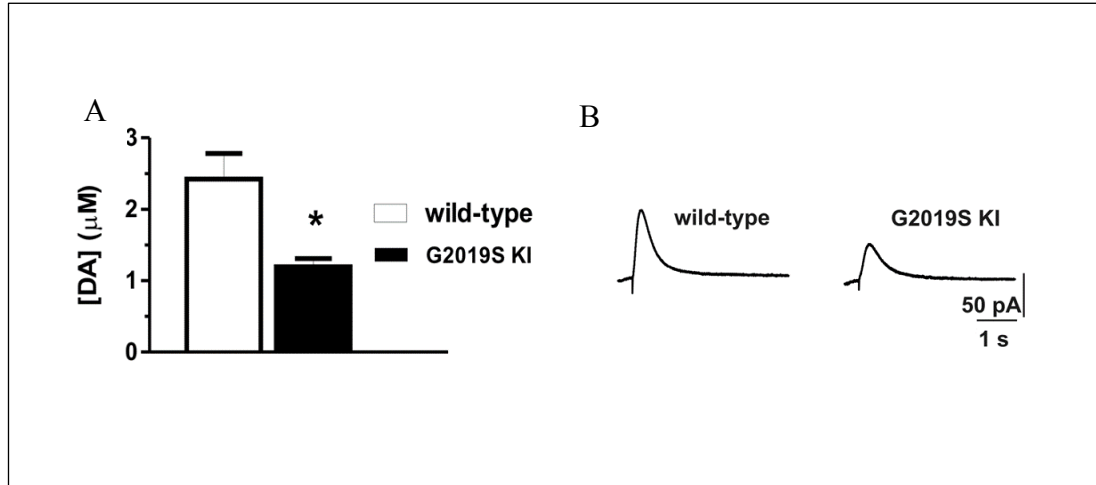


Figura 11 **A**, Livelli di dopamina striatale nel modello KI e nel modello WT. **B**, tracce di correnti evocate con amperometria in topi WT e KI.

Dall'analisi dei dati ottenuti, come mostrato nella figura 11A, e B si evince che il rilascio evocato di dopamina striatale è significativamente ridotto in modelli murini *Lrrk2* G2019S KI, rispetto ai WT ($p < 0.05$). Per questo dimostra che è presente un'alterazione del signaling dopaminergico nel ceppo KI.

Abbiamo poi analizzato i livelli di dopamina anche nel modello KO e KD, per valutare se anche in questi modelli ci fosse un'alterazione del signaling dopaminergico. E i risultati mostrano (figura 12) che non ci sono differenze statisticamente significative tra il modello WT e i modelli KO e KD.

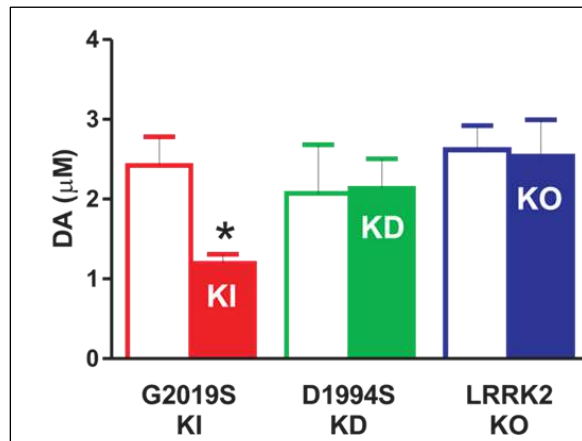


Figura 12 Livelli di dopamina striatale nel modello KI, KD e KO relativi al livello di dopamina WT.

4.3 Studio delle EPSC spontanee ed evocate nel modello LRRK2 KI G2019S, D1994S KD e LRRK2 KO

Oltre alla deplezione dopaminergica, la MP si caratterizza classicamente per un'alterata modulazione dei recettori dopaminergici D2. Per questa ragione ho indagato sulla funzionalità di tali recettori nel modello KI Lrrk2 G2019S ponendolo a confronto con il ceppo WT. A tale scopo è stato utilizzato il quinpirolo, agonista dei recettori dopaminergici di tipo D2, alla concentrazione di 10μM. Ho valutato la variazione delle correnti glutammatergiche spontanee in seguito alla somministrazione dell'agonista D2, prendendo in considerazione due parametri: l'ampiezza e la frequenza. Inizialmente ho analizzato la risposta alla somministrazione del quinpirolo nei ceppi WT e i dati nella figura 13A, e B, mostrano come non ci sono riduzioni delle sEPSCs nei neuroni spinosi striatali WT né in ampiezza (n=3, WT control vs WT quinpirole, $t(2)=1.149$, $P>0.05$), né in frequenza, (n=3, WT control vs WT quinpirole, $t(2)=0.187$, $P>0.05$). successivamente ho utilizzato dei ceppi KI e, in seguito all'applicazione dell'agonista D2, come si evince dalla figura 13C, D, abbiamo registrato una riduzione significativa nelle sEPSCs per quello che riguarda la frequenza, ($31.31\% \pm 5.23$) (n=7, G2019S KI vs G2019S KI quinpirole, $t(6)=5.984$, $P=0.001$), (n=7, G2019S KI vs G2019S KI quinpirole, $t(6)=0.135$, $P>0.05$) ma non l'ampiezza.

Questo tipo di alterazione suggerisce che il quinpirolo inibisce la trasmissione sinaptica glutammatergica con un meccanismo presinaptico.

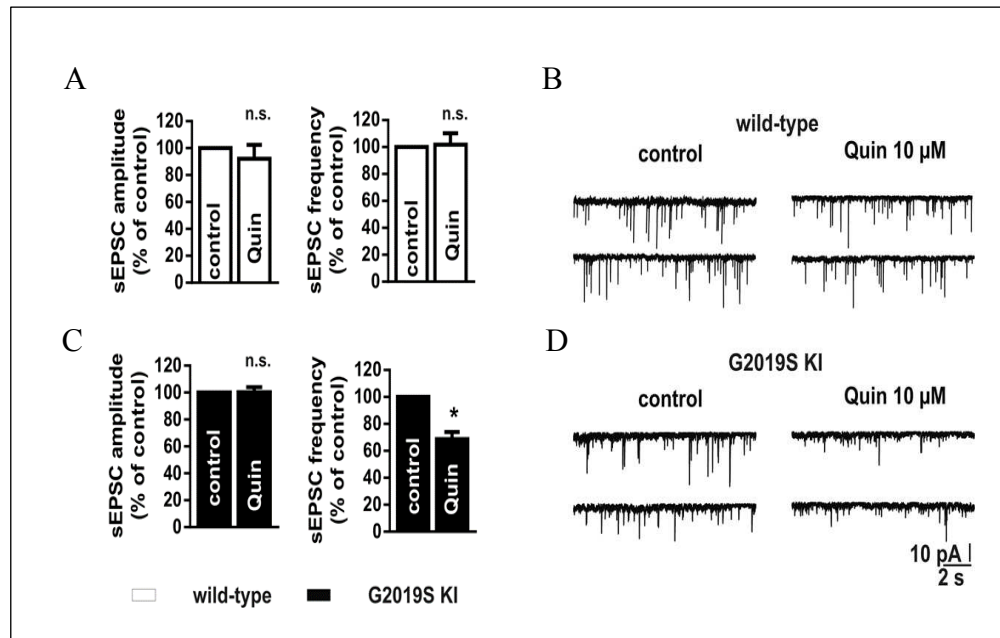


Figura 13 A, Analisi sEPSC in seguito alla somministrazione di quinpirolo: confronto KI e WT, B, Traccia sEPSC: confronto KI e WT

Successivamente sono passata allo studio delle correnti sinaptiche glutammatergiche evocate dei neuroni striatali. Somministrando dosi crescenti di quinpirolo, da 0,1 a 10 μM, ho registrato una modesta riduzione dose dipendente dell'ampiezza degli EPSC fino ad una riduzione massima del 10% nei ceppi WT. Conducendo lo stesso studio sul ceppo KI, e comparando i risultati ottenuti nei due modelli, ho osservato una riduzione statisticamente significativa a partire dalla dose 1 μM nei KI rispetto ai WT, fino ad una riduzione massima del 40% del EPSC per concentrazioni di quinpirolo 10 μM (figura 14) (n=10, ANOVA t(39)=7.560 P<0.001).

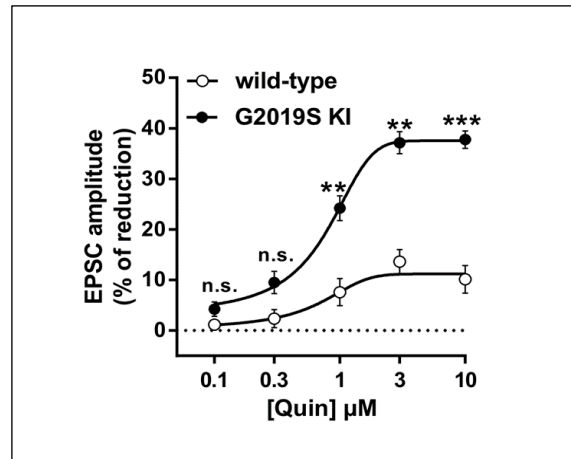


Figura 14 Analisi EPSC in seguito alla somministrazione di quinpirolo: confronto KI e WT

Come si osserva nel modello KI, è presente un'aumentata sensibilità del recettore D2 al quinpirolo rispetto ai WT. Per trovare conferma a quanto osservato ho studiato l'andamento dell'EPSC in seguito alla somministrazione di quinpirolo e successiva sospensione. Inizialmente ho registrato un EPSC di controllo per un lasso di tempo di 10 minuti. Successivamente, al tempo 0, abbiamo somministrato quinpirolo 10μM per 20 minuti. Anche in questo caso si è verificata la riduzione del EPSC registrato di circa il 40% rispetto al valore basale. Infine, ho sospeso la somministrazione dell'agonista D2 (wash). Ciò che ho osservato è un progressivo aumento degli EPSC registrati fino a ripristinare i valori iniziali di controllo (figura 15).

