



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Materno Infantili
Sezione di Farmacologia
(Direttore: Prof.ssa Maria Speranza Desole)

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE
INDIRIZZO NEUROSCIENZE
CICLO XXIV

**Studio del meccanismo di sintesi e rilascio della dopamina in cellule
PC 12 TET-ON contenenti la dardarina (LRRK2) WT e mutata**

Tutor :
Dott.ssa Rossana Migheli

Presidente Scuola di Dottorato:
Prof. Eusebio Tolu

Tesi di dottorato della Dott.ssa Ylenia Spissu

Anno Accademico 2010 -2011

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Il Morbo di Parkinson	2
1.2 Eziopatogenesi del Morbo di Parkinson	3
1.2.1 Fattori ambientali	4
1.2.2 Fattori genetici	8
1.3 LRRK2 e il suo ruolo nella malattia di Parkinson	14
1.3.1 Struttura, funzione e localizzazione	15
1.4 La microdialisi	
2. SCOPO DELLA RICERCA	22
3. MATERIALI E METODI	24
3.1 Reagenti e soluzioni	25
3.2 Il sistema d'espressione eucaristico inducibile tetraciclina-sensibile.....	26
3.3 Inserimento dei cDNA di <i>LRRK2</i> nei vettori plasmidici pTRE2	28
3.4 Trasfezione con lipofectamina in cellule PC 12-ON	28
3.5 Colture cellulari.....	29
3.6 Costruzione del capillare singolo per la microdialisi <i>in vitro</i>	30
3.7 Procedura della microdialisi.....	31
3.8 Analisi cromatografica del dializzato ottenuto dalla sospensione cellulare delle PC 12-ON	31
3.9 Western Blot.....	32
3.10 Vitalità cellulare	33
4. RISULTATI	34
4.1 Espressione della dardarina e della tirosina idrossilasi nelle cellule PC 12-ON.....	35
4.2 Effetti della dardarina WT e mutata sulla dopamina e i suoi metaboliti nell'intra- e nell'extracellulare delle PC 12-ON	35

4.3	Secrezione e metabolismo basale della dopamina in cellule PC 12-ON che esprimono PARK8.....	39
4.4	Effetti di LRRK2 sulla secrezione e il metabolismo della dopamina in cellule PC 12-ON stimulate con la nicotina.....	41
5.	DISCUSSIONE	43
6.	BIBLIOGRAFIA	47

1. INTRODUZIONE

*Dott.ssa Ylenia Spissu – Studio del meccanismo di sintesi e rilascio della dopamina in cellule PC 12-ON
contenenti la dardarina (LRRK2) WT e mutata – Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche,
indirizzo Neuroscienze, Ciclo XXIV - Università degli Studi di Sassari*

1.1 Il Morbo di Parkinson

La malattia di Parkinson (MP) fu descritta per la prima volta da James Parkinson in un libretto intitolato “*An Essay on the Shaking Palsy*” pubblicato nel 1817 (Parkinson J. 1817). Citando le sue parole, la MP è caratterizzata da "tremori involontari in parte non in movimento, con tendenza a piegare il tronco in avanti e a passare dal camminare al correre, mentre la sensibilità e l'intelligenza sembrano intatte". La malattia di Parkinson è caratterizzata dalla degenerazione cronica, progressiva e selettiva dei neuroni dopaminergici presenti nella *substantia nigra pars compacta* (SNpc), un nucleo situato a livello del mesencefalo in cui viene prodotta la dopamina (DA), un neurotrasmettitore essenziale per il controllo del movimento (Fig. 1).

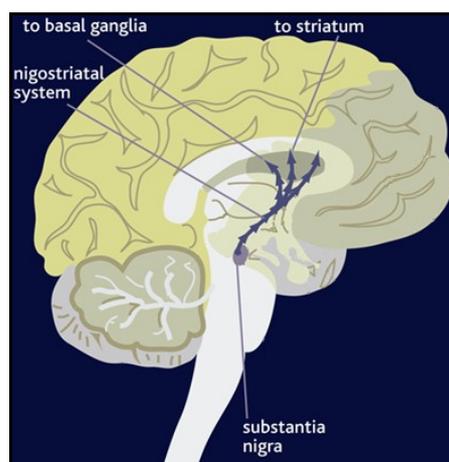


Figura 1. Via dopaminergica nigro-striatale

Quando il numero dei neuroni dopaminergici della SNpc diminuisce del 50% si ha l'esordio clinico della malattia. La riduzione della quantità di dopamina che arriva allo striato dalla SNpc, di conseguenza, porta ad uno squilibrio tra la stimolazione dopaminergica (inibitoria) e quella colinergica (eccitatoria) provocando progressivamente tremore a riposo (di tipo statico), ipertonica con rigidità, bradicinesia (riduzione della mobilità autonoma e

volontaria senza riduzione della forza muscolare), instabilità posturale, disturbi della parola e della scrittura, turbe vegetative e spesso sintomi ansioso-depressivi. Questa patologia colpisce prevalentemente il sesso maschile con un'incidenza dell'1% in soggetti oltre i 60 anni e con un aumento al 4-5% in soggetti di età superiore agli 85 anni; inoltre circa il 4% dei soggetti sviluppano precocemente la malattia prima dei 50 anni. Attualmente in Italia ci sono più di 200.000 malati di Parkinson, con circa 1.200 nuovi casi l'anno. Nei paesi occidentali l'incidenza della malattia è di 16-19 casi per 100.000 abitanti l'anno (Olanow CW and Tatton WG 1999, De Lau LML and Breteler MMB 2006). Post-mortem, inoltre, è possibile individuare delle inclusioni citoplasmatiche, conosciute come corpi di Lewy, costituiti da aggregati proteici contenenti α -sinucleina e proteine correlate al sistema ubiquitina-proteasoma (UP) quali ubiquitina, parkina, ubiquitina-C-idrolasi-L1 (Uch-L1).

Solo il 75% delle diagnosi cliniche di morbo di Parkinson vengono confermate dai riscontri autoptici poichè i segni caratteristici della malattia parkinsoniana (segni extrapiramidali) possono riscontrarsi frequentemente anche in altre condizioni cliniche. Queste vengono classificate come parkinsonismi atipici (atrofia multisistemica, paralisi sopranucleare progressiva, degenerazione cortico-basale, malattia da corpi di Lewy diffusi ed altre degenerazioni multisistemiche) o, più genericamente, sindromi parkinsoniane. Il fatto, inoltre, che il 25% dei pazienti con diagnosi di Parkinson non presenti *corpi di Lewy* rende tale indicatore molto importante.

1.2 Eziopatogenesi del Morbo di Parkinson

L'eziologia della malattia di Parkinson non è del tutto chiara, ma, oltre al singolo fattore di rischio legato all'età, esiste l'ipotesi ormai accettata di un'origine multifattoriale della malattia, a cui contribuiscono componenti

ambientali e genetici. Tali fattori possono portare all'alterazione di diversi meccanismi quali il sistema ubiquitina-proteasoma (responsabile della degradazione di proteine danneggiate e mutate), ad aggregazioni proteiche e a morte neuronale per apoptosi causata dall'attivazione delle caspasi in seguito al danneggiamento dei mitocondri (Hindle J.V. 2010). I fattori di rischio ambientale che portano all'insorgenza della malattia includono pesticidi (paraquat, rotenone), industrializzazione, ambiente di vita rurale e ambiente di lavoro, metalli pesanti (Al, Fe, Cu), esposizione a prodotti chimici industriali (solventi organici) e a neurotossine quali l'1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Per quanto riguarda i fattori genetici, invece, sono stati identificati 13 loci genici, noti come loci PARK (PARK1-PARK13), responsabili dell'insorgenza del 20% della malattia di Parkinson ad esordio giovanile e del 3% ad esordio tardivo (Schapira AH and Jenner P 2011; Hindle J.V. 2010).

1.2.1 Fattori ambientali

In questi ultimi anni sono stati portati avanti numerosi studi che permettessero di capire il ruolo dei fattori ambientali alla base della diminuzione dei neuroni dopaminergici causa del MP idiopatico. Sulla base dell'azione delle diverse sostanze si è arrivati alla conclusione che esistono dei meccanismi di morte cellulare alla base della riduzione del numero dei neuroni. La morte neuronale può essere causata da un aumentato stress ossidativo (Dodson MW and Guo M 2007) e da disfunzioni della catena respiratoria mitocondriale (Coskun P. et al 2011). Infatti, l'elevata concentrazione di perossido d'idrogeno (H_2O_2) e di altri radicali liberi danneggia le cellule nervose. In condizioni normali gli enzimi deputati alla rimozione dei radicali liberi, quali la superossido dismutasi e la glutatione perossidasi, proteggono i neuroni dai danni causati

dallo stress ossidativo come il danneggiamento della membrana plasmatica, danni al DNA, la ridotta efficienza della respirazione cellulare e l'invecchiamento cellulare precoce. Sotto l'influsso cronico di fattori tossici, questi sistemi perdono di efficacia e diventano insufficienti a prevenire i danni conseguenti alla produzione cronica di radicali liberi. Per quanto riguarda, invece, il mal funzionamento dei mitocondri questo potrebbe essere imputato all'azione non solo di diverse sostanze come il rotenone, l'MPTP, la 6-OHDA e i metalli pesanti, ma anche dei prodotti di ossidazione della dopamina:

✓ Rotenone: il rotenone è un composto citotossico che viene estratto da piante tropicali, appartiene alla famiglia dei rotenoidi e può essere utilizzato come insetticida, pesticida e nei laghi per uccidere i pesci in sovrannumero. È un composto lipofilo che attraversa facilmente la barriera emato-encefalica e il doppio strato lipidico accumulandosi così negli organelli cellulari inclusi i mitocondri causando morte cellulare (Drechsel D.R. and Patel M. 2008; Miller R.L. et al 2009). A dimostrazione del fatto che la catena respiratoria ha un ruolo nell'insorgenza del MP e nella perdita di circa il 30% dei neuroni dopaminergici, diversi studi hanno messo in evidenza che in pazienti con MP sporadico non familiare è presente una riduzione del 15-30% dell'attività del complesso I. Infatti quando il rotenone penetra in tali organelli esplica la sua azione tossica legandosi al complesso I e II della catena respiratoria dove inibisce il flusso di elettroni causando, quindi, una ridotta produzione di ATP e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Arif I.A. and Khan H.A. 2011; Miller R.L. et al 2009). Il rallentamento del flusso degli elettroni a monte del complesso I causa una eccessiva produzione di ioni superossido in seguito alla reazione tra l'ossigeno molecolare presente e gli elettroni stessi (Drechsel D.R. and Patel

M. 2008). In studi condotti sia in vivo che in vitro sono stati evidenziati ulteriori effetti tossici dovuti all'esposizione cronica al rotenone. Tra questi ritroviamo l'inibizione della formazione dei microtubuli con conseguente accumulo di tubulina monomero dannosa per la cellula, la comparsa di inclusioni simili ai corpi di Lewy costituiti da α -sinucleina, la progressiva deplezione di glutatione (GSH), danno ossidativo a carico delle proteine e del DNA, e di conseguenza la morte cellulare per apoptosi (Drechsel D.R. and Patel M. 2008; Greenamyre J.T. et al 2001; Marshall L.E. and Himes R.H. 1978).

✓ Metalli pesanti: Il manganese (Mn) è uno dei tanti metalli pesanti che portano all'insorgenza del MP. Sebbene il Mn sia un metallo essenziale per il metabolismo energetico e sia un cofattore per diversi enzimi (idrolasi, lisasi, arginasi, superossido dismutasi, etc.), un suo accumulo nell'organismo, dovuto all'esposizione cronica (da 6 mesi a 2 anni) per motivi lavorativi, causa un danno degenerativo permanente nel sistema nigro-striatale con la conseguente diminuzione della dopamina striatale. Questo avviene perché, come dimostrato in esperimenti condotti *in vivo*, il Mn stimola l'autossidazione della dopamina presente nei neuroni dopaminergici, un processo accompagnato dall'incremento della formazione delle specie reattive dell'ossigeno e dei chinoni (Desole M.S. et al 1997a; Desole M.S. et al 1997b; Benedetto A. et al 2009; Aschner M. et al 2009). Esperimenti *in vitro* condotti su cellule di feocromocitoma di ratto (PC12) in grado di produrre e secernere grandi quantità di dopamina, hanno, inoltre, dimostrato che il Mn porta all'apoptosi indotta da stress ossidativo (Serra P.A. et al 2000).

