



Università degli Studi della Calabria

Dottorato di ricerca in

“Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare”

XX Ciclo

***Studio elettrofisiologico, biologico-molecolare e
comportamentale dei meccanismi alla base delle discinesie
indotte dalla L-DOPA in modelli murini di Malattia di
Parkinson***

Settore Scientifico Disciplinare prevalente BIO/09 Neurofisiologia

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Giacinto Bagetta

Relatore

Chiar.mo Prof. Paolo Calabresi

Dottoranda

Dott.ssa Vincenza Bagetta

Anno Accademico 2007/2008

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	3
1.1. I Gangli della base	3
1.1.1. Anatomia dei gangli della base	3
1.1.2. Il circuito cortico-basale-talamo-corticale.....	5
1.2. La malattia di Parkinson	6
1.2.1. Modelli sperimentali di malattia di Parkinson	7
1.2.2. La plasticità sinaptica corticostriatale e la denervazione dopaminergica.....	9
1.3. Terapia con L-DOPA e insorgenza delle discinesie.....	12
1.3.1. Modelli animali di discinesie.....	13
1.3.2. Discinesie e plasticità sinaptica.....	14
1.3.3. Ruolo del recettore NMDA nella insorgenza del Parkinson e delle discinesie.....	16
2. OBIETTIVI DEL LAVORO	18
3. METODI 1	19
4. METODI 2	23
5. RISULTATI 1	28
5.1. Effetto della denervazione dopaminergica nei due modelli sperimentali.....	28
5.2. Il trattamento cronico ma non acuto è in grado di ripristinare l'LTP dopo la denervazione DAergica.....	28
5.3. Il trattamento cronico con alte dosi di L-DOPA induce la sensitizzazione ed un più alto grado di AIMS	29
5.4. Plasticità sinaptica nei ratti parkinsoniani trattati con basse e alte dosi di L-DOPA.....	30
5.5. Studio della correlazione tra due variabili: AIMS e depotenziamento	30
5.6. Proprietà intrinseche di membrana dei neuroni spinosi registrati da diversi gruppi sperimentali.....	30
6. DISCUSSIONE	31
7. RISULTATI 2	37
7.1. Caratterizzazione dei compartimenti subcellulari	37
7.2. Livelli delle subunità del recettore NMDA nello striato in seguito alla lesione con 6-OHDA e al trattamento cronico con L-DOPA.....	37
7.3. Interazione funzionale tra MAGUK-NMDAR in seguito alla lesione e al trattamento cronico con L-DOPA.....	38
7.4. Fosforilazione in Ser e Tyr di NR2B in seguito alla denervazione e al trattamento cronico con L-DOPA.....	39
7.5. Redistribuzione subcellulare della subunità NR2B tra i siti sinaptici ed extrasinaptici nei ratti trattati con L-DOPA e DYS	40
7.6. Il comportamento motorio discinetico è correlato alla localizzazione sinaptica della subunità NR2B.....	40
7.7. Proprietà intrinseche dei neuroni spinosi registrati nei gruppi DYS e NON-DYS.....	42
7.8. Effetti dei peptidi disaccoppianti MAGUK/NR2B ed NR2A sul fenomeno del depotenziamento nei gruppi non discinetici e discinetici.....	42
7.9. L'associazione di TAT2A e L-DOPA <i>in vivo</i> riduce l'incidenza delle discinesie	43
7.10. La plasticità sinaptica non è alterata dal trattamento cronico con TAT2A.....	44
8. DISCUSSIONE	45
9. BIBLIOGRAFIA	55

1. Introduzione

1.1. I Gangli della base

L'esecuzione dei movimenti volontari risulta dalla corretta integrazione delle informazioni sensorio-motorie nel cervello. Questo compito è assolto da un complesso network neuronale che include la corteccia cerebrale, il talamo e i gangli della base (GB).

Tale network gioca un ruolo essenziale nel controllo motorio adattativo permettendo l'espressione di sequenze motorie rilevanti e l'inibizione di movimenti potenzialmente competitivi.

I GB fanno parte di un preciso sistema di "feedback" che elabora le informazioni ricevute da parti diffuse della corteccia cerebrale e riverbera i risultati di questo processo principalmente al lobo frontale. L'output dei GB è diretto, attraverso specifici nuclei talamici, principalmente ad aree corticali con funzione "associativa-programmatoria" e, in particolare, a quelle aree (premotoria laterale, supplementare motoria, corteccia cingolata) che sono deputate alla preparazione di movimenti finalizzati complessi o guidati dal controllo sensoriale ed al controllo dei muscoli assiali e prossimali.

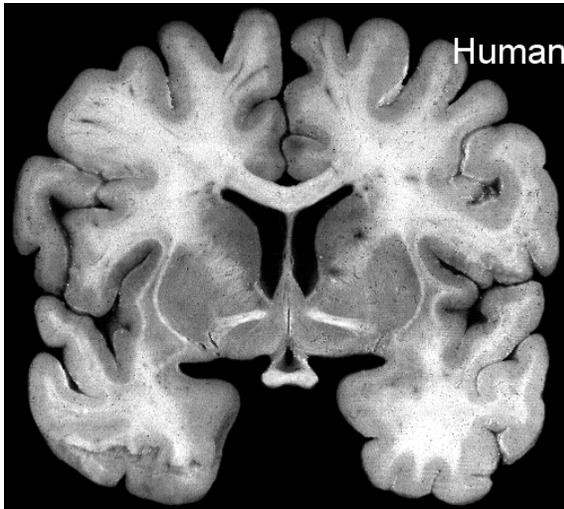
1.1.1. Anatomia dei gangli della base

I gangli della base consistono di diversi nuclei altamente interconnessi, localizzati nel telencefalo, diencefalo e mesencefalo coinvolti in una grande varietà di funzioni motorie e non-motorie.

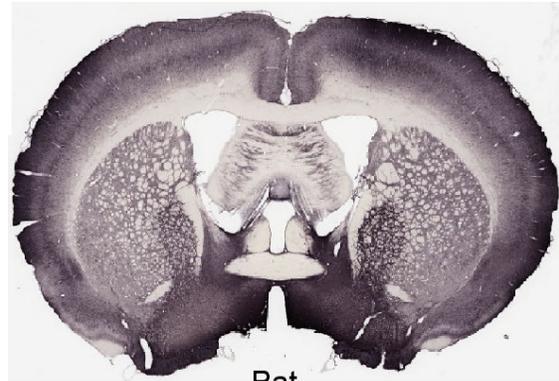
Tradizionalmente, i gangli della base sono costituiti da 4 nuclei: il nucleo striato, il globus pallidus, la sostanza nera ed il nucleo subtalamico.