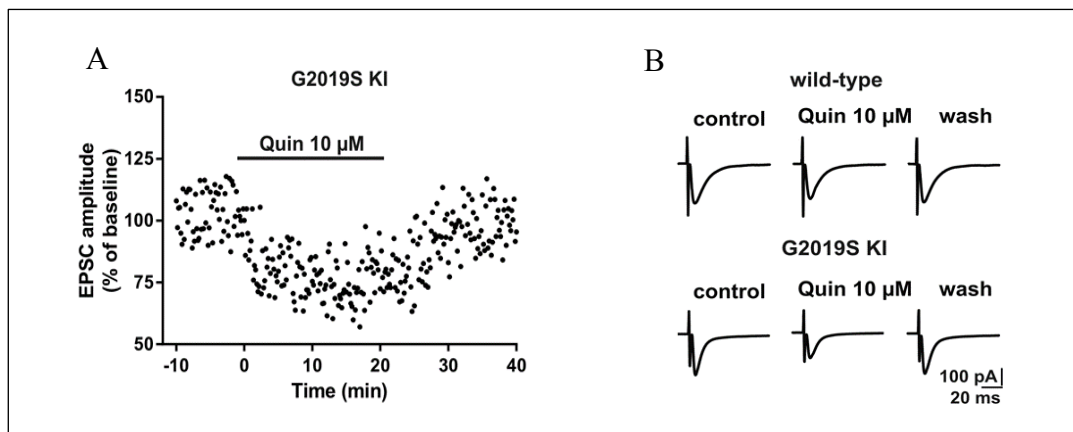


Figura 15 A, Analisi della riduzione degli EPSC in seguito alla somministrazione di quinpirolo e successiva sospensione: confronto KI e WT. B, tracce degli EPSC in seguito alla somministrazione di quinpirolo e successiva sospensione: confronto KI e WT.

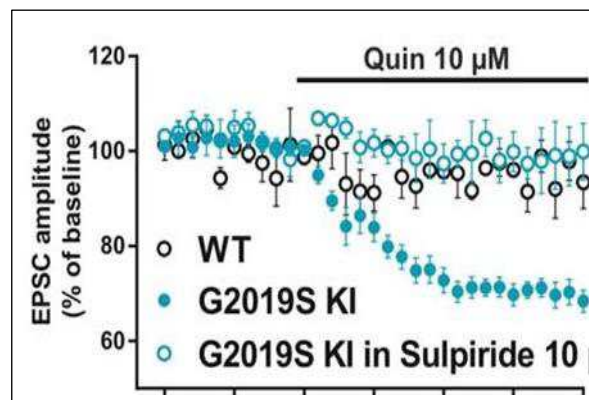


Figura 16 EPSC, quinpirolo mediata, dopo incubazione di sulpiride 10 μ M

Risulta quindi evidente come la riduzione delle correnti sinaptiche glutammatergiche evocate sia strettamente dipendente dalla somministrazione della sostanza in esame. Per accertare la relazione esistente tra stimolazione del recettore D2, mediante quinpirolo, e la riduzione degli EPSC ho utilizzato la sulpiride, un inibitore selettivo del recettore D2, alla concentrazione 10 μ M. Come mostrato nella figura 16 l'incubazione delle fettine striatali, ottenute da topi KI, in presenza di 10 μ M di sulpiride era in grado di prevenire la riduzione dell'EPSC indotta dal quinpirolo, ($1.2\% \pm 5.274$, $n=4$, G2019S KI in Sulpiride pre-quinpirolo vs G2019S KI in Sulpiride post-quinpirolo, paired t-test $t(3)=0.698$, $P>0.05$). Questo esperimento conferma la selettività dell'azione del quinpirolo sui recettori D2.

Poiché diversi tipi di mutazioni Lrrk2 sono noti per essere collegati a MP (Paisan-Ruiz et al., 2004), ho valutato se il quinpirolo esercitava una riduzione di EPSC anche in tali altri genotipi. Di conseguenza, ho registrato EPSC da SPN di animali WT e li ho confrontati con quelli ottenuti da topi con diverse mutazioni di Lrrk2: G2019S KI, D1994S KD e LRRK2 KO. Dopo 10 minuti di registrazione stabile basale degli EPSC da SPNs, è stato applicato il quinpirolo 10 μ M e abbiamo osservato che solo il KI G2019S ha risposto al farmaco con una riduzione significativa del $30,39\% \pm 2,15$, $P < 0,0001$. Infatti, la riduzione dell'ampiezza di EPSC registrata da LRRK2 KO SPNs $7.89\% \pm 3.265$, $P > 0.05$, e da D1994S KD SPNs $4.68\% \pm 3.103$, $n = 6$, D1994S KD, $P > 0.05$, non erano statisticamente significativi rispetto agli animali WT. Questi dati suggeriscono che il quinpirolo presenta una certa selettività di effetto nei KI G2019S (figura 17).

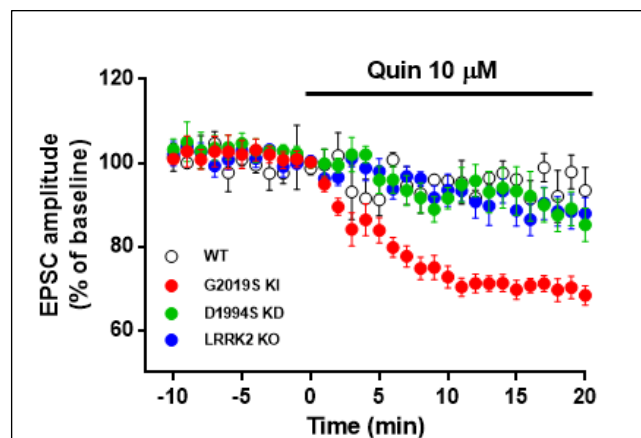


Figura 17 EPSC, quinpirolo mediata, topi G2019S KI, D1994 KD, LRRK2 KO.

Per valutare se i meccanismi alla base di questo effetto sinaptico di quinpirolo fossero correlati all'iperattività del dominio chinasi di Lrrk2 dei topi KI G2019S, ho applicato il quinpirolo per 10 minuti in fettine che erano state incubate con GSK1 μ M, un inibitore del dominio della chinasi di Lrrk2 e ho registrato l'EPSC dagli SPN. La riduzione dell'ampiezza di EPSC mediata dal quinpirolo che abbiamo osservato nel KI di G2019S $30,39\% \pm 2,15$, $P < 0,0001$, non differisce statisticamente da quella registrata dagli SPN di G2019S KI che sono stati incubati con GSK1 μ M $47,66\% \pm 2,108$, $P = 0,0029$ (Figura. 18). Questi risultati mostrano che, sebbene la proteina Lrrk2 sia nota per avere diversi domini funzionali e essere coinvolta in varie funzioni neurali, un uso acuto e transitorio degli inibitori della chinasi non è in grado di impedire al quinpirolo di esercitare la sua riduzione dell'ampiezza di EPSC negli SPN di topi KI G2019S .

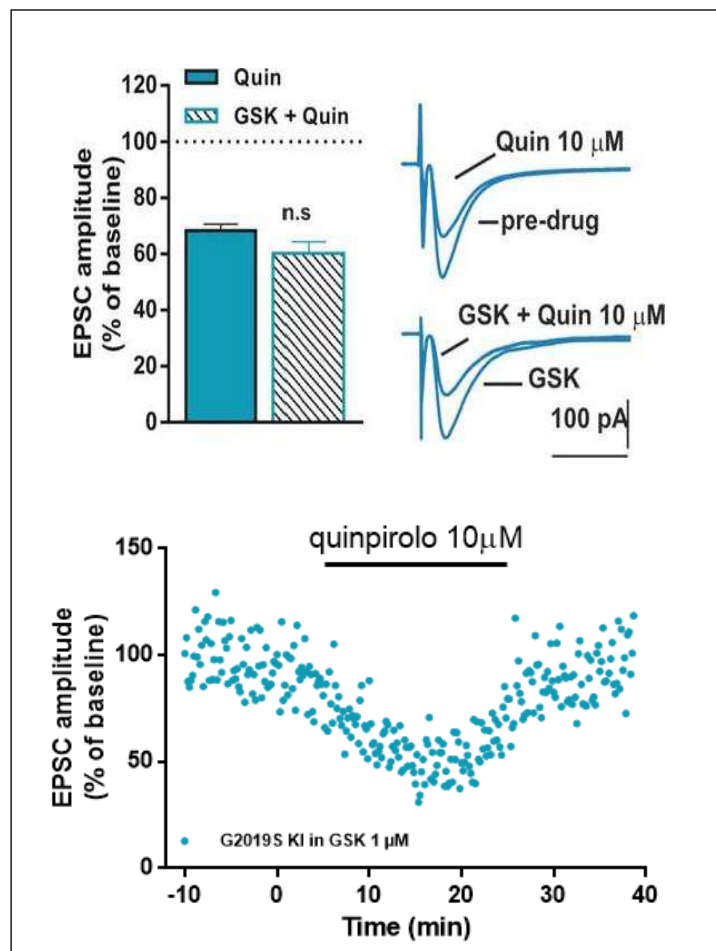


Figura 18 EPSC, quinpirolo mediata, in fettine di topo G2019S incubate un'ora con GSK e in fettine di controllo non incubate.