✓ MPTP: L'1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP) è un composto secondario che si viene a formare durante la sintesi dell'1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine (MPPP), un analogo della meperidina. L'MPTP agisce in maniera specifica a livello dei neuroni dopaminergici presenti sia nella *substantia nigra* che nello striato, ed è stato dimostrato che induce un grave e irreversibile MP nei primati umani e non-umani. L'MPTP è altamente lipofilo e in quanto tale riesce ad attraversare facilmente la barriera emato-encefalica, dove viene convertito nel metabolita tossico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+) dalle monoaminossidasi di tipo B (MAO B) localizzate nelle cellule gliali (Drechsel D.R. and Patel M. 2008; Desole M.S. et al 1997). L' MPP^+ prodotto viene, quindi, rilasciato nello spazio intracellulare (il meccanismo è ancora sconosciuto) e, tramite i trasportatori della dopamina (DAT), penetra all'interno dei neuroni dopaminergici dove può intraprendere due diverse vie: la prima via è rappresentata dall'alterazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale causata dall'inibizione dei complessi I, III e IV della catena respiratoria che provoca, non solo un blocco del flusso degli elettroni e un deficit di produzione di ATP, ma anche un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e in particolare di superossido. In entrambi i casi si ha morte cellulare (Przedborski S. et al 2000). Nella seconda via si ha una localizzazione dell' MPP^+ a livello del citosol del mitocondrio dove interagisce con diversi enzimi, come la NADH deidrogenasi, impedendo il passaggio degli elettroni prodotti dall'ossidazione del NADH attraverso il complesso I (Arif I.A. and Khan H.A. 2011).

✓ Dopamina: L'accumulo di dopamina nel citoplasma, causato dalla distruzione del sistema di stoccaggio del neurotrasmettitore nelle vescicole,

porta alla formazione di metaboliti reattivi e ROS attraverso due diverse vie: nella prima via, tramite la monoaminossidasi e l'aldeide deidrogenasi, la DA viene convertita in DOPAC e successivamente si ha la formazione di H_2O_2 ; nella seconda via si ha la formazione di ROS e la specie reattiva DA chinone. Esperimenti condotti sia *in vitro* che *in vivo* hanno, infatti, messo in evidenza che alte concentrazione di ROS e chinoni possono indurre un malfunzionamento dei mitocondri interferendo sul flusso degli elettroni nel complesso I della catena respiratoria e quindi sulla depolarizzazione della membrana mitocondriale, o portare ad una diminuzione della capacità fosforilativa di alcune proteine mitocondriali (Hastings T.G. 2009; Jana S. et al 2011). I ROS e i chinoni prodotti dall'ossidazione della dopamina possono formarsi seguendo due differenti vie: nella prima via, la dopamina viene metabolizzata, ad opera delle MAO, ad acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC) e H_2O_2 , e, se non intervengono antiossidanti come il GSH, quest'ultima reagisce con i metalli di transizione formando radicali idrossilici (OH^\cdot) che, a loro volta, si combinano con i lipidi, col DNA e con i residui amminoacidici presenti sulle proteine danneggiando la cellula. Nella seconda via, in presenza di metalli di transizione o enzimaticamente, la dopamina viene ossidata a dopamina chinone con la produzione di ROS. La dopamina chinone avendo un elettrone in meno va a reagire con diverse molecole tra cui i tioli liberi o localizzati nelle proteine, e, essendo importanti molecole con potere antiossidante, una loro alterazione risulta tossica per la cellula (Berman B. S. and Hastings T. G. 1999)

1.2.2 Fattori genetici

Diversi studi hanno dimostrato che solo il 20% dei casi di MP con esordio giovanile e non più del 3% dei pazienti con esordio tardivo sono affetti da

parkinsonismo su base genetica. Sono stati identificati 13 loci genici , noti come loci PARK) implicati nella MP a trasmissione autosomica dominante o recessiva e la loro identificazione ha dato un notevole contributo alla comprensione dei meccanismi neurodegenerativi. Tutti i geni finora identificati sembrano essere coinvolti in una complessa via patologica comune caratterizzata da uno squilibrio tra l'accumulo di aggregati proteici e la capacità dei neuroni di degradarli efficacemente dovuto ad un mal funzionamento del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Inoltre, sembrano essere coinvolte nell'alterazione del funzionamento dei mitocondri e dei processi ossidativi (Valente E.M. et al 2007; Malkus K.A. et al 2009; Thomas B. and Beal M.F. 2007). Come riportato nella Tabella 1, i geni coinvolti nella MP che vengono trasmessi in forma autosomica-dominante sono l' α -sinucleina (PARK1 e PARK4), la dardarina (Lrrk2 o PARK8), PARK3, l'Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1 o PARK5), PARK10 e PARK11; i loci genici trasmessi in forma autosomica-recessiva sono la Parkina (PARK2), la PTEN-induced kinase (PINK1 o PARK6), DJ1 (PARK7) e l'ATP-ase di tipo P (PARK9). Infine, per i locus genici PARK12 e HTRA2 (PARK13) non si sa ancora con certezza come vengano trasmessi (Thomas G. 2009).

Geni associati con la Malattia di Parkinson					
	Locus	Gene	Modalità di trasmissione	Funzione	Istologia
PARK1	<i>4q21</i>	α -sinucleina	dominante	Proteina presinaptica, forma corpi di Lewy	Corpi di Lewy α -sinucleina positivi
PARK2	<i>6q25</i>	parkina	recessiva	Ubiquitina E3 ligasi	Assenza di Corpi di Lewy o presenza di inclusi molto simili ai Corpi di Lewy
PARK3	<i>2p13</i>	sconosciuto	dominante	sconosciuta	sconosciuta
PARK4	<i>4q21</i>	triplicazione α -sinucleina	dominante	sconosciuta	Corpi di Lewy α -sinucleina positivi
PARK5	<i>4p14</i>	UCHL1	dominante	Ricicla l'ubiquitina polimerica trasformandolo in monomeri	sconosciuta
PARK6	<i>1p35-36</i>	PINK-1	recessiva	Proteina chinasi mitocondriale	sconosciuta
PARK7	<i>1p36</i>	DJ-1	recessiva	Chaperone, antiossidante	sconosciuta
PARK8	<i>12p11.2-q13.1</i>	LRRK2	dominante	Proteina chinasi	Corpi di Lewy α -sinucleina positivi; taupatia tipica per una PSP; degenerazione nigrostriatale aspecifica
PARK9	<i>1p36</i>	ATP13A2	recessiva	ATPasi lisosomiale	sconosciuta
PARK10	<i>1p32</i>	sconosciuto	dominante	sconosciuta	sconosciuta
PARK11	<i>2p13</i>	sconosciuto	dominante	sconosciuta	sconosciuta
PARK12	<i>Xq21-q25</i>	sconosciuto	sconosciuta	sconosciuta	sconosciuta
PARK13	<i>2p12</i>	HTRA2	sconosciuta	sconosciuta	sconosciuta

Tabella 1. Elenco delle proteine coinvolte nell'insorgenza del Morbo di Parkinson

✓ α -sinucleina (PARK1, PARK4): è un membro della famiglia delle sinucleine che include la β -sinucleina, la γ -sinucleina e la sinoretina. Il gene per l' α -sinucleina codifica per una piccola proteina (14 KDa) costituita da 140 amminoacidi. Strutturalmente è composta da una regione N-terminale ad alfa eliche anfipatica implicate nella interazione con prodotti lipidici, una regione centrale idrofobica contenente un dominio non-amiloide- β e una regione C-terminale acida (Lee F.J.S. and Liu F. 2008). È una proteina presinaptica localizzata nelle vescicole e nelle strutture membranose ed è coinvolta nei processi di riciclo delle vescicole sinaptiche, nell'immagazzinamento e nella compartimentalizzazione dei neurotrasmettitori. Tre mutazioni missenso (mutazioni puntiformi che danno origine ad un codone codificante per un diverso aminoacido) individuate nel gene codificante per la proteina α -sinucleina (A53T, A30P, e E46K), e la triplicazione del gene stesso, sono associati con la MP autosomica dominante (Thomas B. et al 2007). L' α -sinucleina sembra, inoltre, essere coinvolta nel malfunzionamento dei mitocondri (alterando la funzionalità del complesso I che porta alla produzione di specie reattive), nello stress ossidativo e nella compromissione del sistema di degradazione delle proteine (Malkus K.A. et al 2009).

✓ Parkina (PARK2): la parkina è coinvolta nel 50% dei casi di parkinsonismo ad esordio giovanile a trasmissione autosomica recessiva e nel 10-15% dei casi sporadici (Valente E.M. et al 2007). Il gene *parkina* codifica per una proteina di 465 amminoacidi con funzione di ubiquitina ligasi ed è implicata nelle funzione mitocondriali, nei processi ossidativi e anche nel funzionamento del sistema ubiquitina-proteasoma. La parkina è localizzata nei mitocondri delle cellule proliferanti e influenza positivamente

la biogenesi mitocondriale. Diversi studi dimostrano, inoltre, che la parkina modula l'espressione di proteine coinvolte nella regolazione del metabolismo energetico (subunità della piruvato deidrogenasi, complessi mitocondriali I e IV, ATP sintasi), e nello stress ossidativo. Infatti, modelli animali che non esprimono la parkina, o la esprimono in forma mutata, presentano disfunzioni mitocondriali e alterazioni nei processi ossidativi; mentre, una sovraespressione della proteina porta all'inibizione della perdita dei neuroni dopaminergici in animali esposti a sostanze quali l'MPTP. In esperimenti *in vitro*, invece, si è visto che una sovraespressione della parkina impedisce il rigonfiamento dei mitocondri, il rilascio di citocromo C e l'attivazione della caspasi 3, ma incrementa i livelli delle specie reattive causando quindi morte cellulare (Malkus K.A. et al 2009).

✓ Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL-1 o PARK5): UCHL-1 è una proteina molto abbondante nel cervello, infatti, rappresenta l'1-2% delle proteine totali. È un enzima che sembra essere coinvolto nella rimozione delle ubiquitine in posizione C-terminale e nel loro riciclo. Mutazioni a carico di PARK5 si correlano con una riduzione dell'attività enzimatica della proteina con conseguente alterazione del sistema ubiquitina-proteasoma. Non è ancora chiaro come UCHL-1 promuova la neurodegenerazione dei neuroni dopaminergici nei casi di MP familiare e neanche che ruolo abbia nel MP sporadica (Lee F.J.S. et al 2008; Klein C. et al 2007).

✓ PTEN (phosphatase and tensin) homolog - induced putative kinase 1 (PINK-1 o PARK6): È una proteina di 581 amminoacidi contenente una sequenza N-terminale con una sequenza specifica per i mitocondri e un dominio protein-chinasico altamente conservato, simile al dominio della

serina-treonina chinasi, appartenente alla famiglia delle calmoduline Ca^{2+} -dipendenti. Questo suggerisce che la proteina PINK-1 abbia una localizzazione mitocondriale. Diversi studi hanno dimostrato che PINK-1, in risposta allo stress cellulare, fosforila diverse proteine mitocondriali prevenendo il malfunzionamento dei mitocondri. Mutazioni a carico del gene che codifica PINK-1 causano un incremento della perossidazione lipidica, difetti nell'attività del complesso I mitocondriale e anche alterazioni della morfologia dei mitocondri stessi. Sia in modelli animali che *in vitro* si è visto che, quando l'espressione della proteina PINK-1 risulta inferiore rispetto alla norma, si ha un aumento dei markers dello stress ossidativo e un decremento della vitalità cellulare (Thomas B. et al 2007; Malkus K.A. et al 2009).