Il corpo striato, il principale nucleo input dei gangli della base, è un voluminoso insieme di nuclei che deve il nome alla sua particolare organizzazione strutturale: esso è infatti composto

da un'alternanza di formazioni grigie intersecate da fasci di sostanza bianca, che conferiscono alla struttura quel particolare aspetto "striato". Esso è costituito nei primati dal nucleo caudato e dal putamen, separati dalla capsula interna. Nei roditori invece si presenta come una struttura omogenea.



(from Digital Anatomist, Washington University)



(from the Rat Brain, Paxinos and Watson)

Il globus pallidus (GP) deriva dal diencefalo ed è posto medialmente al putamen e lateralmente alla capsula interna. È suddiviso in un segmento interno/mediale (GPi) ed uno esterno/laterale (GPe). Nei roditori il GPi corrisponde al nucleo entopeduncolare mentre il GPe viene riferito come GP. Le due divisioni del GP hanno differenti inputs ed outputs e sono funzionalmente diverse. Il nucleo subtalamico (NST) è situato sotto il talamo, a livello della sua giunzione con il mesencefalo. La sostanza nera (SN) si trova nel mesencefalo e presenta due regioni: una zona ventrale pallida, la pars reticolata (SNpr) ed una zona dorsale che presenta una pigmentazione scura, la pars compacta (SNpc), caratterizzata dalla presenza di neuroni dopaminergici i cui corpi cellulari contengono neuromelanina. Il GPe e la SNpr costituiscono le principali stazioni di output dei gangli della base.

1.1.2. Il circuito cortico-basale-talamo-corticale

Lo striato è la principale porta di ingresso dei gangli della base la cui attività è principalmente guidata dagli input eccitatori provenienti virtualmente dalla totalità delle aree corticali (McGeorge and Faull, 1989) ed in minor parte dai nuclei intralaminari del talamo (Berendse and Groenewegen, 1990) e da strutture limbiche, in particolare l'amigdala. Un altro importante input che converge nello striato origina dai neuroni dopaminergici della SNpc e dell'area ventrale tegmentale. Infine, proiettano allo striato fibre serotoninergiche del nucleo del rafe (Halliday *et al.*, 1995 for review) e noradrenergiche del locus coeruleus.

Gli inputs corticali e talamici nel complesso rappresentano l'85% delle sinapsi nello striato. L'organizzazione delle proiezioni corticostriatali e talamostriatali risulta organizzata in maniera topografica per cui il putamen è principalmente implicato nel controllo motorio, il caudato nel controllo dei movimenti oculari ed in certe funzioni cognitive ed, infine, la parte ventrale (nucleo accumbens), in funzioni limbiche. Il cross-talk dinamico tra attivazione e soppressione del movimento all'interno dei gangli della base è fondamentale per la fluida esecuzione del movimento iniziato dalla corteccia.

Il macrocircuito dei gangli della base è stato a lungo considerato essere dominato da due principali pathways attraverso cui l'informazione corticostriatale è trasmessa ai nuclei output dei gangli della base, la SNpr ed il GPi (Alexander and Crutcher, review 1990; DeLong, 1990; Smith *et al.*, 1998). Secondo questa visione, la via diretta (neuroni che dispongono di recettori dopaminergici D1) proietta dallo striato alla SNpr e al GPi mentre quella indiretta (neuroni positivi per il recettore D2) proietta esclusivamente ai neuroni del GPe. Tali neuroni proiettano al GPi/SNpr direttamente o tramite il NST.

Tuttavia, questa segregazione dei neuroni, sebbene abbia avuto un valore euristico, non è del tutto reale, in quanto è stato dimostrato (Kawaguchi *et al.*, 1990) che i neuroni della via diretta inviano collaterali assionali al GPe ed inoltre è stata proposta l'esistenza di una popolazione rappresentata dal (25-40%) dei neuroni che coesprime i recettori D1 e D2 (Surmeier *et al.*,

1996). L'attivazione della pathway diretta o della indiretta porta ad opposti cambiamenti nell'output finale dei gangli della base.

Infatti, l'attivazione dei neuroni striatali di natura GABAergica che danno origine alla via diretta causa l'inibizione dei neuroni GABAergici dei nuclei di output il che si traduce in una disinibizione dei nuclei talamici che sono sotto il controllo inibitorio delle proiezioni output inibitorie, tonicamente attive.

Al contrario, l'attivazione della via indiretta causa l'inibizione del GPe e la conseguente disinibizione del NST, il quale aumenta l'attività dei nuclei di output essendo di natura eccitatoria glutammatergica. Di conseguenza, il talamo risulta inibito dai nuclei output. In sintesi, la via "diretta" sarebbe deputata a facilitare l'attività motoria desiderata, mentre la via "indiretta" inibirebbe le attività motorie interferenti.

La dopamina (DA) gioca un ruolo fondamentale nel mantenere la stabilità del network dei gangli della base.

In condizioni fisiologiche il firing tonico dei neuroni della SNpc fa sì che la DA agisca principalmente sui recettori D1, facilitando l'attivazione della pathway diretta e di conseguenza il movimento. L'importanza della proiezione dopaminergica nel controllo del movimento è dimostrata dalle gravi alterazioni motorie che si verificano nella malattia di Parkinson (MP) come conseguenza della denervazione striatale di DA.

1.2. La malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (MP) è una patologia neurodegenerativa progressiva che colpisce almeno il 19% della popolazione di età superiore ai 65 anni. Gli aspetti clinici cardinali della patologia includono gravi sintomi motori quali tremore a riposo, alterazioni della postura, lentezza dei movimenti e rigidità. Il tremore a riposo, la bradicinesia e la rigidità sono tra i primi sintomi ad insorgere (Obeso *et al.*, 2000a). Generalmente colpiscono, in maniera

asimmetrica. L'instabilità posturale è uno dei sintomi tardivi che insorgono dopo 10 anni o più dall'insorgenza della malattia (Obeso *et al.*, 2000a).

Nella MP, queste alterazioni motorie sono accompagnate da altri disturbi come depressione, disfunzioni del sistema autonomo, disordini del sonno, declino cognitivo che sono ritenuti essere una conseguenza della riduzione dei livelli di DA nelle porzioni non motorie dello striato e in altre regioni cerebrali: troncoencefalo, talamo e corteccia.

Nella MP la severa degenerazione dei neuroni della SNpc risulta nella denervazione dei terminali dopaminergici dello striato, il principale target di queste fibre.

La perdita del controllo dell'attività neuronale striatale è generalmente considerata come il substrato funzionale dei sintomi motori della MP, sebbene altre strutture dei gangli basali richiedano un fisiologico tono dopaminergico per le loro attività. Il deficit striatale di DA può essere inizialmente compensato dalla downregulation del trasportatore del neurotrasmettitore, che è responsabile di una aumentata sensibilità del recettore postsinaptico.