Avendo accertato il coinvolgimento del recettore D2 nella riduzione quinpirolo dipendente degli EPSCs, sono passata a studiare la via trasduzionale, sottesa al recettore, in grado di determinare l'effetto osservato. Vista la riduzione di trasmissione glutammatergica registrata, ho ipotizzato un meccanismo d'azione modulatorio di tipo presinaptico in cui un recettore inibitorio avesse un ruolo chiave nella modulazione degli EPSCs registrati. Studi precedenti (Calabresi et al., 2014) avevano confermato il ruolo del recettore presinaptico degli endocannabinoidi CB1, nella riduzione del rilascio dal terminale presinaptico del glutammato, quindi siamo andati ad indagare se la via degli endocannabinoidi fosse coinvolta nella riduzione quinpirolo-dipendente degli EPSCs via degli endocannabinoidi. A tale scopo, ho utilizzato l'inibitore del recettore CB1, l'AM 251. Ho quindi incubato le fettine del ceppo WT e del ceppo KI con l'inibitore del recettore CB1 (AM251) alla concentrazione 3 μ M, poi ho somministrato quinpirolo. Come dimostra la figura 19 non risulta alcuna riduzione degli EPSCs, in seguito alla somministrazione dell'agonista D2, nei ceppi KI, (n=7, G2019S KI in AM 3 μ M pre-quinpirolo vs G2019S KI in AM 3 μ M post-quinpirolo, paired t-test $t(6)=0.3605$, $P>0.05$), e i valori registrati risultavano sovrapponibili a quelli dei ceppi WT. In seguito a questa osservazione si è potuto concludere che nei topi KI, l'effetto inibitorio del quinpirolo sulle correnti glutammatergiche è mediato dall'attivazione dei recettori CB1 per gli endocannabinoidi.

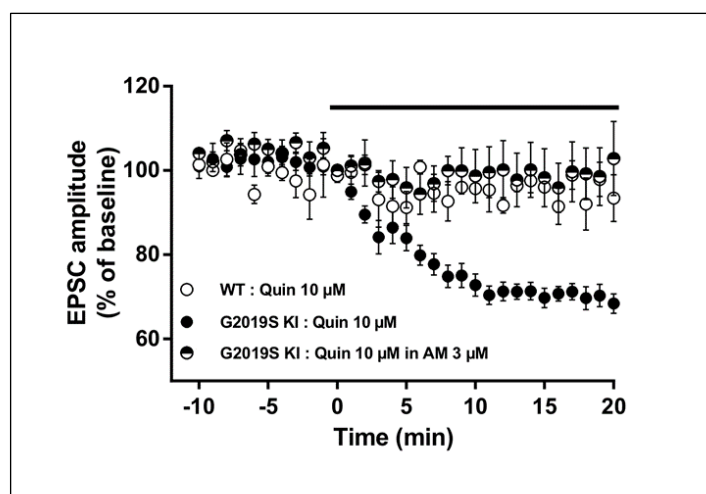


Figura 19 EPSC, quinpirolo mediata, in fettine incubate con AM251

Per valutare inoltre che non ci fosse una possibile funzionalità alterata del recettore CB1 nel nostro modello sperimentale, ho valutato l'ampiezza dell' EPSCs nei neuroni spinosi dei WT e nei KI, prima e dopo l'applicazione dell'agonista del recettore CB1 il WIN alla concentrazione 3 μ M. I nostri dati mostrano una riduzione dell'EPSCs registrate nei neuroni spinosi dei WT perfusi con il WIN (51.07% \pm 3.186, n=4, WT pre-WIN vs WT post-WIN, paired t-test t(3)=15.94, P=0.0005), come nei neuroni del KI (53.94% \pm 7.551, G2019S KI pre-WIN vs G2019S KI post-WIN, paired t-test t(3)=6.425, P=0.0076) suggerendo così una normale funzione nel nostro modello (figura 20).

Il recettore D2 è anche coinvolto nell'attivazione della fosfolipasi C (PLC), che come è noto regola i valori di Ca²⁺ intracellulare. Data l'importanza delle concentrazioni di Ca²⁺ intracellulare per il rilascio dei neurotrasmettitori e il trafficking delle vescicole, ho deciso di andare ad indagare sul ruolo della PLC sull'effetto del quinpirolo nell'ampiezza dell'EPSCs nei KI. Dopo aver preso 10 min di baseline le fettine sono state perfuse con il bloccante della PLC l'U73122, alla concentrazione 10 μ M e successivamente sono state perfuse con quinpirolo 10 10 μ M. E abbiamo potuto osservare che l' U73122 previene l'effetto di riduzione dell'ampiezza dell'EPSC (4.43% \pm 2.088, n=5, G2019S KI in U73122 pre-quinpirolo vs G2019S KI in U73122 post-quinpirolo, paired t-test t(4)=1.625, P>0.05) (figura 21).

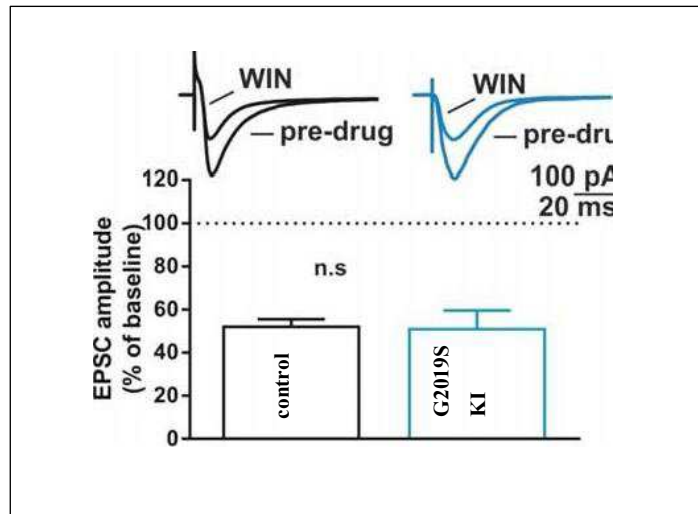


Figura 20 Ampiezza dell' EPSCs nei neuroni spinosi dei WT e KI trattati con WIN

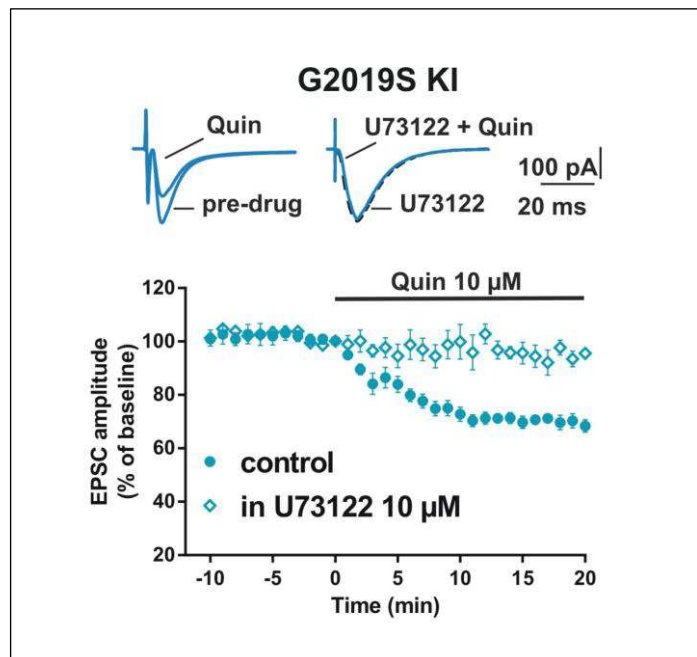


Figura 21 Ampiezza dell' EPSCs nei neuroni spinosi dei KI trattati con U73122 e quinpirolo.

4.4 Studio della tossicità mitocondriale nelle fettine corticostriatali di *LRRK2 KI G2019S*, *D1994S KD*, e *LRRK2 KO*.

Proseguendo nella caratterizzazione del modello *Lrrk2 KI*, ho studiato, con registrazioni extracellulari, la risposta striatale alla somministrazione del ROT, un inibitore del Complesso I della catena respiratoria mitocondriale. Ho utilizzato il ROT al fine di indagare se la mutazione G2019S di *Lrrk2* avesse una maggiore sensibilità al danno mitocondriale rispetto ai topi WT. A questo scopo ho somministrato il ROT alla concentrazione di 0,3 μ M e ho confrontato la variazione dei FP registrati nei ceppi KI e WT.

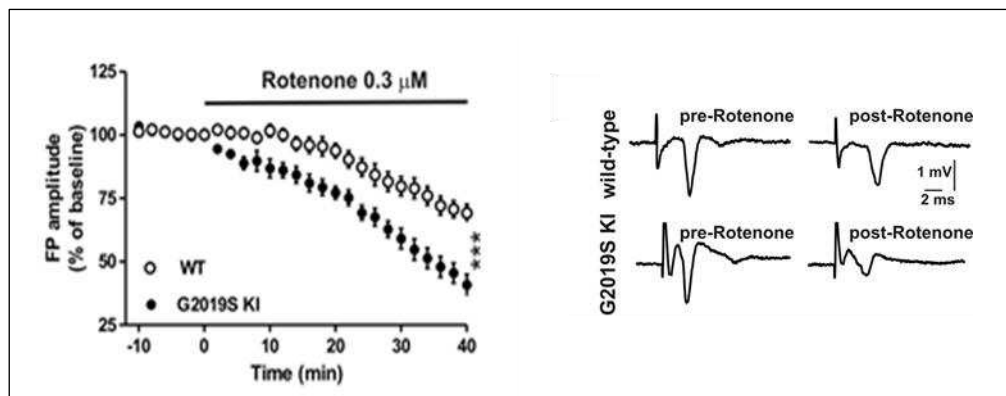


Figura 22 Analisi dei FP in fettine trattate con rotenone in ceppi KI e WT

In seguito all'analisi dei risultati si è evinta una maggiore riduzione dei FP nei ceppi KI rispetto ai WT ($p < 0.001$) (figura 22). Infatti, l'ampiezza dei FP nel modello mutato si riduce di oltre il 50% rispetto al valore base mentre il modello WT non scende al di sotto del 75% della baseline.