✓ DJ-1 (PARK7): DJ-1 è una proteina di 189 amminoacidi e, mutazioni a carico del gene che la codifica, sono la causa più rara di MP a trasmissione recessiva con una frequenza inferiore all'1% nei pazienti con esordio precoce della malattia (Valente E.M. et al 2007; Thomas B. et al 2007). Nel cervello dei ratti, DJ-1 è localizzata in parte nella matrice mitocondriale e negli spazi intermembranari, ma anche a livello del citosol (Dodson MW and Guo M 2007). Questa parziale localizzazione mitocondriale potrebbe riflettere un ruolo della proteina nelle funzioni mitocondriali. Sembra, infatti, che DJ-1 venga rilocalizzata durante lo stress ossidativo e che abbia funzione di scavenger delle specie reattive dell'ossigeno poiché porta ad un aumento dei livelli di glutatione in seguito all'attivazione dell'enzima glutammato-cisteina ligasi. Inoltre, DJ-1 ha funzione di chaperone redox-dipendente che inibisce l'aggregazione dell' α -sinucleina e quindi la morte cellulare. La sua funzione neuroprotettiva sembra sia dovuta anche alla sua

associazione con la parkina durante lo stress ossidativo (Thomas B. et al 2007).

1.3 Lrrk2 e il suo ruolo nella malattia di Parkinson

Il ruolo della dardarina nell'insorgenza del MP è stata scoperta solo nel 2004, anche se già nel 2002 sono state identificate le prime mutazioni a carico del gene *LRRK2* in una famiglia proveniente da Sagamihara (Giappone). Il gene viene trasmesso in maniera autosomica dominante (Greggio E. and Cookson M.R. 2009; Funayama M. et al 2002). Le mutazioni a carico di *LRRK2* sono la causa più importante del MP autosomico-dominante, infatti, sono state riscontrate nel 5-13% dei pazienti con Parkinson familiare e nel 1-5% dei casi di MP sporadico (Bonifati V. 2006; Lesage S et al 2006). Il gene *LRRK2*, composto da 51 esoni, codifica per la proteina dardarina (286 KDa) ed è localizzato sul cromosoma 12 in posizione 12p11-q13. Sono state identificate circa 30 mutazioni, molte delle quali portano alla sostituzione di aminoacidi situati nella porzione C-terminale della proteina. La mutazione principalmente riscontrata nei pazienti è localizzata in posizione Gly2019Ser e porta alla sostituzione del residuo aminoacidico glicina con il residuo aminoacido serina. Sono state identificate circa 30 mutazioni tra cui Arg1441Gly (R1441G), Arg1441Cys (R1441C), Arg1441His (R1441H), Ile1122Val (I1122V), Ile2020Thr (I2020T) e la Gly2385Arg (G2019S). La mutazione G2019S è molto rara nelle popolazioni asiatiche, sud africane e di alcune zone dell'Europa (Polonia, Grecia e Germania), ma rappresenta la più frequente sostituzione nelle popolazioni del Nord Africa (40.8% dei casi sporadici di MP e 37% dei casi familiari) e negli Ebrei Ashkenazi (13.3% dei casi sporadici di MP e 29.7% dei casi familiari). La penetranza della mutazione aumenta del 17% in pazienti con più di 50 anni e dell'85% in quelli con un'età di 70 anni (Kumari U. and Tan

E.K. 2009; Sierra M. et al 2011). Un'altra mutazione, meno frequente rispetto alla mutazione G2019S, è quella in posizione R1441C: è stata riscontrata inizialmente soltanto in due famiglie con MP autosomico dominante e ha un'alta incidenza (8%) solo nella popolazione Basca e in qualche altra regione della Spagna. Le manifestazioni cliniche sono differenti in base al tipo di mutazione ma, spesso, si hanno diversità anche tra pazienti che hanno la medesima mutazione: ad esempio pazienti con la mutazione G2019S presentavano corpi di Lewy (Ross O. A. et al 2006) e altri ne erano privi (Gaic C. et al 2007), un solo caso con G2019S presentava inclusioni positive per l'ubiquitina con gliosi e perdita dei neuroni della *substantia nigra* (Dachsel J. C. et al 2007); in una famiglia in cui tre membri presentavano la mutazione R1441C il primo manifestava α -sinucleopatia (presenza di corpi di Lewy), il secondo diminuzione del numero dei neuroni ma non erano presenti inclusioni citoplasmatiche e il terzo, infine, una taupatia con grovigli neurofibrillari (Zimprich A. et al 2004).

Le differenti manifestazioni patologiche riscontrate nei pazienti che presentavano il gene *LRRK2* mutato nella medesima posizione, hanno portato a supporre che la proteina è in grado di interagire con un ampio numero di molecole differenti e di portare all'insorgenza della malattia di Parkinson attraverso molteplici meccanismi.

1.3.1 Struttura, funzione e localizzazione

LRRK2 (Fig. 2) codifica per la proteina dardarina (Lrrk2 o LRRK2 o PARK8), una proteina chinasi composta da 2527 aminoacidi contenente 6 diversi domini funzionali conservati. Dall'N-terminale al C-terminale troviamo: un dominio ANK (regione di ripetizione dell'anchirina), un dominio LRR (Leucine-Rich repeat), un dominio ROC (un complesso Ras GTPasico), un

dominio ROC (C-terminale del complesso Ras), un dominio chinasi omologo alle MAP chinasi-chinasi-chinasi (MAPKKK) e un dominio WD40.

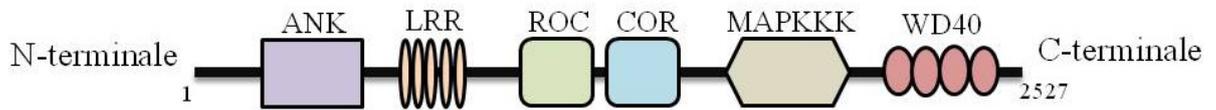


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'organizzazione dei 6 domini funzionali della proteina dardarina

Poiché l'interesse di questa proteina è collegato principalmente all'insorgenza di diverse malattie neurodegenerative e, nello specifico della malattia di Parkinson, alla diminuzione della quantità dopamina nella SNpc, sono stati condotti molteplici studi per stabilire con chi potesse interagire e dove si localizzasse.

Le funzioni fisiologiche di LRRK2 sono ancora poco chiare ma è stato identificato un importante ruolo associato alla sua attività chinasi. Diversi studi hanno dimostrato che per regolare tale attività, la proteina dimerizza e le regioni implicate sono: una regione N-terminale, il dominio ROC e il dominio WD40 (Greggio E. et al 2008; Deng J. et al 2008). Quando viene prodotta la proteina in forma WT l'attività chinasi è bassa e questo è probabilmente causato dalla mancanza di cofattori specifici per i diversi substrati (Lu Y.W. and Tan E.K. 2008, Greggio E. et al 2009, Kumar A. and Mark R. Cookson 2011). Quando invece viene prodotta la proteina mutata in posizione G2019S e R1441C si hanno modificazioni riguardanti l'attività chinasi e GTPasi. I dati ottenuti sono molteplici e spesso discordanti: in alcuni studi è stato osservato che entrambe le mutazioni portano ad incremento dell'attività chinasi (Iaccarino C. et al 2007). L'aumento dell'attività chinasi è dovuta al fatto che la mutazione G2019S, localizzata nel sito catalitico del dominio

MAPKKK, altera direttamente l'attività chinastica (Fig. 3) (Gandhi P.N. et al 2009); mentre la mutazione in posizione R1441C fa sì che la dardarina si trovi in uno stato di costante interazione con il GTP e che sia, quindi, capace di mantenere l'attività chinastica della proteina costitutivamente attiva (Fig. 3) (West A.B. et al 2005, Lewis P.A. et al 2007; Guo L. et al 2007). Altri studi, riguardanti nello specifico la proteina mutata in posizione R1441C, hanno messo in evidenza una mancata interazione tra il dominio COR e quello ROC e di conseguenza una diminuzione dell'attività GTPasica (Fig. 4) (Li Y. Et al 2009).

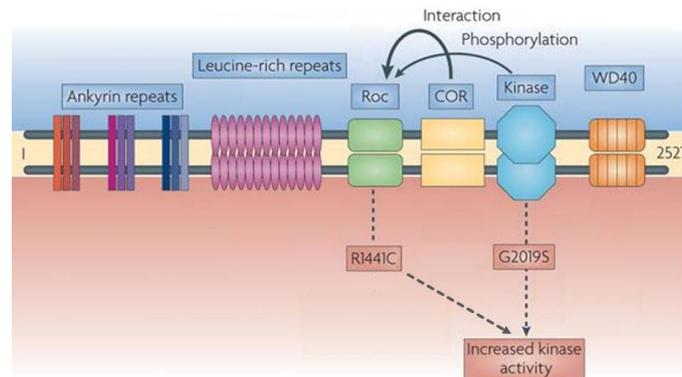


Figura 3. Influenza delle mutazioni R1441C e G2019S sull'aumento dell'attività chinastica

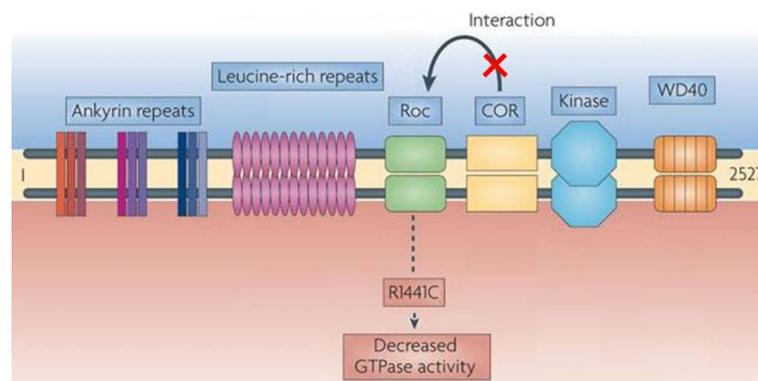


Figura 4. Meccanismo attraverso il quale la mutazione in posizione R1441C porta ad un decremento dell'attività GTPasica

Per quanto riguarda le interazioni proteiche, sono stati identificati legami con proteine del citoscheletro e proteine coinvolte nel *trafficking*. Per *trafficking* si intende l'insieme dei processi di spostamento delle proteine all'interno delle varie specifiche localizzazioni intracellulari in direzione dell'esterno, per la secrezione, oppure dall'esterno all'interno della cellula. Esperimenti *in vitro*, infatti, hanno evidenziato il legame di LRRK2 con la miosina, ezrina e radixina che regolano il legame della β -actina alla membrana plasmatica, con clatrina, vimentina (Santpere G. and Ferrer I. 2009). Nello specifico si è visto che il dominio LRR interagisce con la proteina Rab5a coinvolta nelle funzioni sinaptiche, nell'endocitosi delle vescicole sinaptiche e nel trafficking a livello delle sinapsi. Per quanto riguarda il dominio chinasi, dati ottenuti sia *in vivo* che *in vitro* dimostrano che si lega alla proteina chaperone Hsp90 e il suo co-chaperone (p50^{cdc37}), e tale legame sembra essere necessario per ripiegatura e la sua attivazione (Anand V.S. and Braithwaite S.P. 2009).

La localizzazione della proteina dardarina non è limitata solo al cervello, dove è espressa nei neuroni, negli astrociti e nella microglia, ma si trova anche in altri organi e tessuti come il cuore, il fegato e i reni (Santpere G. and Ferrer I. 2009). È stata, inoltre, identificata in diverse zone del cervello quali la corteccia cerebrale, l'ippocampo, il caudato-putamen, nello striato e in minore percentuale nella SNpc in associazione a granuli e vacuoli. Tuttavia, nei pazienti affetti da MP, è stata localizzata in un subset di corpi di Lewy positivi per l' α -sinucleina localizzati proprio nella SNpc (Melrose H. et al 2006; Santpere G. and Ferrer I. 2009; Higashi S. et al 2007). L'associazione con i corpi di Lewy α -sinucleina positivi è stata riscontrata anche *in vitro* (Greggio E. et al 2011). La forma WT di LRRK2 sembra essere associata a differenti compartimenti cellulari come l'apparato di Golgi, il citoplasma, i mitocondri, le vescicole sinaptiche, la membrana plasmatica e le zattere lipidiche. Queste ultime pare abbiano un ruolo

fondamentale nella trasduzione del segnale, nel *trafficking* delle proteine e anche nell'organizzazione del citoscheletro. Studi condotti da Hatano T. e i suoi collaboratori hanno messo in evidenza che la dardarina mutata non altera il legame con le zattere lipidiche (Hatano T. et al 2007). Altri studi mostrano, tuttavia, che la proteina mutata interferisce nella fusione delle vescicole con la membrana sinaptica e nella formazione dei prolungamenti dei neuroni (Santpere G. and Ferrer I. 2009; Ramonet D. et al 2011, Winner R. et al 2011).