Questa compensazione può spiegare il ritardo tra l'inizio della patologia e la comparsa dei sintomi (Zigmond, 1997; Bezard *et al.*, 2001). Comunque i meccanismi compensatori alla fine vengono meno ed i neuroni della via diretta diventano ipoattivi mentre i neuroni della via indiretta iperattivi.

1.2.1. Modelli sperimentali di malattia di Parkinson

Negli ultimi anni, studi neurofisiologici sui GB hanno fornito informazioni non solo sull'azione fisiologica della DA (see Bergman *et al.*, 1998) ma anche sugli effetti della denervazione nigrale dopaminergica sull'attività striatale (Lozano *et al.*, 1998). L'introduzione di modelli animali di MP riproducibili, ha favorito la comprensione dei meccanismi patologici della malattia e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche sia farmacologiche che di altro genere (trapianto di cellule dopaminergiche ed approcci neurochirurgici quali la "deep-brain stimulation").

Un modello animale ideale di MP dovrebbe riprodurre la eziologia della patologia così come gli aspetti comportamentali ed il time-course della patologia nell'uomo. Maggiore è la conformità del modello animale, maggiore sarà probabilmente la validità predittiva per l'efficacia clinica.

Il modello animale che indubbiamente ha contribuito maggiormente ai fini della ricerca preclinica sulla MP consiste nella lesione unilaterale del "medium forebrain bundle" (MFB) nel ratto mediante 6-idrossidopamina (6-OHDA) (Tranzer & Thoenen, 1967). L'iniezione unilaterale di 6-OHDA nel MFB determina una distruzione selettiva delle popolazioni A9, A8 e A10 dopaminergiche (Perese *et al.*, 1989), sia attraverso rapida autossidazione ed il conseguente stress ossidativo che ne deriva, sia a causa dell'inibizione del complesso I e IV della catena respiratoria mitocondriale (Glinka & Youdim, 1995).

Questa lesione causa una denervazione permanente dello striato ipsilaterale e produce ipocinesia unilaterale e disturbi dell'integrazione sensorimotoria mimando i sintomi della MP umana. Inoltre, i cambiamenti biochimici ed anatomici che sono indotti dalla denervazione con 6-OHDA riproducono le alterazioni descritte nei pazienti parkinsoniani, confermando ulteriormente la validità di questo modello sperimentale.

In alternativa, la 6-OHDA può essere iniettata direttamente nello striato. In questo caso la tossina causa una immediata degenerazione retrograda dei terminali nigrostriatali seguita da una progressiva degenerazione dei corpi cellulari della SNpc (Sauer and Oertel, 1994).

Nei primati non umani, l'iniezione intracarotidea sistemica della neurotossina MPTP causa la selettiva distruzione dei neuroni dopaminergici della SNpc, risultando nella sindrome parkinsoniana (De Long, 1990). Dopo avere attraversato la barriera ematoencefalica la tossina MPTP è ossidata in MPP+ il cui uptake è selettivo per i neuroni nigrali, mediato dal trasportatore della DA (Markey *et al.*, 1984).

Nel neurone l'MPP+ blocca la respirazione mitocondriale attraverso il legame al complesso I mitocondriale. Il blocco della respirazione mitocondriale causa massiva morte neuronale come conseguenza di una grave crisi energetica.

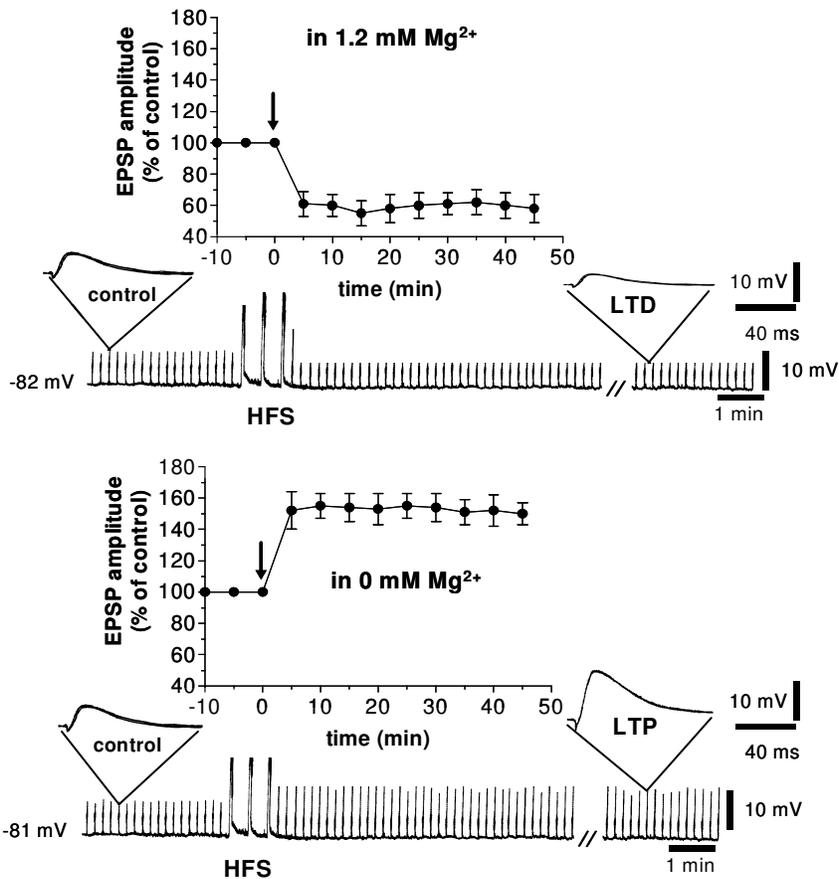
Questi modelli sperimentali di MP hanno fondato le basi della ricerca sulle conseguenze della lesione nigrostriatale.

1.2.2. La plasticità sinaptica corticostriatale e la denervazione dopaminergica

Le complicazioni motorie che si manifestano nella MP sono state correlate ad una forma aberrante di apprendimento motorio. Infatti, il potenziamento e la depressione a lungo termine della efficacia della trasmissione sinaptica, rispettivamente LTP ed LTD, correlati cellulari di apprendimento e memoria, risultano essere alterati nel modello sperimentale di MP.

La plasticità sinaptica corticostriatale è normalmente indotta *in vitro* nelle cellule principali, neuroni spinosi (MSN), attraverso la stimolazione ad alta frequenza (HFS) delle fibre corticostriatali. Misure dirette dei livelli di trasmettitori endogeni hanno mostrato che l'HFS produce un drammatico aumento del rilascio di glutammato e DA nello striato, il che suggerisce che questi trasmettitori agiscano in associazione nell'indurre la plasticità sinaptica (Calabresi *et al.*, 1995).