Ho ripetuto l'esposizione al ROT 0,3 μ M sia nei ceppi D1994S KD che nei ceppi *Lrrk2 KO*. E come si evince dalla figura 23 il trattamento con il ROT non induce una riduzione dei FP statisticamente significativa rispetto al WT.

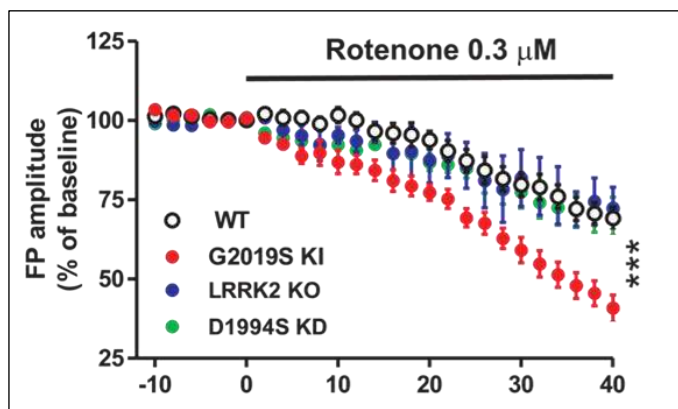


Figura 23 Analisi dei FP in fettine trattate con rotenone in ceppi KI, KD, KO, e WT.

Ho quindi dedotto che la mutazione G2019S conferisce una maggiore sensibilità alla tossicità mitocondriale mediata dal ROT. Avendo precedentemente dimostrato, con tecnica di patch clamp, un'aumentata sensibilità del recettore D2 nel modello KI ho poi indagato se vi fosse una relazione tra i due fenomeni osservati, anche alla luce del fatto che, così come la tossicità mitocondriale svolge un ruolo chiave nella patogenesi della malattia, la stimolazione dopaminergica è, ad oggi, il cardine della terapia medica della MP. A questo scopo, ho incubato le fettine striatali, sia dei ceppi KI che WT, con quinpirolo 10μM e, dopo aver preso un controllo di 20 min, ho perfuso con il ROT 0,3μM .

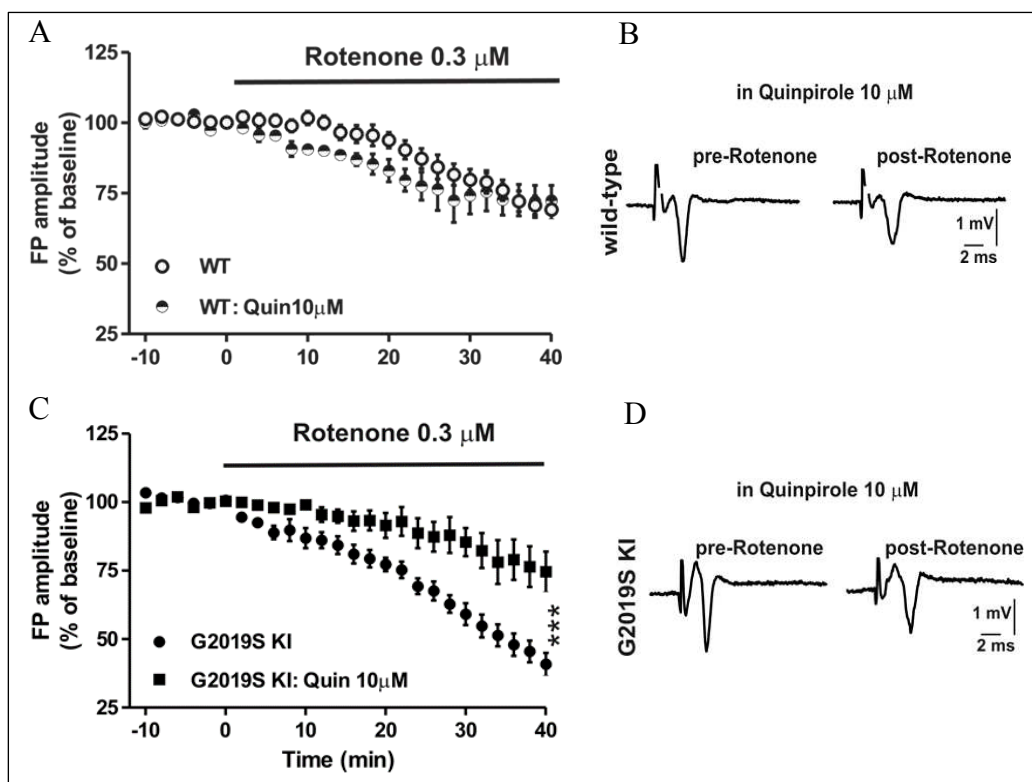


Figura 24 Analisi dei FP, nelle fettine striatali del WT e del KI: dopo sola somministrazione ROT e in seguito a preincubazione con quinpirolo **A, B** FP del WT e relative tracce, **C, D** FP del KI e relative tracce

Dall'analisi dei FP (figura 24A,e B) registrati da fettine di ceppi WT non risulta una differenza statisticamente significativa tra le fettine perfuse con quinpirolo e quelle non trattate, al trattamento con ROT 0,3 μ M. Mentre per quanto riguarda le fettine del G2019S KI (figura 25C, D), l'analisi dei FP ha evidenziato come, il pretrattamento con quinpirolo, riduce l'effetto mediato dal ROT 0,3 μ M, riportandoli ai valori del WT, $P < 0.001$. Da questa evidenza si è dedotto che l'attivazione del recettore dopaminergico D2 svolge un ruolo nella modulazione della tossicità mitocondriale rotenone-mediata. Come conferma, ho poi studiato la variazione dei FP alla somministrazione di un antagonista del recettore D2, la sulpiride. In questo modo, se la neuroprotezione mediata dal quinpirolo dipendesse dall'attivazione del recettore D2, impedendo all'agonista recettoriale di interagire con il proprio substrato, non si dovrebbe osservare alcuna modifica dei potenziali di campo registrati. Ho quindi proceduto alla somministrazione della sulpiride alla concentrazione di 10 μ M.

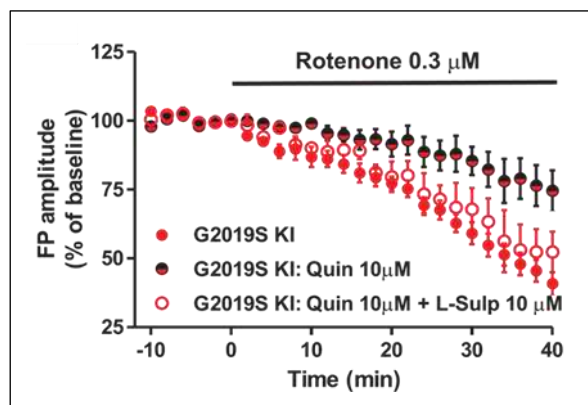


Figura 25 Analisi dei FP, nelle fettine striatali del KI: dopo somministrazione ROT e in seguito a preincubazione con quinpirolo e con quinpirolo e sulpiride.

Dall'analisi dei dati ottenuti, andando ad impedire mediante la sulpiride l'azione del quinpirolo, abbiamo osservato (figura 25) la diminuzione dell'ampiezza dei FP registrati. Poiché l'effetto protettivo del quinpirolo viene antagonizzato, si va a confermare che esso è dipendente dall'attivazione del recettore dopaminergico D2. Sono passata poi a studiare la via trasduzionale sottesa al recettore D2 che andrebbe a prevenire la tossicità mitocondriale da ROT.

Vista la precedente dimostrazione tra stimolazione D2 e attivazione della via degli endocannabinoidi, si è considerata inizialmente l'ipotesi del coinvolgimento della stessa via. L'ipotesi inizialmente formulata prevedeva che l'attivazione del recettore postsinaptico degli endocannabinoidi CB1 svolgesse il ruolo chiave nella prevenzione dell'effetto tossico del ROT. Per questo ho somministrato l'inibitore di tale recettore, l'AM 251. Quindi ho somministrato ROT in fettine trattate con quinpirolo 10µM e in fettine trattate con quinpirolo 10µM e AM 251 alla concentrazione di 3µM.