1.4 La Microdialisi

La microdialisi è una tecnica dinamica che permette di monitorare le sostanze chimiche presenti nell'ambiente extracellulare (interstiziale) in condizioni fisiologiche, patologiche e in seguito a trattamenti farmacologici (Bazzu G. et al 2011; Bourne J.A. 2003; Benveniste H. et al 1989).

Si effettua tramite l'impianto di una sonda microdialitica semipermeabile nell'organo o nel tessuto che si intende monitorare. La sonda (Fig. 5), in grado di mimare le funzioni dei capillari sanguigni negli scambi tra il sangue e la popolazione cellulare, è costantemente perfusa da un ringer o da un medium tramite un inlet.

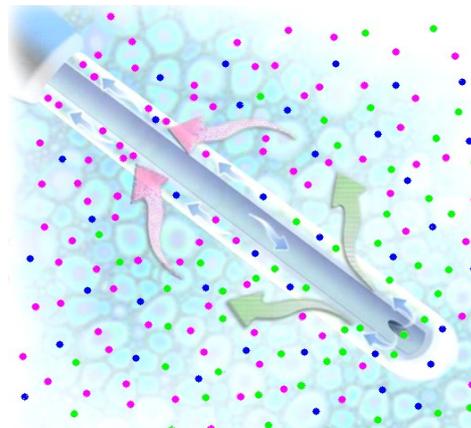


Figura 5. Rappresentazione di una sonda microdialitica

La membrana dialitica semipermeabile consente di separare il fluido extracellulare dal ringer o medium di perfusione e il movimento dei soluti avviene per diffusione secondo gradiente non essendo presente né un potenziale elettrico né una pressione osmotica.

Le molecole di interesse passano così all'interno della sonda e vengono recuperate tramite un outlet ed analizzate.

Durante l'esecuzione della microdialisi è importante tenere presente che il recovery è influenzato da diversi fattori quali:

- ✓ La lunghezza e il diametro della membrana dializzante: si ha un maggiore recovery quando l'area a contatto con il fluido extracellulare è maggiore;
- ✓ La velocità del flusso di perfusione: minore è il flusso minore è il tempo impiegato dalle sostanze per raggiungere un equilibrio tra il liquido extracellulare e il medium o ringer di perfusione;
- ✓ La temperatura: il coefficiente di diffusione aumenta di 1-2% per centigrado. Il recupero delle sostanze può, addirittura, essere incrementato del 30% se la temperatura raggiunge i 37°C;
- ✓ Coefficiente di diffusione: è inversamente proporzionale al valore del raggio del soluto e quindi anche al suo peso molecolare. Si ha quindi una relazione inversa tra recovery e peso molecolare;
- ✓ cut-off della membrana dialitica ovvero la dimensione dei pori della membrana: determina le dimensioni delle sostanze che possono diffondere tra i due compartimenti (come i neurotrasmettitori e altre sostanze a basso peso molecolare) e quelle che non possono attraversare la membrana (come le proteine).

La microdialisi può essere eseguita localmente in quasi tutti gli organi e tessuti del corpo incluso il sangue e permette di (Ross H.A. et al 2006):

- ✓ effettuare il campionamento continuo (ore o giorni) sulla stessa coltura cellulare o sullo stesso animale,
- ✓ causare un minimo danno invasivo nei tessuti e nella barriera emato-encefalica,
- ✓ recuperare dei campioni in cui sono presenti tutte le sostanze capaci di attraversare la membrana e le rende disponibili alle tecniche analitiche convenzionali,
- ✓ somministrare farmaci tramite il ringer o il medium di perfusione (per via retrodialitica).

2. SCOPO DELLA RICERCA

*Dott.ssa Ylenia Spissu – Studio del meccanismo di sintesi e rilascio della dopamina in cellule PC 12-ON
contenenti la dardarina (LRRK2) WT e mutata – Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche,
indirizzo Neuroscienze, Ciclo XXIV - Università degli Studi di Sassari*

Le mutazioni a carico del gene *LRRK2* portano ad una degenerazione dei neuroni dopaminergici della SNpc e alla formazione di aggregati proteici patologici causando MP a carattere autosomico dominante che spesso è indistinguibile dal MP idiopatico. Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare il ruolo della dardarina nella sintesi, nella secrezione e nel metabolismo della dopamina in cellule PC12 sia in condizioni basali, ovvero durante il rilascio spontaneo del neurotrasmettitore, che durante il rilascio indotto dalla nicotina.

3. MATERIALI E METODI

*Dott.ssa Ylenia Spissu – Studio del meccanismo di sintesi e rilascio della dopamina in cellule PC 12-ON
contenenti la dardarina (LRRK2) WT e mutata – Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche,
indirizzo Neuroscienze, Ciclo XXIV - Università degli Studi di Sassari*

3.1 Reagenti e soluzioni

La soluzione tampone fosfato (PBS) necessaria per gli esperimenti è stata preparata utilizzando NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na₂HPO₄ (8.1 mM), KH₂PO₄ (1.47 mM), CaCl₂ (1.19 mM), MgCl₂ (0.54 mM), e glucosio (7.5 mM) (Sigma Aldrich, Milano, Italia) e il pH della soluzione finale è stato portato a 7.4. Il buffer di lisi cellulare e la successiva denaturazione delle proteine necessari per la preparazione dei campioni prima del caricamento sul gel di SDS(sodio dodecil solfato)/poliacrilammide sono così composti: il primo contiene una soluzione di Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA (l'acido etilendiamminotetraacetico) 1 mM, NP40 1% e da inibitori delle protasi tra cui il phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma Aldrich, Milano, Italia); il buffer per la denaturazione è composto da Tris-HCl pH 6.8 50 mM, SDS 1%, Glicerolo 10%, β-mercaptoetanololo1% e da blu di bromo fenolo (Sigma Aldrich, Milano, Italia). Prima della denaturazione delle proteine viene effettuata una lettura per determinazione della loro concentrazione nel campione con il kit Bradford protein assay (Bio-Rad, Milano, Italia). Il gel in SDS/poliacrilammide per l'elettroforesi delle proteine con il Western Blot è composto da due porzioni: il lower gel e l'upper gel. Il lower gel è composto da acrilammide/bisacrilammide al 30% (Bio-Rad, Milano, Italia) e da un lower buffer contenente SDS al 4% e Tris HCl pH 6.8 0.5 mM (Sigma Aldrich, Milano, Italia); l'upper gel, invece, da acrilamide/bisacrilammide al 30% e da un upper buffer composto da SDS allo 0.4% e da Tris-HCl pH 8.8 1.5 mM. Il trasferimento delle proteine dal gel per l'elettroforesi alla membrana di nitrocellulosa viene eseguita mediante l'utilizzo di un Transfer Buffer composto da Glicina 37 mM, Tris-Hcl 125 mM e Metanolo 20% (Sigma Aldrich, Milano, Italia). La membrana in nitrocellulosa (Hybond C-Extra) e il kit necessario per la detection delle proteine in chemiluminescenza (ECL PLUS Western Blotting

Detection Reagents) sono stati acquistati dalla GE Healthcare (Milano, Italia). Gli anticorpi rabbit anti-Tyrosine Hydroxylase (1:4000), l'anticorpo anti-rabbit IgG (whole molecule)-HRP (1:16000), mouse anti-myc per identificare la dardarina (clone 9E10, 1:1000), mouse anti- β -actin (1:1000), goat anti-mouse-HRP, il polyethylene glycol sorbitan monolaurate (Tween[®] 20), e (-)-Nicotine hydrogen tartrate salt sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). La Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12, gli antibiotici streptomicina-penicillina, igromicina B, geneticina-G418, la doxiciclina e i reagenti utilizzati per la trasfezione (OPTIMEM, LIPO-plus e Lipofectamina LTX) sono stati acquistati dalla Invitrogen (Milano, Italia); mentre il Fetal Bovine Serum (FBS) Tetracycline free dalla Lonza Sales Ltd (Svizzera).

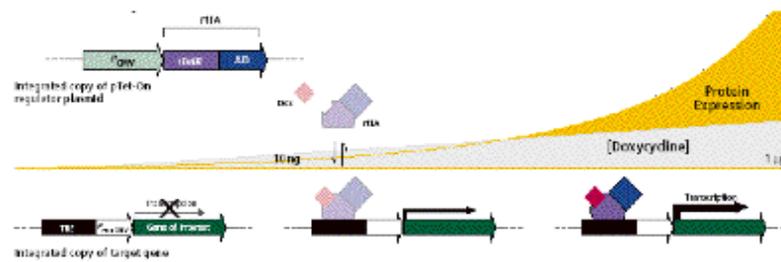
Per gli esperimenti di microdialisi sono stati utilizzati un medium di mantenimento composto da PBS a cui è stato aggiunto un 10% di Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12 (PBS + 10% DMEM/F12) e, per stimolare la secrezione di dopamina, una soluzione di Nicotina 5 mM disciolta in PBS + 10% DMEM/F12.

3.2 Il sistema d'espressione eucariotico inducibile tetraciclina-sensibile

Il sistema d'espressione eucariotico inducibile tetraciclina-sensibile si basa sugli elementi regolativi dell'operone procariotico per la resistenza alla tetraciclina contenuto nel trasposone Tn 10 di *E.coli*.

Come ogni sistema inducibile ricombinante prevede la somministrazione di un composto atossico, che può essere assorbito uniformemente, il quale è in grado di attivare in maniera specifica il transgene senza, però, interagire con alcun promotore endogeno.

Tet-ON



Tet-OFF

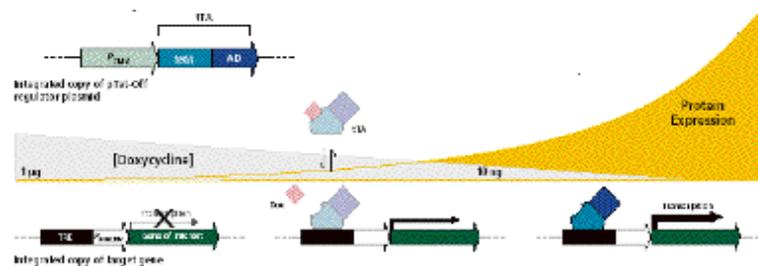


Figura 6. Schema di due sistemi sensibili alla tetraciclina: il sistema Tet-ON e il sistema Tet-OFF

Sono schematizzate in Fig. 6 le due tipologie esistenti di promotori sensibili alla tetraciclina disponibili in commercio:

- nel sistema originale “TET-OFF”, il transattivatore tTA, regolato dalla tetraciclina, non può legare il DNA in presenza dell’induttore;
- nel sistema inverso “TET-ON”, il transattivatore rtTA è in realtà un attivatore e lega il DNA solo quando è presente l’induttore.

Il sistema eucariotico “TET-ON” è stato quello da noi utilizzato, realizzato nel 1995, consta di tre componenti principali:

- un modulatore trascrizionale
- un promotore inducibile tetraciclina-sensibile
- l’antibiotico tetraciclina o il suo analogo doxiciclina.