L'LTD è generalmente osservata *in vitro* in presenza di concentrazioni fisiologiche di ioni magnesio extracellulari (Mg^{++}) (Calabresi *et al.*, 1992a, 1996; Lovinger *et al.*, 1993), mentre l'LTP è preferenzialmente indotta in assenza di ioni Mg^{++} che blocca il recettore ionotropico NMDA al valore di riposo del potenziale di membrana (Calabresi *et al.*, 1992b, 1996; Centonze *et al.*, 1999). Dunque, l'attivazione del recettore NMDA è una condizione cruciale per l'induzione dell'LTP in striato mentre non è essenziale per l'LTD. Infatti, gli antagonisti del recettore NMDA non modificano l'LTD ma in compenso bloccano completamente l'induzione dell'LTP (Calabresi *et al.*, 1996; Partridge *et al.*, 2000).



Come sopra riportato, in seguito alla denervazione striatale cronica, si assiste alla perdita dell'LTD (Calabresi *et al.*, 1992) e dell'LTP (Centonze *et al.*, 1999).

Questi risultati dimostrano il ruolo funzionale della via nigrostriatale nel manifestarsi di entrambe le forme di plasticità sinaptica. In particolare, l'assenza dell'LTD nello striato dei ratti lesionati con 6-OHDA può essere attribuita alla mancata attivazione dei recettori DAergici durante la fase di induzione. L'LTD può essere ripristinata dopo la denervazione DAergica garantendo l'attivazione dei recettori mediante applicazione esogena di DA. Inoltre, la necessità della coattivazione dei recettori D1 e D2 nell'LTD è confermata dall'evidenza che questa forma di plasticità non è inducibile nelle slices denervate stimolando separatamente i recettori D1 o D2 con i rispettivi agonisti SKF 38393 o quinpirolo. D'altra parte la

coapplicazione di entrambe le classi di agonisti DAergici ripristina l'LTD (Calabresi *et al.*, 1992a, c).

L'assenza di LTP dopo la denervazione DAergica cronica non è esclusivamente causata dalla deplezione di DA nello striato ipsilaterale. Pertanto, né la stimolazione farmacologica dei recettori D1 o D2 singolarmente, né l'applicazione concomitante di agonisti D1 e D2 può ripristinare questa forma di plasticità sinaptica negli striati denervati. Ne consegue che, la deafferentazione cronica da DA causa cambiamenti adattativi a lungo termine nello striato che interferiscono profondamente con la generazione dell'LTP.

Infatti, dopo la denervazione DAergica le spine dendritiche dei neuroni striatali sono ridotte in numero e risultano anomale in dimensioni e forma, nei modelli animali come nei pazienti affetti da malattia di Parkinson (Ingham *et al.*, 1989; Nitsch & Riesenberg, 1995; Ingham *et al.*, 1998; see Arbuthnott *et al.*, 2000). Poiché le spine dendritiche costituiscono il locus anatomico di interazione DAergica e glutammatergica, può essere postulato pertanto che la irreversibile scomparsa dell'LTP corticostriatale dopo la denervazione sia causata dal rimodellamento di queste strutture neuronali.

Comunque, in seguito alla lesione nigrale, i neuroni spinosi striatali esibiscono un evidente aumento del potenziale spontaneo postsinaptico depolarizzante glutammato-mediato, che determina una scarica di potenziale d'azione quando le cellule sono depolarizzate. Tuttavia, le risposte all'applicazione esogena di agonisti glutammatergici non sono modificate. Questi risultati più che indicare un meccanismo postsinaptico in questo effetto suggeriscono un aumento del rilascio di neurotrasmettitore dai terminali glutammatergici.

Sia nei ratti lesionati con 6-OHDA che nei pazienti affetti da MP c'è un significativo aumento nella percentuale di trasmissione glutammatergica entro i gangli basali (see Carlsson & Carlsson, 1990; see Blandini *et al.*, 2000; see Greenamyre, 2001) associata ai cambiamenti plastici della sinapsi ed all'alterata sensibilità dei recettori D2 che regolano il rilascio di glutammato (Arnt & Hyttel, 1985).

1.3. Terapia con L-DOPA e insorgenza delle discinesie

La levodopa (L-DOPA) è il farmaco più efficace nel trattamento della MP (Lang & Lozano, 1998). Tale agente farmacologico sostitutivo, la cui attività è diretta a ripristinare le concentrazioni fisiologiche di DA nello striato, sfortunatamente induce nella grande maggioranza dei pazienti che rispondono alla terapia movimenti involontari anomali (AIMs, abnormal involuntary movements), definiti nel complesso col termine di “discinesie” (Obeso *et al.*, 2004; Olanow *et al.*, 2004b). Sebbene inizialmente efficace nel miglioramento di molti sintomi, la terapia cronica diventa meno efficace, sia a causa del manifestarsi di fenomeni “on-off” dovuti ad una riduzione della durata d’azione del farmaco che delle sopraccitate discinesie (Bezard *et al.* 2001; Greenamyre, 2001).

Approssimativamente il 30% dei pazienti parkinsoniani è affetto da discinesie a 5 anni dal trattamento e all’incirca il 90% dopo 9 anni di terapia (Ahlskog and Muentner, 2001).

Tipicamente, i movimenti anomali sono molto gravi dopo 40-80 minuti dalla somministrazione di L-DOPA (discinesia da picco-dose; Fahn, 2000).

Sebbene i meccanismi precisi alla base delle discinesie siano solo in parte chiariti, studi epidemiologici concordano nell’identificare alcuni prominenti fattori di rischio nel loro manifestarsi.

Il rischio di sviluppare discinesie da L-DOPA dipende in particolare dall’età di insorgenza e dalla gravità della MP, dalla dose e dalla durata della terapia con L-DOPA (Peppe *et al.*, 1993; Blanchet *et al.*, 1996; Grandas *et al.*, 1999). L’insorgenza precoce della MP è associata con un più alto livello di AIMs. Pazienti che sviluppano la MP tra i 40-59 anni di età hanno un rischio del 50% di sviluppare discinesie entro 5 anni dal trattamento contro un 16 % di rischio per i pazienti che si ammalano dopo i 70 anni. La presenza ed il grado di denervazione nigrale sono importanti fattori di rischio. Con la dose di L-DOPA utilizzata nella pratica clinica, gli AIMs si

manifestano esclusivamente in pazienti con MP, mentre la popolazione sana e quella con altre patologie neurologiche non sviluppa AIMs in seguito a trattamento con L-DOPA.