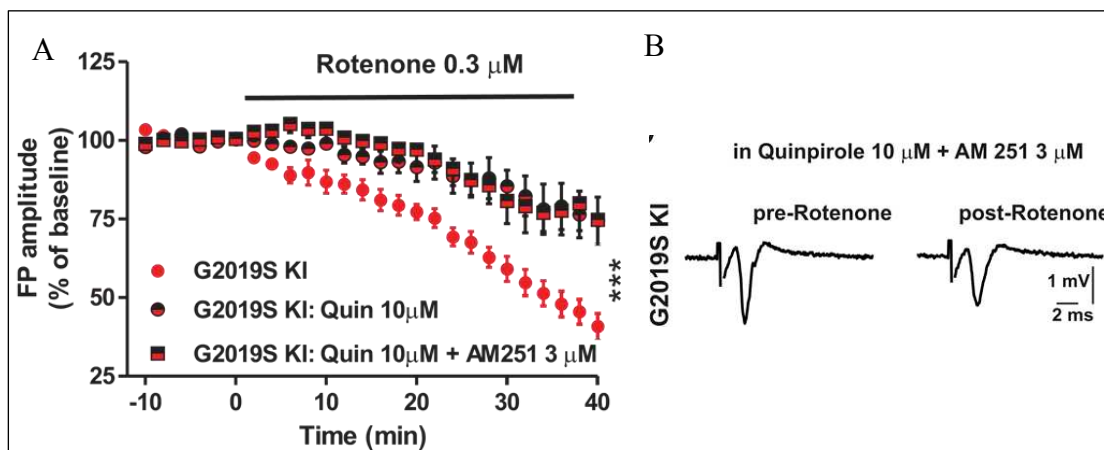


Figura 26 Analisi dei FP: nei ceppi KI dopo somministrazione di solo rotenone, incubati con quinpirolo e con quinpirolo e AM251

In seguito all'analisi dei dati ottenuti (figura 26A, B) è risultato chiaro che la somministrazione dell'inibitore del recettore CB1 non influisce in alcun modo sull'azione del quinpirolo.

Sono quindi passata a considerare un'altra via trasduzionale sottesa al recettore D2: la via enzimatica del cAMP/PKA. Tale via è quella maggiormente coinvolta negli effetti modulatori dell'attivazione del recettore dopaminergico e, per questo, la più studiata. Classicamente si ritiene che il recettore dopaminergico D2 sia associato ad una proteina G inibitoria (Gi) che, andando ad interagire con l'adenilato ciclasi intracellulare, diminuirebbe la concentrazione dell'cAMP. Questo determinerebbe a sua volta una riduzione della funzione della protein chinasi PKA. Se fosse questa la via coinvolta, andando ad inibire la chinasi a valle del recettore si dovrebbe mimare l'effetto del quinpirolo. A questo scopo è stato utilizzato un inibitore della PKA, l'H89, alla concentrazione di 10 μ M. Ciò che si è osservato, come si evince dalla figura 27 è una mancata riduzione dei FP in fettine incubate con H89 dopo somministrazione di ROT 0,3 μ M.

L'effetto esercitato dall'inibitore della PKA mima l'effetto esercitato dall'agonista D2 suggerendo che sia questa la via coinvolta nella neuroprotezione quinpirolo mediata.

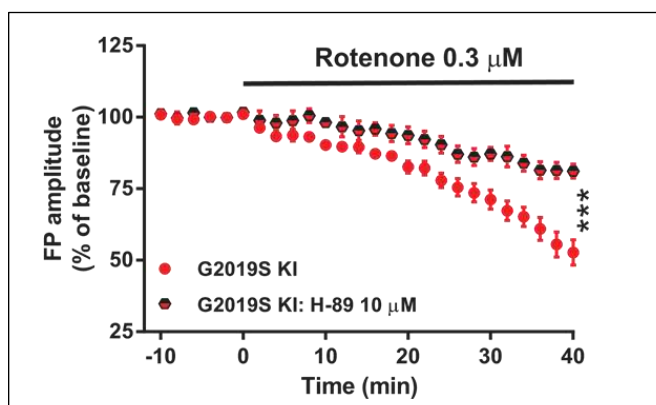


Figura 27 Analisi dei FP nei eppi KI dopo somministrazione di solo rotenone e dopo H89 e rotenone.

Come controprova del ruolo svolto dalla via in esame, ho utilizzato un attivatore del cAMP aspettandosi un effetto opposto a quello esercitato dal quinpirolo e dall'H89. Ho quindi utilizzato la forskolina 10μM. E' stata applicata alle fettine di ceppi sia WT che KI. Mentre nel primo caso ho osservato una riduzione significativa dei FP (effetto peggiorativo), nel secondo caso non è stata rilevata nessuna differenza rispetto all'effetto determinato dal solo ROT 0,3μM (figura 28A, B).

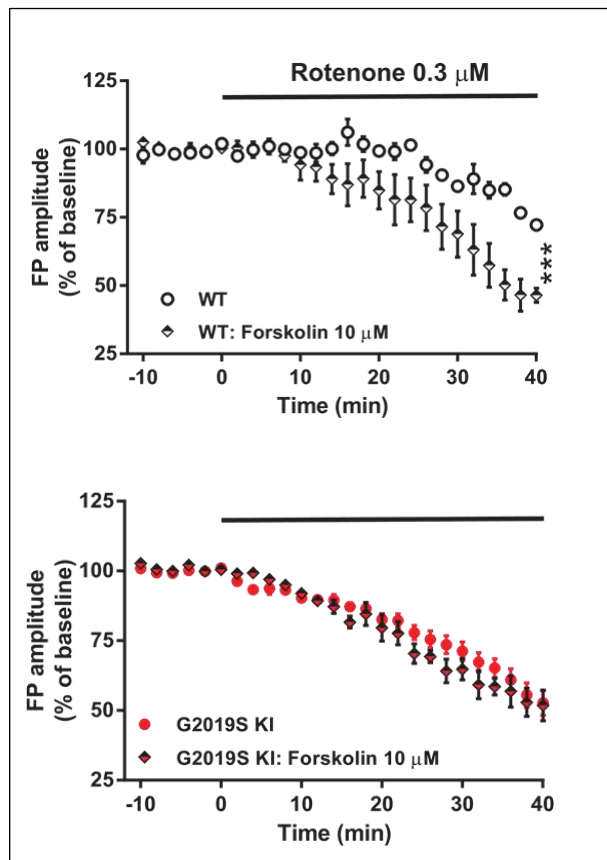


Figura 28 Analisi dei FP nei ceppi WT e KI dopo somministrazione di forskolina e successivo trattamento con rotenone.

4.5 *Studio della tossicità mitocondriale in un modello di early Parkinson*

Successivamente siamo passati a studiare la tossicità mitocondriale indotta da α -Syn e ROT. Le fettine di ratto in questo caso sono state incubate per un'ora con α -Syn a diverse dosi, a 0,1nM, 0,3nM, 3nM, 30nM. I nostri dati mostrano come all'aumentare della concentrazione dell' α -Syn, ma mantenendo la stessa concentrazione per il ROT 0,3 μ M (figura 29), abbiamo una riduzione dose dipendente del FP, raggiungendo una perdita del FP quasi totale alla concentrazione 30nM.

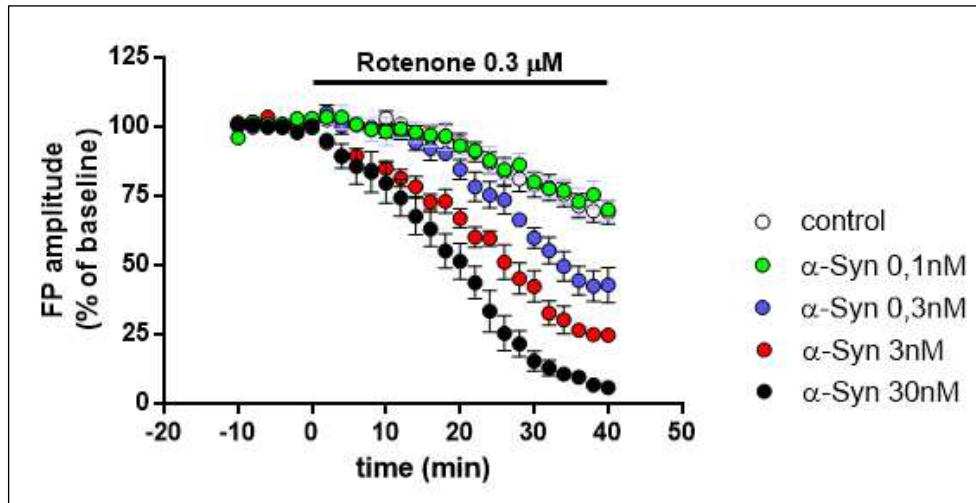


Figura 29 Analisi del FP di fettine di ratto trattate per un'ora a dosi diverse di α -Syn (0,1, 0,3, 3, 30nM) e successivamente trattate con rotenone.

Ho quindi deciso di utilizzare la dose 3nM, che aveva una perdita del FP del 65%, per indagare il coinvolgimento di NCX presente nella membrana plasmatica dei neuroni, e il coinvolgimento di NCX mitocondriale nella tossicità mitocondriale indotto dal ROT 0,3μM.

Le fettine di ratto corticostriali sono state quindi preincubate per 20 min con il bloccante dello scambiatore di membrana plasmatica, SN6 10μM. I nostri dati come si evince dalla figura 30, mostrano che il bloccante SN6 nelle fettine incubate con α -Syn non induce ne' un effetto protettivo ne' un effetto peggiorativo. Infatti non ci sono differenze statisticamente significative tra le fettine trattate con α -Syn 3nM e ROT 0,3μM, e quelle preincubate con SN6 e trattate poi con α -Syn 3nM e ROT 0,3μM.