Il modulatore trascrizionale è rappresentato da rtTA (reverse Tetraciclina-controlled Transactivator protein), un transattivatore chimerico ottenuto dalla

fusione del repressore procariotico Tet-R con il dominio di transattivazione trascrizionale della proteina VP16 del virus Herpes simplex; la sua attivazione dipende dal legame con l'antibiotico, il quale provoca un cambiamento conformazionale, che consente di legare la sequenza TRE (Tetraciclina-Responsive promoter Element) con affinità elevata. La sequenza TRE è costituita da 7 copie della sequenza operatore dell'operone tetraciclina ed è posta a monte di una TATA box e di un "sito d'inizio di trascrizione", che provengono dal promotore minimo eucariotico (Pmin) del citomegalovirus (CMV). L'antibiotico funge da induttore e attiva il modulatore trascrizionale, il quale si lega alla sequenza TRE permettendo l'inizio della trascrizione. La doxicillina è scelta per il suo basso costo, per la sua ampia disponibilità commerciale e perché attiva rtTA in maniera efficiente a dosi al di sotto dei livelli citotossici.

3.3 Inserimento dei cDNA di *LRRK2* nei vettori plasmidici pTRE2

Per ottenere l'espressione inducibile in cellule eucariotiche dei cDNA relativi al gene *LRRK2* nella forma WT, G2019S e R1441C è stato utilizzato il vettore plasmidico pTRE2. Quest'ultimo presenta un promotore sensibile alla tetraciclina come precedentemente illustrato. Il cDNA codificante per la proteina dardarina (*LRRK2*) (7584 nt) in forma WT e recante le mutazioni G2019S ed R1441C sono stati inseriti nel sito di restrizione *EcoRV* presente nel poli-linker di pTRE2.

3.4 Trasfezione con lipofectamina in cellule PC12-ON

Il protocollo utilizzato per la trasfezione si basa sull'utilizzo di liposomi commerciali:

- Circa 1×10^6 cellule PC12 sono state seminate in piastre Petri da 6 cm e lasciate crescere per circa 16 ore;
- In ogni eppendorf sterile porre 3,5 γ di DNA e diluirlo con 700 μ l di OPTIMEM e 3,5 μ l di LIPO-plus;
- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti;
- Aggiungere alla miscela 5,25 μ l di Lipofectamina LTX;
- Incubare per altri 30 minuti a temperatura ambiente;
- Versare il complesso DNA/LIPO-plus/Lipofectamina-LTX con molta cura e in modo uniforme nelle piastre;
- Incubare per 4 ore a 37°C;
- Sostituire il mezzo di coltura con il DMEM/F12 contenente siero.

3.5 Colture cellulari

Le 4 colture di cellule PC12 (PC12-ON, PC12-ON LRRK2 WT, PC12-ON LRRK2 R1441C e PC12-ON LRRK2 G2019S) sono tenute a 37°C in un ambiente umidificato con 5% CO₂. Per la crescita della linea di cellule PC 12-ON viene utilizzato un DMEM/F12 addizionato con 15% di FBS privo di tetraciclina, 0.2% μ g/ml geneticina-G418 e 1% streptomicina/penicillina. Per le linee di cellule PC12-ON contenenti il gene LRRK2 WT e mutate, invece, il terreno è composto da 15% di FBS privo di tetraciclina, 0.2% geneticina-G418, 0.2% di igromicina B e 1% streptomicina/penicillina. Le colture vengono utilizzate tra il 15° e il 20° passaggio. Per attivare il sistema di espressione genico TET-ON le cellule vengono trattate con la doxiciclina a diverse concentrazioni (0.2 μ g/ml e 1.0 μ g/ml) per 48 h, al termine delle quali la sospensione cellulare viene processata per eseguire gli esperimenti di microdialisi. Il protocollo utilizzato è il seguente:

- 1- Lavare la coltura nella petri per due volte con 5 ml di PBS + 10% DMEM/F12;
- 2- Staccare le cellule dal fondo della petri e utilizzare una pipette Pasteur per renderle *single cells*;
- 3- Recuperare una piccola aliquota della sospensione cellulare e contare il numero di cellule mediante la camera di Burker e il Trypan Bleu;
- 4- Centrifugare per 5 minuti a 94 g, aspirare il surnatante e risospendere il pellet in modo da ottenere 1×10^6 per 50 μ l;
- 5- Caricare la sospensione cellulare all'interno del capillare singolo.

3.6 Costruzione del capillare singolo per la microdialisi *in vitro*

Il capillare singolo adoperato per l'esecuzione della microdialisi delle 4 colture di cellule PC12 è stato costruito seguendo un disegno precedentemente ideato (Migheli R. *et al* 2008). Il capillare è stato costruito utilizzando una porzione di un tubo di silicone ricoperto di plastica (150 μ m o.d., 75 μ m i.d., Scientific Glass Engineering, Milton Keynes, UK), in cui è stata collocata una fibra da dialisi semipermeabile in poliacrilonitrile lunga 45 mm e avente una porzione attiva di 40 mm (AN-69, Hospal Industrie, Meyzieu, Francia). La sezione di tubo di silicone ricoperto di plastica è stata quindi posizionata al centro di un tubo di polietilene che ha la funzione di inlet (0.58 mm i.d., 35 mm long, Portex). Il dializzato ottenuto dalla fibra da dialisi in poliacrilonitrile viene raccolto da un secondo tubo in polietilene (0.58 mm i.d., 35 mm long, Portex) che serve da outlet. Tutte queste parti, che costituiscono la sonda microdialitica. Un'altra porzione di tubo di polietilene (0.58 mm i.d., 35 mm long, Portex) di 50 mm di lunghezza per il caricamento della sospensione delle cellule PC12, infine, viene posizionata parallelamente alla sonda microdialitica. La sonda microdialitica e il polietilene per il caricamento delle cellule vengono quindi

vengono e inserite in un capillare in vetro per microematocrito non-eparinizzato (7.5 mm long, 1.1 mm i.d., Chase Scientific Glass, Rockwood, IL, USA) e ricoperti da una colla epossidica a presa rapida. Il volume della camera da microdialisi è circa di 50 μ l.

3.7 Procedura della microdialisi

Dopo aver costruito la sonda microdialitica, questa viene perfusa con PBS + 10% DMEM/F12 utilizzando una pompa peristaltica a microinfusione a doppio canale (P720 peristaltic pump) che pompa PBS + 10% DMEM ad un flusso di 3.0 μ L/min. La pompa viene collegata all'inlet mediante un tubo di polietilene e dopo un periodo di stabilizzazione, nella camera microdialitica vengono caricati, per aspirazione, 1×10^6 cellule/ 50 μ L di sospensione cellulare di cellule PC 12 mediante l'utilizzo di una siringa da 1 ml collegata al tubo di polietilene precedentemente inglobato nel capillare singolo. Una volta caricate le cellule, il capillare microdialitico viene tenuto ad una temperatura di 37°C e ogni 20 minuti, 60 μ l di dializzato vengono raccolti in un eppendorf da 250 μ l collegato all'outlet. Passati 100 minuti dall'inizio dell'esperimento viene effettuato il trattamento, per infusione, con la Nicotina (5 mM) per un periodo di 60 minuti.

Successivamente, un'aliquota del dializzato pari a 35 μ l viene analizzata mediante un apparato cromatografico.

3.8 Analisi cromatografica del dializzato ottenuto dalla sospensione cellulare delle PC12

La DA e i suoi metaboliti vengono quantificati mediante HPLC–EC (*High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection*), utilizzando una pompa Alltech 426 HPLC (Alltech, Sedriano, Italia) fornita di un iniettore

Rheodyne (modello 7725, Rohnert Park, CA, USA), una colonna (15 cm x 4.6 mm i.d., ODS80TM C18, Toso Haas, Stuttgart, Germania), un detector elettrochimico ANTEC–Leyden EC controller (ANTEC, Zoeterwoude, The Netherlands), and a PC-based ADC system (Varian Star Chromatographic Workstation, Varian, Walnut Creek, CA, USA). La fase mobile è composta da acido citrico (0.1 M), acido etilendiaminotetracetico (EDTA, 1.0 mM), MeOH (8.7%), and sodio octilsolfato (48 mg/L), con un flusso di 1.2 ml/min e un pH di 2.9.

3.9 Western Blot

Il Western blot prevede il trasferimento di proteine separate mediante SDS-PAGE, il loro trasferimento su apposite membrane di nitrocellulosa ed la successiva visualizzazione mediante l'utilizzo di specifici anticorpi. Dopo aver lavato le colture cellulari con PBS freddo, viene effettuata la lisi cellulare mediante il buffer di lisi composto e i campioni vengono quindi centrifugati a 17000 g per 10 minuti ottenendo un sovrnatante chiaro. Si procede dunque con la determinazione della concentrazione delle proteine mediante l'utilizzo del kit Bradford protein assay, la denaturazione delle proteine con il Laemmli Buffer e il caricamento su SDS/PAGE di 20 γ di proteine totali. Terminata l'elettroforesi si effettua l'elettroblotting, ovvero, il trasferimento delle proteine dal gel SDS/poliacrilammide su una membrana di nitrocellulosa utilizzando il Transfert Buffer ad amperaggio costante (0,8 mA) per 2 h. Successivamente la membrana viene lavata con PBS per due volte e preibridata con 3% di latte disciolto in PBS + 0.05% Tween[®] 20 per 1 h a temperatura ambiente. Si procede quindi con l'incubazione della membrana a 4° C per 16 h in agitazione con l'anticorpo primario specifico per le proteine di nostro interesse (diluito in latte 3%+PBS+Tween 20). Dopo tale periodo di tempo la membrana viene incubata

con l'anticorpo secondario (anti-mouse e anti-rabbit) per 1 h, si lava con PBS+ Tween 20 per 3 volte e, infine, si procede con lo sviluppo mediante reazione chemiluminescente utilizzando una soluzione composta da un ECL Plus substrate (Reagente A) e da acridan disciolto in diossano ed etanolo (Reagente B). Quando tale soluzione entra in contatto con l'enzima presente sull'anticorpo secondario si producono dei fotoni che vengono poi rilevati mediante lo strumento ChemiDocTM XRS permettendoci di visualizzare delle bande corrispondenti alle proteine di nostro interesse.

3.10 Vitalità cellulare

La vitalità cellulare viene valutata sulla stessa sospensione cellulare, mediante l'utilizzo del Trypan Blue, prima che abbia inizio l'esperimento e dopo cinque ore dall'inizio della microdialisi cellulare, ovvero alla fine dell'esperimento. Per ciascun esperimento il tasso di vitalità è dato dalla differenza tra la percentuale finale e iniziale delle cellule non vitali e la differenza tra le cellule non vitali in ogni camera microdialitica.

4.RISULTATI

*Dott.ssa Ylenia Spissu – Studio del meccanismo di sintesi e rilascio della dopamina in cellule PC 12-ON
contenenti la dardarina (LRRK2) WT e mutata – Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche,
indirizzo Neuroscienze, Ciclo XXIV - Università degli Studi di Sassari*

4.1 Espressione della dardarina e della tirosina idrossilasi nelle cellule PC 12-ON

Nella figura 7 sono riportati i risultati ottenuti mediante la tecnica del Western Blot. Come si può notare, dopo incubazione con doxiciclina 1 µg/ml per 48h, la quantità di dardarina umana (hLRRK2) WT e mutata (R1441C e G2019S) è identica in tutti i ceppi. I dati mostrano, inoltre, che il trattamento con la doxiciclina non altera la produzione di TH.