In un modello animale di MP ottenuto utilizzando MPTP, gli animali di controllo che ricevevano la soluzione salina più L-DOPA non sviluppavano discinesie in contrasto con il gruppo MPTP che sviluppava significanti AIMs, implicando che la denervazione nigrale sia una condizione necessaria nell'insorgenza di discinesie. Pazienti con parkinsonismo post-encefalitico sviluppano discinesie entro settimane dall'inizio del trattamento con L-DOPA, suggerendo che la severità della lesione nigrale sia un importante fattore di rischio. Tale teoria è supportata dall'evidenza che le discinesie tendano a svilupparsi nel lato maggiormente compromesso dalla MP.

La dose di L-DOPA è importante nella predizione delle discinesie, per cui alte dosi di L-DOPA sono associate con prolungate discinesie (Nutt *et al.*, 1992).

Poichè un significativo numero di pazienti non sviluppa discinesie da L-DOPA anche in seguito a prolungata terapia e ad un alto livello di degenerazione dei neuroni dopaminergici, fattori diversi da quelli sopra indicati possono giocare un ruolo nel determinare la comparsa delle discinesie da dose picco, quali quelli genetici.

1.3.1. Modelli animali di discinesie

Nei primati non umani resi parkinsoniani tramite somministrazione intracarotidea di MPTP, il trattamento cronico con L-DOPA causa manifestazioni motorie discinetiche simili a quelle osservate nei pazienti affetti da MP (Langston *et al.*, 2000). Le discinesie indotte in questo modello emiparkinsoniano, colpiscono la zampa controlaterale alla lesione insieme alla muscolatura oro-facciale (Clarke *et al.*, 1989). I criteri di valutazione delle discinesie indotte dal trattamento cronico con L-DOPA utilizzati nell'uomo sono applicabili anche nei modelli sperimentali che utilizzano primati non-umani (Gomez-Mancilla and Bedard, 1993; Brotchie and Fox, 1999). In questi modelli animali i movimenti involontari sono apprezzabili durante il

periodo di massima efficacia terapeutica della L-DOPA (Clarke *et al.*, 1989; Pearce *et al.*, 1998). Questo profilo ricalca bene l'andamento della dose-risposta delle discinesie da L-DOPA nei pazienti affetti da MP (Nutt, 1990). Oltre agli studi sui primati non-umani è stato messo a punto un modello per lo studio delle discinesie nei roditori (Cenci *et al.*, 1998). La somministrazione di dosi terapeutiche di L-DOPA nei ratti o nei topi, lesionati con 6-OHDA unilateralmente porta al graduale sviluppo di movimenti anormali involontari a carico della zampa anteriore controlaterale alla lesione, del tronco e della muscolatura orofacciale (Cenci *et al.*, 1998). Questi movimenti involontari possono essere quantificati sulla base della loro distribuzione topografica, della loro ampiezza e durata (Lee *et al.*, 2000; Lundblad *et al.*, 2002).

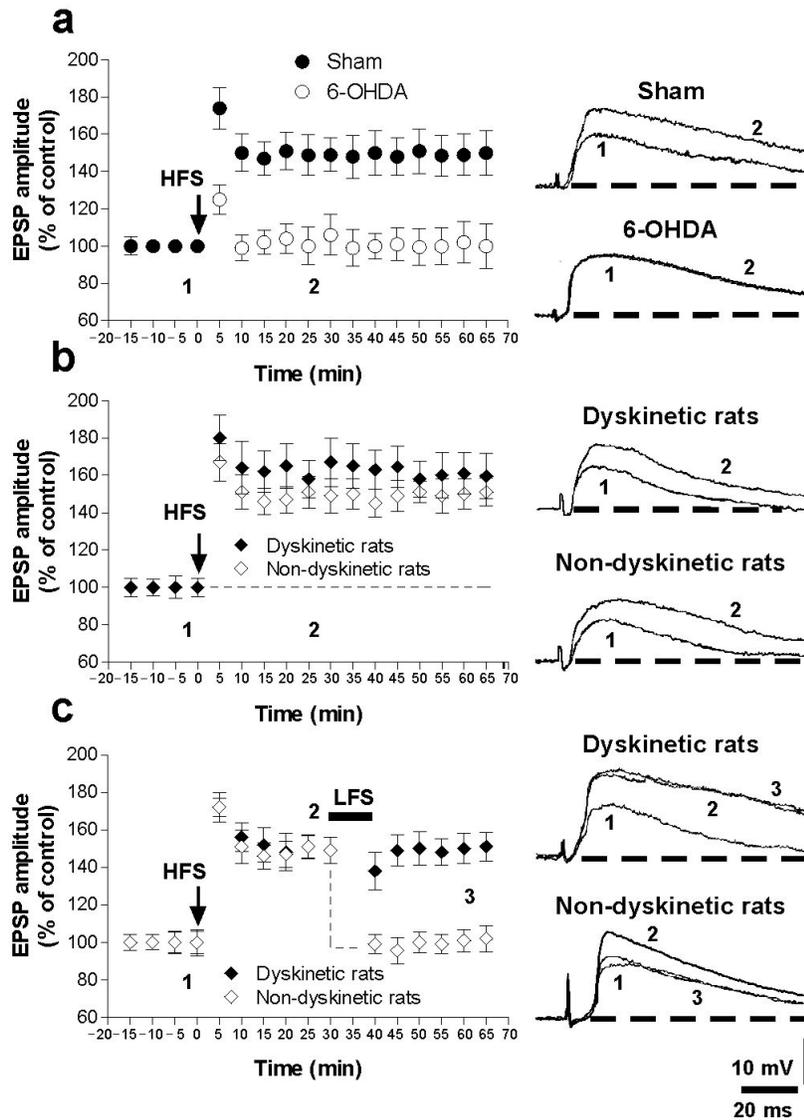
I movimenti involontari hanno un decorso temporale dose-dipendente (Lee *et al.*, 2000) paragonabile a quello delle discinesie riscontrate nei pazienti affetti da MP (Lundblad *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002). L'insorgenza dei movimenti involontari indotti dal trattamento cronico con L-DOPA presenta chiari correlati molecolari sia nei roditori che nei primati non-umani. Questi includono l'iperegolazione striatale degli mRNA per i recettori degli oppioidi e per i fattori di trascrizione quali FosB oltre che alcune modificazioni nel legame ai recettori degli oppioidi all'interno dei gangli della base e nelle aree corticali correlate.

1.3.2. Discinesie e plasticità sinaptica

I movimenti discinetici potrebbero derivare da una forma aberrante di apprendimento motorio nei neuroni striatali legata all'azione della L-DOPA sulla regolazione DAergica della plasticità dei terminali corticostriatali (Bedard *et al.*, 1999; Calabresi *et al.*, 2000a).