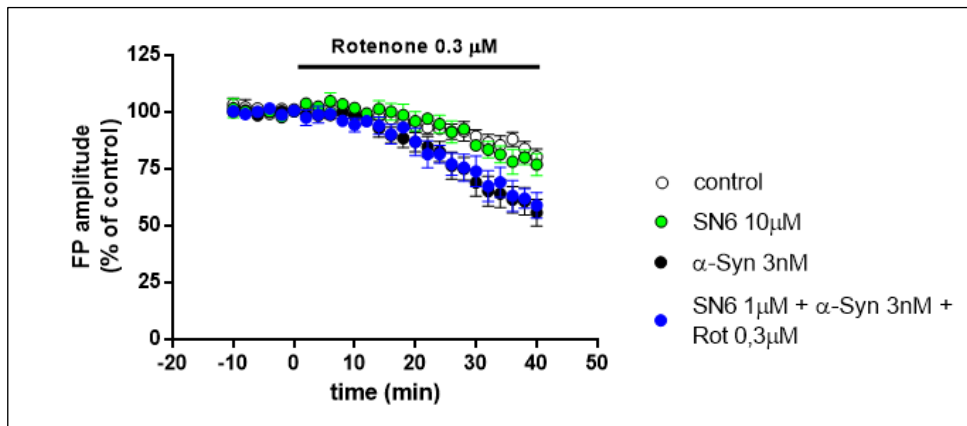


Figura 30 Analisi del FP di fettine di ratto di controllo, fettine trattate per un'ora con α -Syn 3nM e poi trattate con rotenone, fettine incubate con SN6 20 min e poi trattate con rotenone, fettine preincubate con SN6, poi per un'ora con α -Syn e successivamente trattate con rotenone.

Successivamente sono passata ad indagare il possibile coinvolgimento dello scambiatore NCX mitocondriale, utilizzando l'inibitore dello scambiatore mitocondriale il CGP37157 3μM.

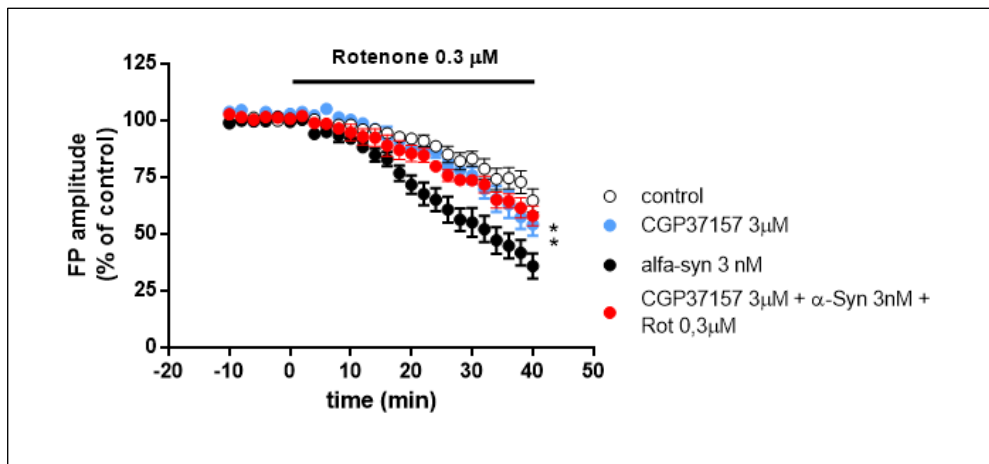


Figura 31 Analisi del FP di fettine di ratto di controllo, fettine trattate per un'ora con α -Syn 3nM e poi trattate con rotenone, fettine incubate con CGP37157 per 20 min e poi trattate con rotenone, fettine preincubate con CGP37157, poi per un'ora con α -Syn e successivamente trattate con rotenone.

Come mostrato dalla figura 31 il pretrattamento con CGP37157, attenua i livelli di riduzione del FP riportandoli al valore di controllo, e c'è una differenza statisticamente significativa tra il trattato con CGP37157 α -Syn e ROT e quello con solo α -Syn e ROT $P < 0.001$.

4.6 Valutazione del Ca^{2+} mitocondriale nelle SHSY5Y

Come noto in letteratura α -Syn e ROT provocano un aumento del calcio mitocondriale e una depolarizzazione dalla membrana. Ho quindi analizzato se anche nel modello cellulare delle SH-SY5Y, differenziate con acido retinoico per 7 giorni, si verificava un aumento del Ca^{2+} mitocondriale. Come si evince dalla figura 32 α -Syn 3nM e ROT 0.3 μ M da soli non determinano un aumento di Ca^{2+} mitocondriale statisticamente significativo rispetto al controllo, mentre α -Syn e ROT insieme hanno un aumento di Ca^{2+} mitocondriale statisticamente significativo rispetto a tutti i gruppi di controllo ($P < 0.0001$). Il pretrattamento con CGP37157 riduce l'aumento di Ca^{2+} mitocondriale, e i dati mostrano una differenza statisticamente significativa tra il gruppo pretrattato con CGP37157 e successivamente trattato con α -Syn 3nM e ROT 0.3 μ M e il gruppo trattato con α -Syn 3nM e ROT 0.3 μ M ($P < 0.001$)

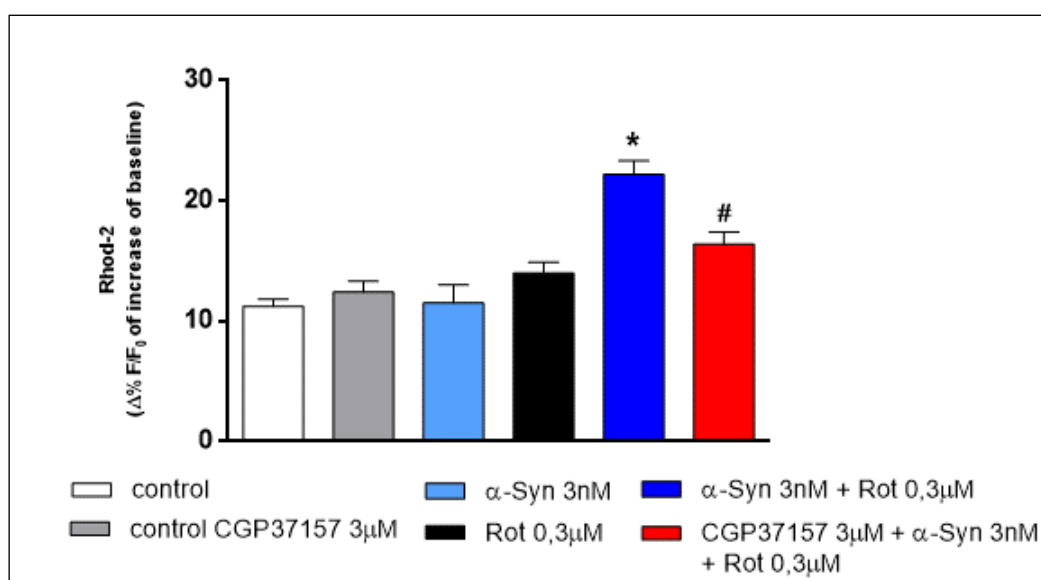


Figura 32 $\Delta F/F_0$ incremento del Ca^{2+} mitocondriale nelle SHSY5Y trattate con α -Syn 3nM, ROT 0.3 μ M e CGP37157.

5 DUSCUSSIONE

La MP è una patologia neurodegenerativa cronica a carattere progressivo del sistema nervoso centrale che coinvolge i GB ed è associata ad alterazioni motorie e cognitive. E' caratterizzata dalla perdita massiva neuronale dei neuroni dopaminergici, e dalla presenza dei corpi di Lewy il cui principale costituente è α -Syn. Lo striato rappresenta la principale struttura di input dei GB. Esso riceve afferenze eccitatorie dalla corteccia e dal talamo e una densa innervazione di neuroni dopaminergici dal mesencefalo. La trasmissione corticostriatale è essenziale nella regolazione delle funzioni motorie e cognitive (Calabresi et al., 2014; Obeso et al., 2017). Le mutazioni del gene Lrrk2 rappresentano la mutazione genetica più comune associata alla MP, sia in forme familiari che sporadiche. Considerando la sua frequenza nei pazienti affetti dalla MP, potrebbe rappresentare un fattore in grado di aumentare la suscettibilità a fattori ambientali tossici in concomitanza con la patogenesi e la progressione della malattia (Martin et al., 2014). In questo lavoro, ho utilizzato un modello genetico G2019S Lrrk2 di MP, per valutare possibili alterazioni glutammatergiche striatali legate all'alterazione del recettore dopaminergico D2, e ho valutato la tossicità mitocondriale applicando il ROT, una tossina ambientale, che è stata associata alla disfunzione del complesso I mitocondriale nella MP.

Un altro obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare il danno mitocondriale indotto da α -Syn e ROT. Anche per l' α -Syn infatti è stato ipotizzato un ruolo nell'omeostasi mitocondriale. In particolare, le protofibrille, formate dall'aggregazione di tale proteina, sarebbero responsabili della formazione di pori a livello delle membrane cellulari anche interne. È stata anche vista una maggiore affinità di legame tra l' α -Syn il Complesso I della catena mitocondriale nei soggetti con MP confrontati con soggetti sani, suggerendo che l'accumulo mitocondriale della proteina possa contribuire al deficit del Complesso I (Van Laar and Berman, 2009).

I risultati che ho ottenuto mostrano che la mutazione G2019S determina alterazioni nella funzione sinaptica del recettore dopaminergico D2 e rende i neuroni striatali più suscettibili alla tossicità mitocondriale mediata da ROT.