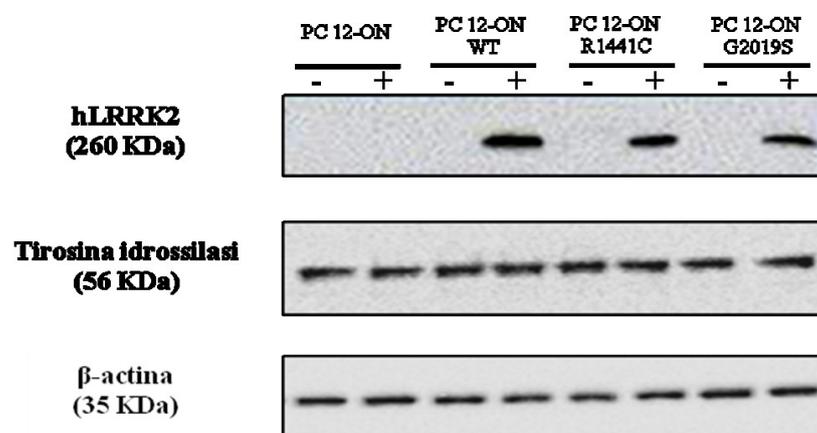


Figura 7. Effetti della doxiciclina 1.0 µg/ml sull'espressione di LRRK2 e il suo effetto sull'espressione della TH

4.2 Effetti della dardarina WT e mutata sulla dopamina e i suoi metaboliti nell'intra- e nell'extracellulare delle PC 12 -ON

Dopo incubazione con doxiciclina 1.0 µg/ml per 48h, è stato valutato il contenuto intracellulare ed extracellulare sia della dopamina che dei suoi metaboliti (DOPAC, HVA ed 3-MT). Come mostrato nella figura 8 il contenuto intracellulare di dopamina nelle cellule di controllo PC 12-ON rimane invariato sia in presenza che in assenza di doxiciclina. Si riscontra un significativo aumento ($p < 0.05$) di dopamina, dopo l'espressione genica, in tutti i ceppi rispetto alle PC 12-ON e un particolare aumento ($p < 0,05$) nei ceppi contenenti

la mutazione R1441C e la forma WT rispetto al corrispondente controllo. Le cellule contenenti la mutazione G2019S si discostano da questo andamento e presentano una riduzione di DA, anche se non significativa, rispetto al proprio controllo.

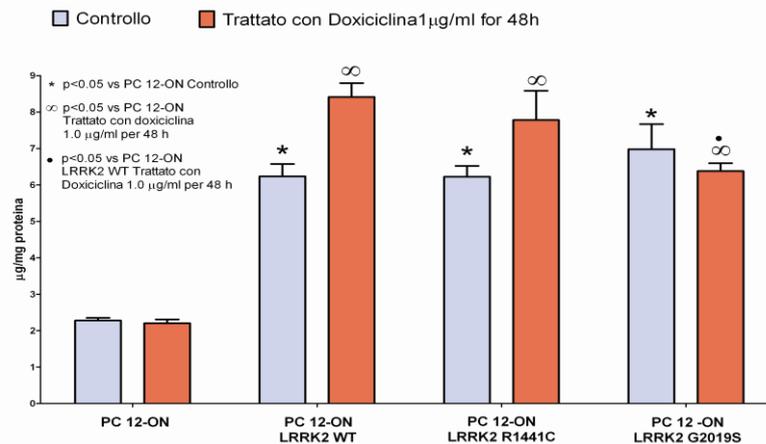


Figura 8. Effetti della dardarina sul contenuto intracellulare di DA

Per quanto riguarda il metabolismo della dopamina (espresso come la somma di DOPAC+HVA), nella figura 9 possiamo notare che in tutti i ceppi di cellule PC 12-ON che contengono e/o esprimono LRRK2 in forma WT e mutata si ha un aumento significativo ($p < 0.05$) del catabolismo rispetto al ceppo di controllo PC 12-ON. Si ha un aumento, inoltre, anche se non significativo, del catabolismo nei ceppi che esprimono LRRK2 WT e mutata in posizione R1441C rispetto al controllo. Confrontando le cellule che esprimono LRRK2 G2019S con il loro controllo possiamo notare, invece, una riduzione della produzione DOPAC+HVA. Inoltre, si può osservare una riduzione significativa ($p < 0.05$) del catabolismo nelle cellule che esprimono LRRK2 G2019S e LRRK2 R1441C rispetto alle cellule che esprimono la forma WT. Infine, la diminuzione del metabolismo della dopamina evidenziato nelle PC

12-ON LRRK2 G2019S risulta significativo ($p < 0.05$) anche rispetto alle PC 12-ON LRRK2 R1441C.

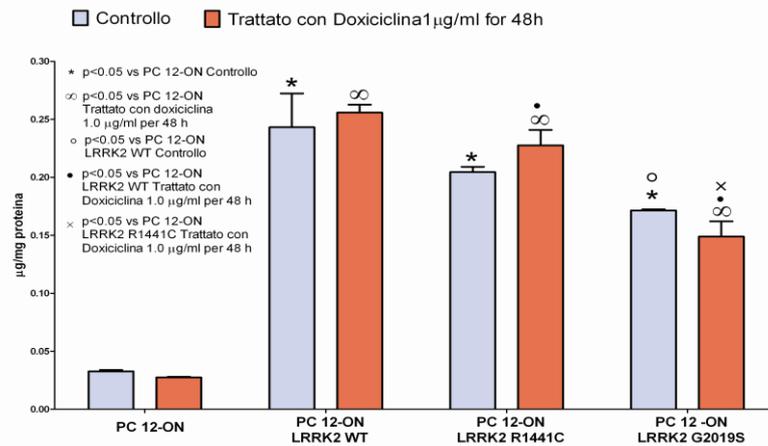


Figura 9. Effetto della dardarina sul catabolismo intracellulare della dopamina espresso come DOPAC+HVA

Nella figura 10 sono riportati i valori di dopamina espressa come la somma di DA+3-MT: si considera la somma in quanto la dopamina che viene secreta viene immediatamente metabolizzata a 3-MT.

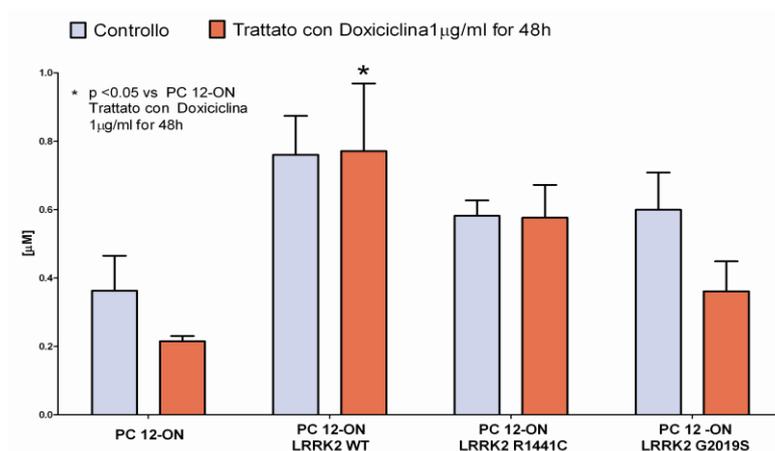


Figura 10. Effetti della dardarina sul contenuto extracellulare di DA (DA+3-MT)

Possiamo notare che la quantità di dopamina rilasciata nel medium sia dalle PC 12-ON che dalle PC 12-ON LRRK2 G2019S, dopo l'incubazione con doxiciclina 1µg/ml per 48 h, risulta inferiore rispetto al proprio controllo. Al contrario, le cellule che esprimono la dardarina in forma WT e mutata in posizione R1441C non mostrano differenze quando paragonate al proprio controllo. Confrontando le PC 12-ON LRRK2 WT-R1441C-G2019S con il ceppo di controllo PC 12-ON possiamo notare un aumento della secrezione della dopamina, ma solo le PC 12-ON LRRK2 WT che esprimono la proteina risultano significative ($p < 0.05$) rispetto alle PC 12-ON.

Per quanto riguarda il metabolismo extracellulare della dopamina (Fig. 11) è possibile notare un aumento significativo ($p < 0.05$) del catabolismo delle PC 12-ON LRRK2 WT-R1441C-G2019S rispetto alle PC 12-ON sia nei controlli sia dopo espressione genica indotta con doxiciclina 1µg/ml per 48 h.

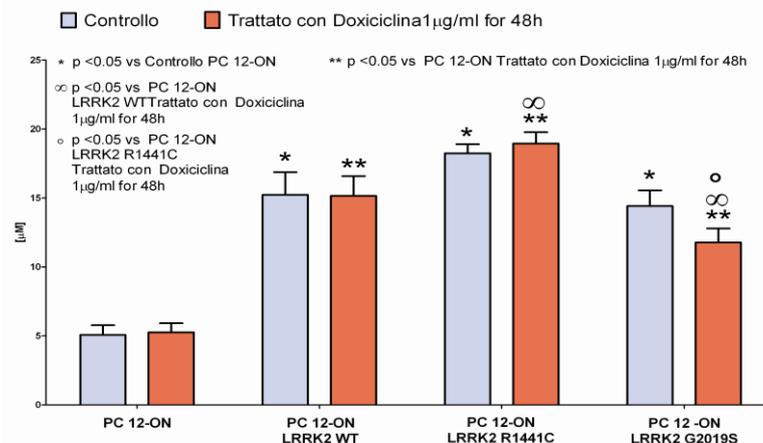


Figura 11. Effetto della dardarina sul catabolismo extracellulare della dopamina (DOPAC+HVA)

Nella figura 11 è evidente, inoltre, che esiste una differenza significativa ($p < 0.05$) tra i ceppi che esprimono la forma mutata e quelli che esprimono la forma WT: nelle cellule che esprimono LRRK2 R1441C si ha un aumento della produzione di DOPAC+HVA, mentre nelle cellule che esprimono LRRK2

G2019S si ha una riduzione del metabolismo. La riduzione del catabolismo evidenziato nelle PC 12-ON LRRK2 G2019S, dopo l'incubazione con doxiciclina 1 $\mu\text{g/ml}$, risulta significativa anche quando confrontata con le PC 12-ON LRRK2 R1441C.

4.3 Secrezione e metabolismo basale della dopamina in cellule PC 12-ON che esprimono PARK8

I dati ottenuti mediante la tecnica della microdialisi relativi alla secrezione basale o spontanea di DA (DA+3-MT) (Fig 12) non mostrano differenze tra i diversi ceppi quando non viene stimolata l'espressione genica, ovvero quando il sistema di espressione non viene attivato con l'aggiunta di doxiciclina.

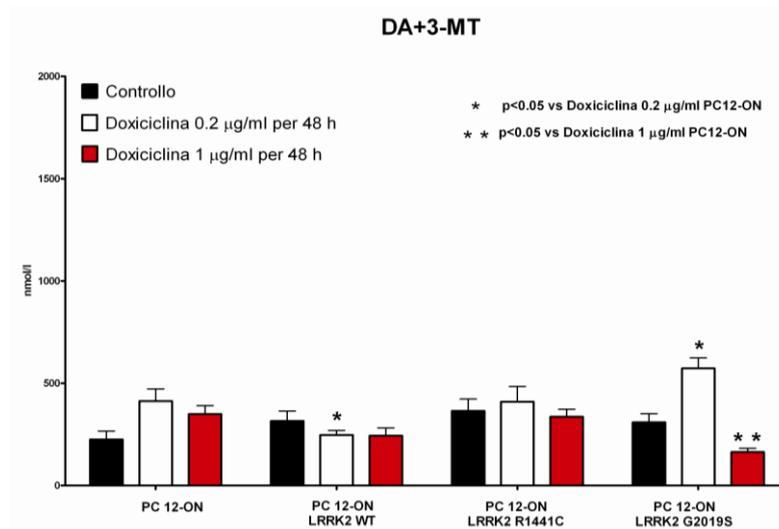


Figura 12. Secrezione spontanea della dopamina (DA+3-MT) in seguito all'espressione della dardarina stimolata con diverse concentrazioni di doxiciclina per 48h

Quando l'espressione della dardarina viene stimolata con la doxiciclina 0.2 $\mu\text{g/ml}$ per 48h si evidenzia una differenza significativa ($p < 0.05$) nelle PC 12-ON LRRK2 WT e nelle PC 12-ON LRRK2 G2019S, rispetto alle cellule di

controllo PC 12-ON: nelle prime si ha una riduzione della secrezione di dopamina, mentre nelle seconde un aumento. Quando l'espressione di LRRK2 viene stimolata con la doxiciclina 1.0 µg/ml per 48h, si ha una variazione significativa ($p < 0.05$) solo nelle PC 12-ON LRRK2 G2019S espressa come una riduzione della secrezione della dopamina rispetto alle PC 12-ON.