In fettine di animali controllo, attraverso un protocollo noto come Low Frequency Stimulation (LFS, stimolazione 2 Hz per 10 minuti) entro un determinato intervallo di tempo è possibile ripristinare la trasmissione sinaptica basale che precede la LTP. In queste condizioni viene indotta un'ulteriore forma di plasticità sinaptica nota come depotenziamento. La perdita del

depotenziamento nel gruppo di animali discinetici può avere profonde implicazioni nella patofisiologia dei circuiti ganglio-basali nella MP poiché esso è coinvolto nei meccanismi di rimozione delle informazioni ridondanti ed il deficit riscontrato negli animali discinetici suggerisce che la plasticità sinaptica anomala sia alla base della patogenesi della discinesia indotta da L-DOPA (Picconi *et al.*, 2003).



(from Picconi *et al.*, 2003, Nature Neurosci)

1.2.3. Ruolo del recettore NMDA nella insorgenza del Parkinson e delle discinesie

Nonostante i significativi progressi, la patogenesi delle discinesie rimane non completamente chiarita.

L'iperattività delle vie striatali di output potrebbe essere una componente chiave dei meccanismi neuronali sottostanti l'insorgenza delle discinesie indotte da L-DOPA (Chase & Oh, 2000; Criswell *et al.*, 1990). Così, le proiezioni eccitatorie verso lo striato sono ritenute giocare un ruolo primario in questo tipo di disordine del movimento (Calabresi *et al.*, 2000).

L'organizzazione subcellulare e le interazioni funzionali dei recettori per il glutammato all'interno dello striato appaiono cruciali nella patogenesi della MP così come nello sviluppo delle discinesie indotte da L-DOPA (Hallett *et al.*, 2005). Gli antagonisti del recettore NMDA, esercitano un effetto benefico nei modelli sperimentali di MP (Nash *et al.*, 2000; Loschmann *et al.*, 2004) e sono inoltre efficaci nel bloccare lo sviluppo delle discinesie indotte da L-DOPA (Wessell *et al.*, 2004; Hadj *et al.*, 2004).

La somministrazione sistemica degli antagonisti selettivi del recettore NMDA-NR2B, ifenprodil ed eliprodil, produce effetti antiparkinsoniani nei ratti resi parkinsoniani con reserpina (Nash *et al.*, 1999). Nonostante l'incapacità di alcuni antagonisti del recettore NMDA di migliorare i deficit motori la loro capacità di potenziare gli effetti della L-DOPA è più concordante (Morelli *et al.*, 1992). La somministrazione degli antagonisti del recettore NMDA si è anche dimostrata efficace nel ridurre le complicazioni motorie indotte da L-DOPA nei 6-OHDA (Papa *et al.*, 1995) e nelle scimmie trattate con MPTP (Papa and Chase, 1996). Inoltre la somministrazione di destrorfano, destrometorfano e amantadina (Veraghen Metman *et al.*, 1998) è stata riconosciuta migliorare le discinesie da L-DOPA. L'antagonista recettoriale NMDA, Co 101244, che è selettivo per il sottotipo recettoriale NR1-NR2B, mostra effetti antidiscinetici nelle scimmie trattate con L-DOPA (Blanchet *et al.*, 1999) mentre l'antagonista

selettivo NR1-NR2A aumenta la discinesia da L-DOPA in questo modello di MP (Blanchet *et al.*, 1998).

A livello molecolare sono state descritte nello striato dei ratti denervati (Picconi *et al.*, 2004) così come nelle scimmie discinetiche trattate con L-DOPA (Hallett *et al.*, 2005), alterazioni della localizzazione delle subunità del recettore NMDA, anche se i precisi meccanismi che regolano il trafficking subcellulare del recettore NMDA e la sua funzione nel modello sperimentale di parkinson sono ancora lontani dall'essere chiariti.

I recettori NMDA sono raggruppati in una regione altamente organizzata della frazione subcellulare postsinaptica, la Post-Synaptic Density (PSD), dove viene dinamicamente regolato il legame del recettore NMDA e delle sue subunità ad altre proteine (Sheng, 2001; Gardoni *et al.*, 2001).

I recettori NMDA funzionali consistono di una combinazione di almeno 4 subunità (Laube *et al.*, 1998) appartenenti ad almeno 3 famiglie, NR1, NR2 ed NR3. Le subunità NR1 sono ubiquitarie per tutti i recettori NMDA e sono necessarie per la funzione del recettore. La subunità NR2 varia e conferisce le diverse proprietà farmacologiche del recettore. La subunità NR3A agisce come subunità regolatoria ed è verosimilmente coinvolta nello sviluppo delle spine dendritiche. I recettori NMDA possiedono un peptide segnale amino-terminale e 4 segmenti idrofobici (M1-M4). Le subunità NR2, specialmente NR2A e B, hanno domini carbossiterminale notevolmente più grandi di altre subunità del recettore canale per il gluammato.

Sono stati descritti numerosi partner molecolari dei recettori NMDA, includendo le scaffolding proteins e gli elementi di trasduzione del segnale (Kim & Sheng, 2004).

In particolare, i membri della famiglia delle proteine associate alla guanilato chinasi (MAGUK) interagiscono attraverso il dominio PDZ con i motivi C-terminale presenti nella subunità NR2 del recettore NMDA. Questa interazione è necessaria per il trafficking iniziale del

recettore NMDA dal reticolo alla membrana dove viene stabilizzato in sinapsi (Prybylowski & Wenthold, 2004).

Tuttavia, non si ha ancora un concetto conclusivo sulla possibile perturbazione dei fattori che maggiormente regolano il trafficking dei recettori NMDA e l'organizzazione funzionale nelle membrane post-sinaptiche nel modello sperimentale di MP e di discinesia.

2. Obiettivi del lavoro

Il principale obiettivo di questo Dottorato di Ricerca è stato studiare le alterazioni elettrofisiologiche, comportamentali, cellulari e molecolari che intervengono in un modello sperimentale di discinesie da L-DOPA nel parkinsonismo indotto da 6-OHDA nel ratto.

La terapia con L-DOPA rappresenta ancora il principale trattamento nella MP pur essendo caratterizzata da gravi complicazioni motorie.

I meccanismi sinaptici alla base della dipendenza dei movimenti discinetici dal dosaggio di L-DOPA nella terapia della MP sono ancora poco chiari. In questo studio pertanto abbiamo caratterizzato l'associazione tra AIMs, plasticità sinaptica bidirezionale e dosaggio quotidiano di L-DOPA nel modello sperimentale di MP.

Ulteriore obiettivo di questo dottorato di ricerca è stato di studiare le modificazioni molecolari quali-quantitative e della distribuzione delle singole subunità del recettore NMDA nonché le interazioni di tale complesso recettoriale con le proteine MAGUK in corso di discinesia da L-DOPA.