Le proprietà elettrofisiologiche del modello G2019S, quindi le proprietà intrinseche di membrana, l'attività glutammatergica spontanea, la pair-pulse facilitation, NMDA/AMPA ratio, non sono risultate alterate. Studi recenti (Beccano-Kelly et al., 2014) hanno confermato l'analisi, dimostrando che non ci sono alterazioni elettrofisiologiche di base nel modello G2019S. Mentre i livelli di DA risultano statisticamente ridotti nel modello G2019S rispetto al WT e ai modelli D1994S KD e KO Lrrk2. Lo studio inoltre ha evidenziato, attraverso l'analisi della trasmissione glutammatergica di correnti postsinaptiche evocate (EPSC), mediante tecnica di patch clamp whole-cell, che l'attivazione del recettore della dopamina D2, con quinpirolo un agonista del recettore D2, induce una riduzione della trasmissione glutammatergica. Questa riduzione è notevolmente maggiore nei ceppi KI rispetto ai WT suggerendo che nella MP vi è un alterato equilibrio tra la stimolazione dopaminergica del nucleo striato e quella glutammatergica proveniente dalle fibre corticostriatali. L'indagine che è stata condotta successivamente era volta ad evidenziare come questa riduzione potesse essere causata per mezzo del rilascio di endocannabinoidi. Infatti l'utilizzo dell'inibitore del recettore CB1 degli endocannabinoidi l'AM251 insieme al quinpirolo non mostra alcuna riduzione dell'EPSC. Anche studi precedenti (Beccano-Kelly et al., 2014) hanno mostrato un'alterata perdita di dopamina e un alterato funzionamento presinaptico del recettore D2 nei topi con mutazione G2019S, mentre nei topi KO Lrrk2 non è stato riscontrato alcun tipo di alterazione elettrofisiologica. I nostri dati inoltre mostrano che non ci sono alterate disfunzioni del recettore CB1 in quanto l'utilizzo del WIN un agonista del recettore CB1 sia nei WT che nei KI mostra un uguale riduzione dell'EPSC. Inoltre la via sottesa al recettore D2 che porta ad un aumento di Ca^{2+} e quindi ad un blocco del recettore CB1 è quella della PLC. Infatti il blocco della PLC con l'U73122 prima del trattamento con quinpirolo non permette una riduzione dell'EPSC.

Per quanto riguarda inoltre la tossicità mitocondriale, alcuni studi (Van Laar and Berman, 2009) (Bueler, 2009) hanno dimostrato l'esistenza di alterazioni strutturali

e funzionali nei mitocondri di colture cellulari con *Lrrk2* mutato, sottolineando una stretta relazione tra predisposizione genetica e sviluppo di anomalie mitocondriali. Studi condotti su topi mutanti *Lrrk2* KI hanno evidenziato anomalie sottili come la morfologia mitocondriale anormale (Yue et al., 2015) e un'aumentata suscettibilità alla disfunzione sinaptica anche nei giovani topi di tre mesi, mentre mostrano un fenotipo ipercinetico resistente al normale declino motorio correlato all'età (Liu et al., 2014).

In questo studio, alla predisposizione genetica data dalla mutazione di *Lrrk2*, si è aggiunto l'insulto ambientale mediato dal ROT. Ciò che è stato riscontrato, è un'aumentata sensibilità alla tossicità mitocondriale nei ceppi KI rispetto ai WT. Infatti la riduzione dei FP nei KI trattati con ROT è statisticamente maggiore rispetto ai WT trattati con ROT. Tale dato conferma l'ipotesi che sia la predisposizione genetica sia fattori ambientali concorrano allo sviluppo del fenotipo patologico nella MP. A conferma dei nostri dati alcuni lavori suggeriscono che la mutazione *Lrrk2* di G2019S potrebbe svolgere un ruolo significativo nel favorire la tossicità striatale indotta da ROT, dal momento che *C. elegans* esprimendo questa specifica mutazione ha mostrato una maggiore perdita di marcatori dopaminergici striatali in risposta all'esposizione al ROT (Saha et al., 2009). Inoltre, *Lrrk2* potrebbe modificare direttamente l'omeostasi mitocondriale, visto che profonde anomalie nei processi e nella morfologia mitocondriale sono state descritte nello striato dei topi portatori della mutazione G2019S (Yue et al., 2015).

Un dato importante di questo studio è costituito dall'osservazione che la stimolazione del recettore dopaminergico D2 con quinpirolo sui FP è in grado di prevenire l'effetto tossico esercitato dal ROT, avendo un effetto neuroprotettivo. Un'ulteriore indagine di questo lavoro è stata quella di studiare la via sottesa al recettore D2 coinvolta nel meccanismo neuroprotettivo. E i dati ci mostrano che la via coinvolta è quella della PKA e AMPc. Infatti il blocco della PKA con H89, e l'agonista dell'AMPc la forskolina mimano l'effetto protettivo del quinpirolo sui FP. Uno studio recentissimo ha preso in esame l'efficacia della neuroprotezione mediata dal quinpirolo in un modello di MP in colture di *Drosophila melanogaster*. Il gruppo di ricerca ha considerato come parametro di riferimento la morfologia mitocondriale (numero, misura, interconnettività ed elongazione) dopo

somministrazione di MPP+. Da questa analisi risulta evidente che, affinché risulti efficace, la somministrazione di quinpirolo dev'essere precoce e concomitante all'insulto tossico mitocondriale. In altre parole, la stimolazione del recettore D2 riesce a riportare la morfologia mitocondriale, in ogni parametro considerato, al livello dei controlli se la somministrazione di quinpirolo precede o è contemporanea a quella del tossico. In opposizione al nostro lavoro, un altro studio ha dimostrato che se la somministrazione dell'agonista D2 viene applicata quando la degenerazione neuronale è ormai in fase avanzata, la neuroprotezione ha efficacia parziale se non nulla (Wiemerslage et al., 2016).

Nel nostro modello di α -Syn e ROT abbiamo potuto osservare come all'aumentare della concentrazione di α -Syn avevamo una diminuzione dell'ampiezza dei FP, e quindi un aumento della tossicità mitocondriale indotta da α -Syn. Studi recenti hanno dimostrato come l' α -Syn porta ad un aumento del Ca^{2+} mitocondriale e la depolarizzazione della membrana mitocondriale (Angelova et al., 2016). Questo ci ha indotto a pensare ad un possibile ruolo di NCX nelle alphasinucleopatie. (Ago et al., 2011) hanno osservato nel modello SH-SY5Y che la S-metilcitrullina (SMTC), inibitore specifico di nNOS, attenua il danno indotto da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrapiridina (MPTP). Tale sostanza inibisce il complesso I della catena respiratoria determinando le caratteristiche tipiche del Parkinson e la sua neurotossicità è in relazione con l'attività di nNOS. La somministrazione di SEA0400 un inibitore di NCX citoplasmatico, attenua la degenerazione dei neuroni dopaminergici indotta da MPTP grazie all'inibizione dell'attività *reverse mode* di NCX nella sostanza nera. In questo modo NCX potrebbe rappresentare un nuovo target molecolare per il trattamento del Parkinson e di altre malattie neurodegenerative. Gli esperimenti da me condotti suggeriscono che l'inibizione di NCX di membrana, con l'SN6 non eserciti un ruolo protettivo nel nostro modello. Al contrario l'inibizione di NCX mitocondriale con CGP37157 esercita un ruolo protettivo sui FP e modula l'ingresso di Ca^{2+} mitocondriale. Questo risultato conferma che NCX mitocondriale è coinvolto nella MP sebbene ulteriori indagini saranno necessarie per comprendere il meccanismo con cui NCX sia coinvolto nella MP.

6 CONCLUSIONI

Poiché le mutazioni a carico di Lrrk2 sono le più frequenti nelle forme di MP monogenica autosomica dominante (oltre che essere state riscontrate nel 4% delle forme sporadiche) e vista la somiglianza nel fenotipo clinico tra forme sporadiche e forme presentanti Lrrk2 mutato, la caratterizzazione di questo modello contribuisce notevolmente alla comprensione di meccanismi patogenetici sottesi alla malattia e a fornire nuovi orizzonti per l'approccio terapeutico. L'evidenza che vi sia un'alterata trasmissione glutammatergica, mediata dal rilascio di endocannabinoidi, in seguito alla stimolazione del recettore D2 sottolinea come complessi ed eterogenei siano i meccanismi molecolari coesistenti nella determinazione della patologia. La dimostrazione di un'aumentata suscettibilità al danno mitocondriale, sia nel modello mutato che nel modello con α -Syn, evidenzia come nello sviluppo della patologia concorrano sia fattori genetici che ambientali e che, intervenendo farmacologicamente sul substrato genetico, prima dell'insulto ambientale, si riesca a prevenire la degenerazione neuronale e quindi lo sviluppo della patologia stessa.

Ad oggi, gli approcci terapeutici sono volti a controllare la sintomatologia del paziente senza però riuscire a modificare il decorso della malattia, la neuroprotezione, mediata dall'attivazione dei recettori D2, potrebbe rappresentare una svolta nell'approccio al paziente parkinsoniano con Lrrk2 mutato andando a prevenire, su un substrato geneticamente predisposto, la degenerazione neuronale indotta dall'insulto ambientale. La neuroprotezione, volta ad intervenire nella fase precoce della malattia, prima che si arrivi ad una degenerazione neuronale massiva, potrebbe prevenire il danno neuronale andando così a modificare la progressione della malattia e quindi il suo decorso clinico. Inoltre il coinvolgimento di NCX nel modello di *early* Parkinson potrebbe rivestire un ruolo importante che potrebbe consentire di identificare un nuovo meccanismo coinvolto nella MP che a sua volta apre nuove prospettive di studio dei meccanismi coinvolti nella MP.