Per quanto riguarda il catabolismo della dopamina (Fig. 13), solo le PC 12-ON LRRK2 WT hanno un significativo aumento ($p < 0.05$) della produzione di DOPAC+HVA quando non trattate con doxiciclina rispetto alle PC 12-ON. Dopo incubazione con doxiciclina 0.2 µg/ml per 48h, i ceppi che mostrano una riduzione significativa ($p < 0.05$) nel catabolismo rispetto alle PC 12-ON, sono esclusivamente le PC 12-ON LRRK2 WT e le PC 12-ON LRRK2 R1441C. Infine, dopo trattamento con doxiciclina 1.0 µg/ml e quindi quando l'espressione della dardarina è massima, sia nel ceppo contenente la forma WT sia in quelli contenenti le due forme mutate, si ha una riduzione significativa ($p < 0.05$) del metabolismo della DA.

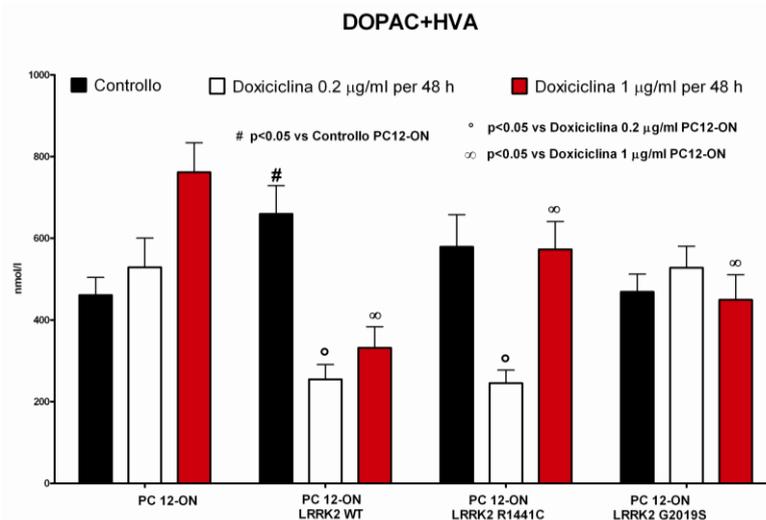


Figura 13. Effetti della diversa espressione della dardarina sul catabolismo della dopamina

4.4 Effetti di LRRK2 sulla secrezione e il metabolismo della dopamina in cellule PC12-ON stimulate con la Nicotina

In Figura 14 sono mostrati i risultati ottenuti in seguito all'espressione della dardarina e la successiva stimolazione della secrezione di DA (DA+3-MT) con la Nicotina 5mM. Possiamo notare che, quando l'espressione viene indotta con doxiciclina 0.2 µg/ml, solo i ceppi che esprimono la dardarina mutata mostrano una variazione nella secrezione di dopamina: si ha, infatti, un significativo aumento ($p < 0.05$) sia nelle PC 12-ON LRRK2 R1441C sia nelle PC 12-ON LRRK2 G2019S se confrontate con le PC 12-ON. Quando l'espressione viene indotta con doxiciclina 1µg/ml, ovvero quando l'espressione della dardarina è massima, si ha una riduzione significativa ($p < 0.05$) solo nelle PC 12-ON LRRK2 G2019S rispetto alle PC 12-ON.

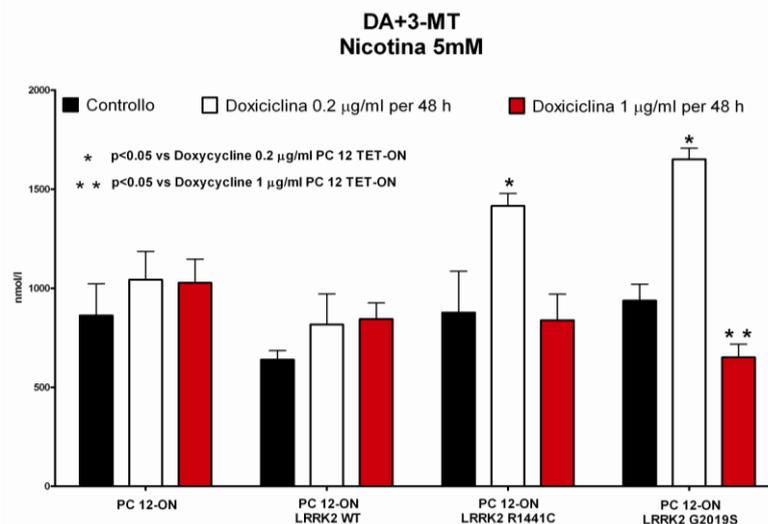


Figura 14. Secrezione indotta della dopamina (DA+3-MT) con Nicotina 5mM in seguito all'espressione della dardarina stimolata con diverse concentrazioni di doxiciclina per 48h

Nella figura 15 sono riportati i dati relativi al catabolismo della dopamina dopo incubazione con diverse concentrazioni di doxiciclina (0.2 µg/ml e 1.0 µg/ml) per 48 e la successiva stimolazione con la nicotina 5mM. Possiamo

notare che i ceppi trattati con la sola nicotina non mostrano differenze significative rispetto alle PC 12-ON. Non sono presenti differenze tra i diversi ceppi anche quando vengono incubati con doxiciclina 0.2 $\mu\text{g/ml}$ per 48 h e successivamente con la nicotina 5 mM. Al contrario, è evidente una significativa riduzione nella produzione di DOPAC+HVA tra i ceppi contenenti il gene in forma WT o mutata quando vengono incubate con doxiciclina 1.0 $\mu\text{g/ml}$ per 48 h e con nicotina 5 mM.

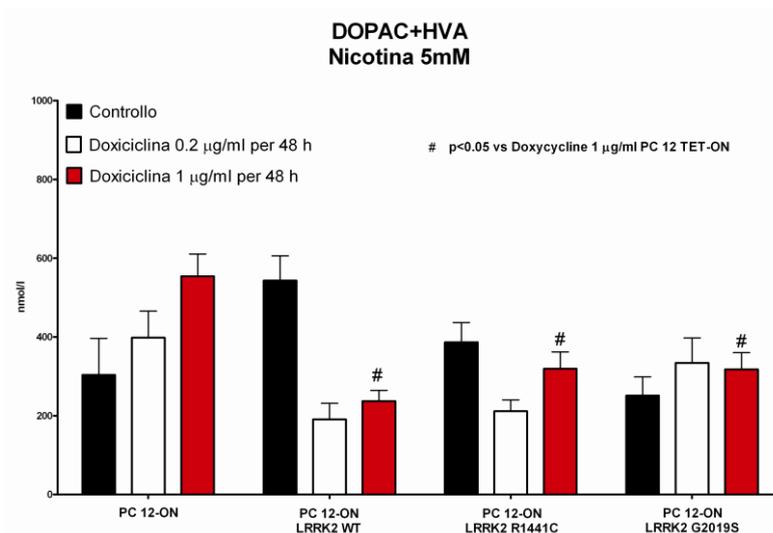


Figura 15. Effetti della diversa espressione della dardarina sul catabolismo della dopamina dopo trattamento con Nicotina 5mM

5. DISCUSSIONE

*Dott.ssa Ylenia Spissu – Studio del meccanismo di sintesi e rilascio della dopamina in cellule PC 12-ON
contenenti la dardarina (LRRK2) WT e mutata – Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche,
indirizzo Neuroscienze, Ciclo XXIV - Università degli Studi di Sassari*

Le mutazioni a carico del gene *LRRK2* sono state riscontrate nel 5-13% dei pazienti con Parkinson familiare e nel 1-5% dei casi di MP sporadico (Bonifati V. 2006; Lesage S et al 2006). In questa popolazione di pazienti, nonostante l'omogeneità del fenotipo clinico, si ha un'eterogeneità nell'età di insorgenza e nelle caratteristiche neurologiche. Le mutazioni principalmente studiate sono due: la Gly2019Ser o G2019S localizzata sul dominio chinasi, e la Arg1441Cys o R1441C localizzata sul dominio GTPasi. L'espressione della dardarina mutata, non solo causa l'alterazione dell'attività chinasi, ma induce una serie di modificazioni che impediscono il corretto funzionamento del sistema dopaminergico tra cui la mancata fusione delle vescicole con la membrana sinaptica con conseguente riduzione della secrezione della dopamina (Santpere G. and Ferrer I. 2009; Tong Y. et al 2009; Ramonet D. 2011; Li X. et al 2010).

I risultati del presente studio, ottenuti su cellule PC 12-ON che esprimono la dardarina WT e mutata sotto il controllo della doxigenina, confermano quanto ottenuto dai pochi studi effettuati in precedenza sulla secrezione e il metabolismo della dopamina, e danno informazioni sulla sua sintesi. In relazione a quest'ultima, si è stabilito, infatti, che l'espressione della proteina (WT e *LRRK2*^{G2019S,R1441C}) non interferisce con l'espressione della TH e in particolare che la quantità di enzima prodotto risulta identica sia nelle cellule che esprimono *LRRK2* WT e mutata, che nei controlli.

Il coinvolgimento di *LRRK2* nella secrezione e nel metabolismo della dopamina è stato valutato considerando le variazioni di concentrazione di DA, DOPAC, HVA e 3-MT nell'intracellulare e nell'extracellulare in modo statico e in modo dinamico mediante la tecnica della microdialisi. I risultati ottenuti nell'intracellulare in seguito al trattamento con doxigenina 1.0 µg/ml (Fig. 8) mettono in evidenza che, nonostante in tutti i ceppi ci sia un aumento

significativo del contenuto di DA rispetto alle PC 12-ON, solo il ceppo che esprime LRRK2^{G2019S} mostra una significativa riduzione della quantità di dopamina presente all'interno delle cellule rispetto alle PC 12-ON LRRK2 WT. Nell'extracellulare (Fig. 10) dopo trattamento con doxiciclina 1.0 µg/ml per 48 h, invece, solo le PC 12-ON LRRK2 WT mostrano un aumento significativo nella secrezione di dopamina (DA+3-MT) rispetto alle PC 12-ON. Analizzando i dati riguardanti il metabolismo della dopamina (produzione di DOPAC+HVA) si osserva lo stesso andamento sia nell'intra- che nell'extracellulare (Fig. 9 e Fig. 11). Le PC 12-ON LRRK2 WT-R1441C-G2019S mostrano, infatti, un catabolismo superiore rispetto alle PC 12-ON. Dai risultati ottenuti sulla secrezione di DA nelle cellule che esprimono LRRK2^{G2019S} è possibile ipotizzare una correlazione tra l'inibizione del rilascio della dopamina e l'espressione della dardarina. Per quanto riguarda l'aumento del catabolismo della DA, invece, al momento non è stata ancora formulata nessuna ipotesi. Per confermare ulteriormente l'effettivo coinvolgimento della dardarina mutata nella secrezione ed nel metabolismo della dopamina, sono stati condotti degli esperimenti di microdialisi in cui l'espressione genica viene modulata con due diverse concentrazioni di doxiciclina. Confrontando il contenuto del dializzato (Fig. 12) si evidenzia che, quando le cellule vengono trattate con basse dosi di doxiciclina, la secrezione di dopamina rispetto alle PC 12-ON nelle cellule PC 12-ON LRRK2 WT risulta ridotta, mentre nelle PC 12-ON LRRK2 G2019S risulta superiore. Dopo il trattamento con alte dosi di doxiciclina (Fig. 12), invece, si evidenzia una riduzione significativa della secrezione di DA solo nelle PC 12-ON LRRK2 G2019S rispetto alle PC 12-ON (Ramonet D. et al 2011). Per quanto riguarda il catabolismo (Fig. 13) i dati mostrano che nelle PC 12-ON LRRK2 WT la quantità di DOPAC+HVA prodotta rimane invariata quando trattate con basse dosi di doxiciclina. In tutti gli altri ceppi trattati con le due

diverse concentrazioni di doxiciclina, invece, è presente una riduzione del metabolismo della dopamina rispetto alle PC 12-ON. Ulteriori studi di microdialisi sono stati condotti stimolando le cellule con la nicotina per valutare l'eventuale incremento del rilascio di dopamina. Si è evidenziato così che all'aumentare della dose di doxiciclina si ha una riduzione della secrezione e del metabolismo di dopamina nei ceppi che esprimono la dardarina mutata.