Successivamente sono stati studiati gli effetti molecolari, comportamentali ed elettrofisiologici dei peptidi disaccoppianti delle subunità NR2A ed NR2B del recettore NMDA, rispettivamente TAT2A e TAT2B nei ratti parkinsoniani trattati con L-DOPA, discinetici e non-discinetici.

La comprensione dei meccanismi alla base dell'insorgenza delle discinesie nel nostro modello animale potrebbe consentire l'identificazione di nuove strategie farmacologiche che non

provocchino nei pazienti l'insorgenza degli effetti collaterali da L-DOPA, preservando l'efficacia del trattamento.

3. Metodi 1

Animali

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati ratti maschi Wistar adulti (150-250 g). Tutti gli esperimenti sono stati approvati dall'OHSU (Institutional Animal Care and Use Committee).

Lesioni con 6-OHDA e comportamento

Gli animali anestetizzati sono stati trattati mediante iniezione di 6-idrossidopamina (6-OHDA, 8µg/4µl di soluzione salina contenente lo 0.1% di acido ascorbico) nel MFB, alla velocità di 0.38 µl/min (secondo le coordinate di Paxinos & Watson, 1986). I ratti controllo sono stati trattati esclusivamente con la somministrazione della soluzione veicolo nelle stesse coordinate. A distanza di 15 giorni, i ratti sono stati testati con una dose di 0.05 mg/kg s.c. di apomorfina al fine di valutare il corretto esito della lesione dopaminergica e sono stati contati i giri controlaterali al sito di lesione per la durata di 40 min. Per gli esperimenti comportamentali e biochimici sono stati utilizzati solo quei ratti che avevano eseguito almeno 200 giri controlaterali. È stato precedentemente dimostrato che i ratti selezionati mediante questo criterio presentavano un livello di deplezione di dopamina superiore al 95% (Schwartz & Huston, 1996). Due mesi dopo la lesione con 6-OHDA, i ratti iniziavano a ricevere due iniezioni quotidiane di 10 mg/kg L-DOPA più 7.5 mg/kg benserazide i.p., o di soluzione salina, per 2 settimane. I movimenti anomali involontari indotti da L-DOPA (AIMs) sono stati monitorati a giorni alterni applicando i criteri della scala dei valori di AIMs già descritta (Cenci *et al.*, 1998; Lundblad *et al.*, 2002; Picconi *et al.*, 2003). In breve, gli AIMs sono stati classificati in tre sottotipi: AIMs assiali, postura distonica della parte superiore del corpo verso il sito controlaterale alla lesione; AIMs dell'arto anteriore, movimenti anomali dell'arto anteriore (controlaterale alla lesione); AIMs orolinguali, protrusione della lingua e movimenti

della mascella. Ognuno di questi movimenti è stato classificato secondo l'entità attraverso una scala da 0 a 4. In particolare, il punteggio 1 è stato assegnato quando il movimento anomalo era presente durante meno della metà del tempo di osservazione (1 min); 2, se presente durante più di metà del tempo; 3, presente durante tutto il periodo di osservazione ma interrotto in caso di stimoli esterni; 4, presente durante tutta l'osservazione e senza possibilità di reversibilità (non interrotto da stimoli esterni). I punteggi sono stati assegnati nel corso di ogni singola osservazione ad intervalli regolari di 20 minuti e per una durata totale di 180 minuti dalla iniezione di L-DOPA.

Trattamento con alte e basse dosi

Ad un mese dalla lesione i ratti sono stati divisi in tre gruppi sperimentali. Un gruppo (n=45) è stato trattato con basse dosi di L-DOPA (10mg/Kg L-DOPA e 7,5 mg/kg di benserazide, due volte al giorno per 21 giorni). Il secondo gruppo di ratti (n=45) ha ricevuto alte dosi di L-DOPA (25 mg/Kg L-DOPA e 7,5 mg/Kg di benserazide, 2 volte al giorno i.p. per 21 giorni). L'ultimo gruppo di ratti (n=30) ha ricevuto iniezioni quotidiane di soluzione fisiologica ed è stato utilizzato come controllo per le registrazioni elettrofisiologiche con applicazione acuta di DA. I movimenti anomali involontari sono stati registrati a giorni alterni 3 volte a settimana utilizzando un valido sistema di score degli AIMs come precedentemente descritto (Cenci *et al.*, 1998; Lundblad *et al.*, 2002; Picconi *et al.*, 2003).

Immunoistochimica

Dopo la decapitazione, la parte caudale del cervello corrispondente alla SN è stata conservata in paraformaldeide 4 % (PFA) per un giorno e alla fine in un buffer fosfato sucrosio (PBS) al 25 % per 24-48 ore prima del taglio. Le sezioni coronali, dello spessore di 40 µm, sono state tagliate per mezzo di un microtomo (Microtom France) e collezionate in vials contenenti 1 ml di PB. Le sezioni a livello della SN sono state processate per la doppia immunofluorescenza utilizzando anticorpi contro la tirosina idrossilasi (TH) e l'antigene specifico nucleare neuronale (NeuN). Le sezioni sono state incubate con un mix dei seguenti anticorpi: murino

anti-NeuN (1:200; IgM; Chemicon) e coniglio anti-TH (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari e il successivo wash con PB, le sezioni sono state incubate in un mix di anticorpi secondari: IgM di asino anti-topo coniugate con Cy3 e IgG di asino anti-coniglio coniugate con Cy2 (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Le sezioni sono state successivamente montate su slides ricoperte di gelatina, essiccate e coperte con GEL/MOUNT (Biomedica, Foster City, CA, USA).

Per ogni sezione, è stata ottenuta una microfotografia della SN utilizzando l'ingrandimento 10X di un microscopio confocale CLSM (ZEISS LSM 510). Quindi, le cellule positive per TH-NeuN sono state contate in 3 diversi livelli rostrocaudali della SN (utilizzando il software Image J): a livello dell'emergenza del terzo nervo, 20 µm rostrale e 200 caudale per questo livello. Il numero di cellule è stato espresso come media del numero di 3 sezioni. La perdita di cellule TH-IR è presentato come percentuale relativa al sito controlaterale del cervello (Paillé *et al.*, 2004; Sauer and Oertel, 1994).

Le sezioni di striato sono state incubate overnight in anti-TH di coniglio (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e quindi immerse in IgG di asino anti coniglio biotinitato diluito 1:500 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA), trasferite in un kit ABC Vectastain, Vector/PBS per un'ora (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA); la 3,3'-diaminobenzidina è stata utilizzata come cromogeno nella successiva reazione di visualizzazione. La densità delle fibre striatali TH-IR è stata analizzata come densità ottica (OD). Il valore (arbitrario) OD delle sezioni di striato è stato misurato per ogni sezione utilizzata e paragonato a quello nelle regioni omologhe nel sito intatto. La densità è stata espressa come percentuale relativa al sito controlaterale.