7 BIBLIOGRAFIA

- Ago Y, Kawasaki T, Nashida T, Ota Y, Cong Y, Kitamoto M, Takahashi T, Takuma K and Matsuda T (2011) SEA0400, a specific Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor, prevents dopaminergic neurotoxicity in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* **61**(8):1441-1451.
- Ahn S, Chen Y, Bredow T, Cheung C and Yu F (2017) Effects of Non-Pharmacological Treatments on Quality of Life in Parkinson's Disease: A Review. *J Parkinsons Dis Alzheimers Dis* **4**(1).
- Angelova PR, Ludtmann MH, Horrocks MH, Negoda A, Cremades N, Klenerman D, Dobson CM, Wood NW, Pavlov EV, Gandhi S and Abramov AY (2016) Ca²⁺ is a key factor in alpha-synuclein-induced neurotoxicity. *J Cell Sci* **129**(9):1792-1801.
- Baker PF and McNaughton PA (1976) The effect of membrane potential on the calcium transport systems in squid axons [proceedings]. *J Physiol* **260**(2):24P-25P.
- Beccano-Kelly DA, Volta M, Munsie LN, Paschall SA, Tatarnikov I, Co K, Chou P, Cao LP, Bergeron S, Mitchell E, Han H, Melrose HL, Tapia L, Raymond LA, Farrer MJ and Milnerwood AJ (2014) LRRK2 overexpression alters glutamatergic presynaptic plasticity, striatal dopamine tone, postsynaptic signal transduction, motor activity and memory. *Hum Mol Genet* **24**(5):1336-1349.
- Blaustein MP and Santiago EM (1977) Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons. *Biophys J* **20**(1):79-111.
- Bonsi P, Cuomo D, Martella G, Sciamanna G, Tolu M, Calabresi P, Bernardi G and Pisani A (2006) Mitochondrial toxins in Basal Ganglia disorders: from animal models to therapeutic strategies. *Curr Neuropharmacol* **4**(1):69-75.
- Bueler H (2009) Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **218**(2):235-246.
- Calabresi P, Di Filippo M, Gallina A, Wang Y, Stankowski JN, Picconi B, Dawson VL and Dawson TM (2012) New synaptic and molecular targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Mov Disord* **28**(1):51-60.

- Calabresi P, Di Filippo M, Ghiglieri V, Tambasco N and Picconi B (2010) Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap. *Lancet Neurol* **9**(11):1106-1117.
- Calabresi P, Maj R, Mercuri NB and Bernardi G (1992) Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. *Neurosci Lett* **142**(1):95-99.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V and Di Filippo M (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci* **17**(8):1022-1030.
- Castaldo P, Cataldi M, Magi S, Lariccia V, Arcangeli S and Amoroso S (2009) Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases. *Prog Neurobiol* **87**(1):58-79.
- Cherra SJ, 3rd, Steer E, Gusdon AM, Kiselyov K and Chu CT (2012) Mutant LRRK2 elicits calcium imbalance and depletion of dendritic mitochondria in neurons. *Am J Pathol* **182**(2):474-484.
- Cirnaru MD, Marte A, Belluzzi E, Russo I, Gabrielli M, Longo F, Arcuri L, Murru L, Bubacco L, Matteoli M, Fedele E, Sala C, Passafaro M, Morari M, Greggio E, Onofri F and Piccoli G (2014) LRRK2 kinase activity regulates synaptic vesicle trafficking and neurotransmitter release through modulation of LRRK2 macro-molecular complex. *Front Mol Neurosci* **7**:49.
- Cookson MR (2010) The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* **11**(12):791-797.
- Costa C, Belcastro V, Tozzi A, Di Filippo M, Tantucci M, Siliquini S, Autuori A, Picconi B, Spillantini MG, Fedele E, Pittaluga A, Raiteri M and Calabresi P (2008) Electrophysiology and pharmacology of striatal neuronal dysfunction induced by mitochondrial complex I inhibition. *J Neurosci* **28**(32):8040-8052.
- Dachsel JC, Taylor JP, Mok SS, Ross OA, Hinkle KM, Bailey RM, Hines JH, Szutu J, Madden B, Petrucelli L and Farrer MJ (2007) Identification of potential protein interactors of Lrrk2. *Parkinsonism Relat Disord* **13**(7):382-385.
- Dawson TM, Ko HS and Dawson VL (2010) Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* **66**(5):646-661.
- Di Filippo M, de Iure A, Durante V, Gaetani L, Mancini A, Sarchielli P and Calabresi P (2014) Synaptic plasticity and experimental autoimmune

encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Brain Res* **1621**:205-213.

Federici M, Latagliata EC, Rizzo FR, Ledonne A, Gu HH, Romigi A, Nistico R, Puglisi-Allegra S and Mercuri NB (2013) Electrophysiological and amperometric evidence that modafinil blocks the dopamine uptake transporter to induce behavioral activation. *Neuroscience* **252**:118-124.

Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B, Berg D, Mueller JC and Gasser T (2008) Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J* **22**(5):1327-1334.

George JM (2002) The synucleins. *Genome Biol* **3**(1):REVIEWS3002.

Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL and Richardson RJ (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* **50**(5):1346-1350.

Guhathakurta S, Bok E, Evangelista BA and Kim YS (2017) Dereglulation of alpha-synuclein in Parkinson's disease: Insight from epigenetic structure and transcriptional regulation of SNCA. *Prog Neurobiol* **154**:21-36.

Kalinderi K, Bostantjopoulou S and Fidani L (2016) The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Acta Neurol Scand* **134**(5):314-326.

Klein C and Westenberger A (2012) Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(1):a008888.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW and Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**(4587):979-980.

Lill CM (2016) Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes* **30**(6):386-396.

Liu HF, Lu S, Ho PW, Tse HM, Pang SY, Kung MH, Ho JW, Ramsden DB, Zhou ZJ and Ho SL (2014) LRRK2 R1441G mice are more liable to dopamine depletion and locomotor inactivity. *Ann Clin Transl Neurol* **1**(3):199-208.

Longo F, Russo I, Shimshek DR, Greggio E and Morari M (2014) Genetic and pharmacological evidence that G2019S LRRK2 confers a hyperkinetic phenotype, resistant to motor decline associated with aging. *Neurobiol Dis* **71**:62-73.

- Magi S, Lariccia V, Castaldo P, Arcangeli S, Nasti AA, Giordano A and Amoroso S (2012) Physical and functional interaction of NCX1 and EAAC1 transporters leading to glutamate-enhanced ATP production in brain mitochondria. *PLoS One* **7**(3):e34015.
- Martin I, Abalde-Atristain L, Kim JW, Dawson TM and Dawson VL (2014) Abberant protein synthesis in G2019S LRRK2 Drosophila Parkinson disease-related phenotypes. *Fly (Austin)* **8**(3):165-169.
- Nandipati S and Litvan I (2016) Environmental Exposures and Parkinson's Disease. *Int J Environ Res Public Health* **13**(9).
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C and Rodriguez M (2008) Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* **23 Suppl 3**:S548-559.
- Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV and Stoessl AJ (2017) Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord* **32**(9):1264-1310.
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW and Singleton AB (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* **44**(4):595-600.
- Papkovskaia TD, Chau KY, Inesta-Vaquera F, Papkovsky DB, Healy DG, Nishio K, Staddon J, Duchon MR, Hardy J, Schapira AH and Cooper JM (2012) G2019S leucine-rich repeat kinase 2 causes uncoupling protein-mediated mitochondrial depolarization. *Hum Mol Genet* **21**(19):4201-4213.
- Saha S, Guillily MD, Ferree A, Lanceta J, Chan D, Ghosh J, Hsu CH, Segal L, Raghavan K, Matsumoto K, Hisamoto N, Kuwahara T, Iwatsubo T, Moore L, Goldstein L, Cookson M and Wolozin B (2009) LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **29**(29):9210-9218.

- Samii A, Nutt JG and Ransom BR (2004) Parkinson's disease. *Lancet* **363**(9423):1783-1793.
- Schapira AH (2008) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* **33**(12):2502-2509.
- Seol W (2010) Biochemical and molecular features of LRRK2 and its pathophysiological roles in Parkinson's disease. *BMB Rep* **43**(4):233-244.
- Sherer TB, Kim JH, Betarbet R and Greenamyre JT (2003) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* **179**(1):9-16.
- Stephens B, Mueller AJ, Shering AF, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW, Bell JE, Kilford L, Kingsbury AE, Daniel SE and Ingham CA (2005) Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* **132**(3):741-754.
- Swedlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP, Jr., Davis RE and Parker WD, Jr. (1996) Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **40**(4):663-671.
- Trancikova A, Tsika E and Moore DJ (2011) Mitochondrial dysfunction in genetic animal models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* **16**(9):896-919.
- Van Laar VS and Berman SB (2009) Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Exp Neurol* **218**(2):247-256.
- Wiemerslage L, Ismael S and Lee D (2016) Early alterations of mitochondrial morphology in dopaminergic neurons from Parkinson's disease-like pathology and time-dependent neuroprotection with D2 receptor activation. *Mitochondrion* **30**:138-147.
- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D and Mandel J (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* **26 Suppl 1**:S1-58.
- Wood-Kaczmar A, Deas E, Wood NW and Abramov AY (2012) The role of the mitochondrial NCX in the mechanism of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol* **961**:241-249.

- Xiong N, Huang J, Zhang Z, Xiong J, Liu X, Jia M, Wang F, Chen C, Cao X, Liang Z, Sun S, Lin Z and Wang T (2009) Stereotaxical infusion of rotenone: a reliable rodent model for Parkinson's disease. *PLoS One* **4**(11):e7878.
- Yue M, Hinkle KM, Davies P, Trushina E, Fiesel FC, Christenson TA, Schroeder AS, Zhang L, Bowles E, Behrouz B, Lincoln SJ, Beevers JE, Milnerwood AJ, Kurti A, McLean PJ, Fryer JD, Springer W, Dickson DW, Farrer MJ and Melrose HL (2015) Progressive dopaminergic alterations and mitochondrial abnormalities in LRRK2 G2019S knock-in mice. *Neurobiol Dis* **78**:172-195.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK and Gasser T (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**(4):601-607.