Dai dati appena discussi si può ipotizzare che la dardarina WT o mutata non interferisce nella sintesi della dopamina ma ne altera la secrezione e il metabolismo.

6. BIBLIOGRAFIA

*Dott.ssa Ylenia Spissu – Studio del meccanismo di sintesi e rilascio della dopamina in cellule PC 12-ON
contenenti la dardarina (LRRK2) WT e mutata – Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche,
indirizzo Neuroscienze, Ciclo XXIV - Università degli Studi di Sassari*

Anand V.S, Braithwaite S.P. LRRK2 in Parkinson's disease: biochemical functions. *FEBS J.* **276(22)**:6428-35, 2009

Arif IA, Khan HA. Environmental toxins and Parkinson's disease: Putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. *Toxicology and Industrial Health.* **26(2)**: 121-128, 2011

Aschner M, Erikson KM, Herrero Hernández E, Tjalkens R. Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology. *Neuromolecular Med.* **11(4)**:252-66, 2009

Bazzu G, Biossa A, Farina D, Spissu Y, Dedola S, Calia G, Puggioni G, Rocchitta G, Migheli R, Desole MS, Serra PA. Dual asymmetric-flow microdialysis for in vivo monitoring of brain neurochemicals. *Talanta.* **85(4)**:1933-40, 2011

Benedetto A, Au C, Aschner M. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. *Chem Rev.* **109(10)**:4862-84, 2009

Benveniste, H. Introduction to intracerebral microdialysis. In: T.E. Robinson and J.B. Justice. Microdialysis in the Neurosciences. *Elsevier Science Publishers B.V.* 1991

Berman BS, Hastings TG. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.* **73(3)**:1127-37, 1999

Dott.ssa Ylenia Spissu – Studio del meccanismo di sintesi e rilascio della dopamina in cellule PC 12-ON contenenti la dardarina (LRRK2) WT e mutata – Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche, indirizzo Neuroscienze, Ciclo XXIV - Università degli Studi di Sassari

- Bonifati V. Parkinson's disease: the LRRK2-G2019S mutation: opening a novel era in Parkinson's disease genetics. *Eur J Hum Genet.* **14(10)**:1061-2, 2006
- Bourne JA. Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **30(1-2)**:16-24, 2003
- Coskun P, Wyrembak J, Schriener SE, Chen HW, Marciniack C, LaFerla F, Wallace DC. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* doi:10.1016/j.bbagen.2011.08.008, 2011
- Dächsel JC, Behrouz B, Yue M, Beevers JE, Melrose HL, Farrer MJ. A comparative study of Lrrk2 function in primary neuronal cultures. *Parkinsonism Relat Disord.* **16(10)**:650-5, 2007
- Deng J, Lewis PA, Greggio E, Sluch E, Beilina A, Cookson MR. Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *PNAS.* **105 (5)**:1499-1504, 2008
- De Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology.* **5(6)**: 525- 535, 2006
- Desole M.S. Esposito G, Migheli R, Sircana S, Delogu MR, Fresu L, Miele M, de Natale G, Miele E. Glutathione deficiency potentiates manganese toxicity in rat striatum and brainstem and in PC12 cells. *Pharmacol Res.* **36(4)**:285-92, 1996

- Desole MS, Sciola L, Delogu MR, Sircana S, Migheli R, Miele E. Role of oxidative stress in the manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurochem Int.* **31(2)**:169-76, 1997
- Dodson MW and Guo M. Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology.* 17:331-337, 2007
- Drechsel DR, Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.*, **44(11)**:1873-86, 2008
- Funayama, M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2–q13.1. *Ann. Neurol.* **51(3)**: 296-301, 2002
- Gaic C, Martí MJ, Ezquerra M, Rey MJ, Cardozo A, Tolosa E. G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **78(6)**:626-8, 2007
- Gandhi PN, Chen SG, Wilson-Delfosse AL. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2): A Key Player in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience Research.* **87**:1283–1295, 2009
- Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV. Complex I and Parkinson's Disease. *IUBMB Life.* **52**: 135-41, 2001

- Greggio E, Cookson MR. Leucine-rich repeat kinase 2 mutations and Parkinson's disease: three questions. *ASN Neuro*. **1(1)**, 2009
- Greggio E, Zambrano I, Kaganovich A, Beilina A, Taymans JM, Daniëls V, Lewis P, Jain S, Ding J, Syed A, Thomas KJ, Baekelandt V, Cookson MR. The Parkinson disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) is a dimer that undergoes intramolecular autophosphorylation. *J Biol Chem*. **283(24)**:16906-14, 2008
- Greggio E, Taymans JM, Zhen EY, Ryder J, Vancraenenbroeck R, Beilina A, Sun P, Deng J, Jaffe H, Baekelandt V, Merchant K, Cookson MR. The Parkinson's disease kinase LRRK2 autophosphorylates its GTPase domain at multiple sites. *Biochem Biophys Res Commun*. **389(3)**:449-54, 2009
- Greggio E, Bisaglia M, Civiero L, Bubacco L. Leucine-rich repeat kinase 2 and alpha-synuclein: intersecting pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Mol Neurodegener*. **6(1)**:6, 2011
- Guo L, Gandhi PN, Wang W, Petersen RB, Wilson-Delfosse AL, Chen SG. The Parkinson's disease-associated protein, leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), is an authentic GTPase that stimulates kinase activity. *Exp Cell Res*. **313(16)**:3658-70, 2007
- Ross HA, Van Gorp PJ, Willemsen JJ, Lenders JWM, Tack CJ, Sweep FCGJ. Transport within the Interstitial Space, Rather Than Membrane Permeability, Determines Norepinephrine Recovery in Microdialysis. *The*

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **319**:840–846, 2006

Hastings TG. The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr.* **41(6)**:469-72, 2009

Hatano T, Kubo S, Imai S, Maeda M, Ishikawa K, Mizuno Y, Hattori N. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum Mol Genet.* **16(6)**:678-90, 2007

Higashi S, Biskup S, West AB, Trinkaus D, Dawson VL, Faull RL, Waldvogel HJ, Arai H, Dawson TM, Moore DJ, Emson PC. Localization of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain. *Brain Res.* **1155**:208-19, 2007

Hindle JV. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age and Ageing.* **39**: 156–161 2010

Iaccarino C, Crosio C, Vitale C, Sanna G, Carri MT, Barone P. Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Hum Mol Genet.* **16(11)**:1319-26. 2007

Jana S, Sinha M, Chanda D, Roy T, Banerjee K, Munshi S, Patro BS, Chakrabarti S. Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: Implications in dopamine cytotoxicity and

pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1812**: 663–673, 2011

Klein C, Djarmati A, Hedrich K, Schäfer N, Scaglione C, Marchese R, Kock N, Schüle B, Hiller A, Lohnau T, Winkler S, Wiegers K, Hering R, Bauer P, Riess O, Abbruzzese G, Martinelli P, Pramstaller PP. PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur J Hum Genet*. **13(9)**:1086-93, 2007

Kumar A. and Mark R. Cookson. Role of LRRK2 kinase dysfunction in Parkinson disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. **13**: e20, 2011

Kumari U and Tan EK. LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from patients. *FEBS Journal*. **276**: 6455–6463, 2009

Lee FJS, Liu F. Genetic factors involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res Rev*. **58(2)**:354-64, 2008

Lewis PA, Greggio E, Beilina A, Jain S, Baker A, Cookson MR. The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun*. **357(3)**:668-71, 2007

Lesage S, Dürr A, Brice A. LRRK2: a link between familial and sporadic Parkinson's disease? *Pathol Biol (Paris)*. **55(2)**:107-10, 2006

Li X, Patel JC, Wang J, Avshalumov MV, Nicholson C, Buxbaum JD, Elder GA, Rice ME, Yue Z. Enhanced striatal dopamine transmission and motor

performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S. *J Neurosci.* **30(5)**:1788-97, 2010

Li Y, Dunn L, Greggio E, Krumm B, Jackson GS, Cookson MR, Lewis PA, Deng J. The R1441C mutation alters the folding properties of the ROC domain of LRRK2. *Biochim Biophys Acta.* **1792(12)**:1194-7, 2009

Lu YW, Tan EK. Molecular biology changes associated with LRRK2 mutations in Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* **86(9)**:1895-901, 2008

Malkus KA, Tsika E, Ischiropoulos H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. *Mol Neurodegener.* **4**:24. 2009

Marshall LE, Himes RH. Rotenone inhibition of tubulin self-assembly. *Biochim Biophys Acta.* **543(4)**:590-4, 1978

Melrose H, Lincoln S, Tyndall G, Dickson D, Farrer M. Anatomical localization of leucine-rich repeat kinase 2 in mouse brain. *Neuroscience.* **139(3)**:791-4, 2006

Migheli R, Puggioni G, Dedola S, Rocchitta G, Calia G, Bazzu G, Esposito G, Lowry JP, O'Neill RD, Desole MS, Miele E, Serra PA. Novel integrated microdialysis-amperometric system for in vitro detection of dopamine secreted from PC12 cells: design, construction, and validation. *Anal Biochem.* **380(2)**:323-30, 2008

- Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res.* **34(1)**:55-65, 2009
- Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* **22**:123-44, 1999
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, López de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Martí-Massó JF, Pérez-Tur J, Wood NW, Singleton AB. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron.* **44(4)**:595-600, 2004
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. *London: Sherwood, Neely and Jones*, 1817
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci.* **16(2)**:135-142, 2000
- Ramonet D, Daher JP, Lin BM, Stafa K, Kim J, Banerjee R, Westerlund M, Pletnikova O, Glauser L, Yang L, Liu Y, Swing DA, Beal MF, Troncoso JC, McCaffery JM, Jenkins NA, Copeland NG, Galter D, Thomas B, Lee MK, Dawson TM, Dawson VL, Moore DJ. Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PLoS One.* **6(4)**:e18568, 2011

Santpere G, Ferrer I. LRRK2 and neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* **117(3)**:227-46, 2009

Schapira AH and Jenner P. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Movement Disorders.* **26(6)**, 2011

Serra PA, Esposito G, Enrico P, Mura MA, Migheli R, Delogu MR, Miele M, Desole MS, Grella G, Miele E. Manganese increases L-DOPA auto-oxidation in the striatum of the freely moving rat: potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol.* **130(4)**:937-45, 2000

Sierra M, González-Aramburu I, Sánchez-Juan P, Sánchez-Quintana C, Polo JM, Berciano J, Combarros O, Infante J. High frequency and reduced penetrance of LRRK2 g2019S mutation among Parkinson's disease patients in Cantabria (Spain). *Mov Disord.* **26(13)**:2343-6, 2011

Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* **16 (Spec No. 2)**:183-194, 2007

Tong Y, Pisani A, Martella G, Karouani M, Yamaguchi H, Pothos EN, Shen J. R1441C mutation in LRRK2 impairs dopaminergic neurotransmission in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106(34)**:14622-7. 2009

Valente EM, Ferraris A, Dallapiccola B. I parkinsonismi genetici. XXXVIII Congresso della Società italiana di Neurologia Firenze. 2007

Dott.ssa Ylenia Spissu – Studio del meccanismo di sintesi e rilascio della dopamina in cellule PC 12-ON contenenti la dardarina (LRRK2) WT e mutata – Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche, indirizzo Neuroscienze, Ciclo XXIV - Università degli Studi di Sassari

West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102(46)**:16842-7, 2005

Winner R, Melrose HL, Zhao C, Hinkle KM, Yue M, Kent C, Braithwaite AT, Ogholikhan S, Aigner R, Winkler J, Farrer MJ, Gage FH. Adult neurogenesis and neurite outgrowth are impaired in LRRK2 G2019S mice. *Neurobiol Dis*. **41(3)**:706-16, 2011

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, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. **44(4)**:601-7, 2004