Esperimenti di Elettrofisiologia

Gli animali sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale 4 ore dopo l'ultima iniezione di L-DOPA al fine di ottenere fettine corticostriatali per le registrazioni elettrofisiologiche. In

breve, le fettine coronali (270 μm) sono state tagliate attraverso l'uso di un vibratomo (Pelco 1000 plus; Redding, CA) e sono state trasferite in una camera di registrazione e continuamente sommerse nella soluzione fluente di Krebs (35°C, 2-3 ml/min) ossigenata con 95% O₂-5% CO₂. La composizione della soluzione standard era (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 2.4 CaCl₂, 11 Glucosio, 25 NaHCO₃. Gli elettrodi per le registrazioni intracellulari sono stati riempiti con KCl 2M (30-60 M Ω). I segnali sono stati registrati con l'uso di un amplificatore Axoclamp 2B (Axon Instruments, Foster City CA 94404, USA), mostrati su un oscilloscopio e raccolti ed analizzati mediante un sistema digitale (pClamp 9, Axon Instruments, Foster City CA 94404, USA). Al fine di attivare le fibre corticostriatali sono stati adoperati elettrodi bipolari in tungsteno localizzati nella materia bianca tra la corteccia e lo striato. All'inizio delle registrazioni intracellulari sono stati omessi gli ioni magnesio dal mezzo per evidenziare meglio la componente NMDA dei potenziali postsinaptici eccitatori (EPSP). In queste condizioni sperimentali, per indurre l'LTP corticostriatale è stata utilizzata una stimolazione ad alta frequenza (HFS) delle fibre (3 treni, 3 s di durata, 100 Hz di frequenza, 20 s di intervallo tra ogni evento). L'intensità della stimolazione durante l'HFS è stata regolata in modo da depolarizzare il neurone postsinaptico a livelli tali da evocare dei potenziali d'azione. Al contrario, per indurre il depotenziamento dell'LTP (una modalità di plasticità sinaptica che consente di resettare l'informazione) è stato utilizzato un diverso protocollo, vale a dire la LFS (10 min di stimolazione a 2 Hz) delle fibre corticostriatali. In alcuni esperimenti, sono stati inclusi nel mezzo esterno dosi di bicucullina (3 μM) per omettere l'eventuale contaminazione dell'EPSP da parte della componente GABA_A che potrebbe depolarizzare i neuroni a causa dell'uso di elettrodi contenenti KCl. Questa procedura sperimentale non influenza i dati sull'LTP corticostriatale e sul depotenziamento.

Farmaci

R-(-)-Apomorfina idrocloruro emidrato, bicucullina, L-DOPA metilestere, 3-idrossitiramina idrocloruro (DA) e 6-idrossidopamina (6-OHDA) sono state ottenute dalla SIGMA-Aldrich, Milano, Italia.

Analisi dei dati

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il Software Prism4 (San Diego, USA). I dati sulla TH sono stati analizzati utilizzando il t-test per dati non appaiati. I risultati di elettrofisiologia sono stati analizzati calcolando le medie \pm SEM dell'ampiezza del picco dell'EPSP nelle rispettive popolazioni cellulari. Le differenze tra le medie sono state valutate mediante il test "t" di Student per dati non appaiati e l'ANOVA a due vie è stato utilizzato per paragonare osservazioni multiple ad un singolo gruppo di controllo.

Quando è stata osservata un'interazione significativa è stato utilizzato un altro test, Bonferroni post hoc test. La correlazione tra AIMs e ampiezza dell'EPSP in seguito alla LFS è stata calcolata attraverso regressione lineare.

4. Metodi 2

Animali

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati ratti maschi Wistar adulti (150-250 g). Tutti gli esperimenti sono stati approvati dall'OHSU (Institutional Animal Care and Use Committee).

Impianto cannule intrastriatali

Previa induzione di un profondo stato di anestesia tramite somministrazione intraperitoneale di idrato di cloralio (400 mg/kg, soluzione 40 mg/ml; Merk KGaA, Darmstadt, Germany) l'animale è stato assicurato ad un apparecchio stereotassico (Stoelting Co, USA) per consentire la corretta individuazione delle coordinate dello striato. Una volta incisa la cute del cranio ed effettuata la pulizia e rimozione del periostio è stato praticato un foro con coordinate rispetto al bregma: AP = +0.7, L = +4, VD = -4.6. in corrispondenza delle quali è stata posizionata una cannula (diametro interno 0,25 mm, diametro esterno 0,50 mm, Unimed, Lausanne,

Switzerland) che é stata lentamente abbassata fino a raggiungere la dorsoventralità desiderata. Una volta in posizione, la cannula é stata fissata mediante una piccola quantità di cemento dentario (Glasionomer Cement CX plus, Shofu Inc, Kyoto, Japan) e l'apertura esterna protetta temporaneamente con una chiusura costituita da una cannula di diametro inferiore (diametro interno 0,09 mm, diametro esterno 0,20 mm, Unimed., Lausanne., Switzerland). Nel periodo di ricovero post-chirurgico gli animali sono stati controllati quotidianamente per verificare le condizioni di salute. Dopo tre giorni di riposo l'animale é stato portato nella stanza dove si sono svolte le procedure sperimentali e la somministrazione del farmaco avveniva attraverso una pompa idraulica.

Somministrazione del peptide TAT2B

Gli effetti del peptide TAT fuso alla porzione C-terminale della subunità NR2B (TAT2B) sulle discinesie da L-DOPA sono stati monitorati in seguito alla iniezione intrastriatale del peptide nei ratti lesionati, nei controlli, e nei ratti trattati con L-DOPA non discinetici.

Ogni gruppo sperimentale, a distanza di due settimane dal trattamento con L-DOPA, ha ricevuto tre iniezioni consecutive (una al giorno) di TAT2B (500 μ M; Aats *et al.*, 2002), o di veicolo nello striato ipsilaterale alla lesione (rate di 0.5 μ l/min (volume totale 1 μ l)). L'iniezione di L-DOPA è stata eseguita dopo 1 ora dalla somministrazione intrastriatale di TAT2B. Per analizzare l'effetto del TAT2B sulle discinesie indotte da L-DOPA sono stati paragonati rispettivamente tre test degli AIMs precedenti alla iniezione del peptide a tre test successivi alla iniezione del peptide (20 minuti dopo la iniezione di L-DOPA).

Somministrazione del peptide TAT2A

Il peptide TAT2A è stato somministrato ai ratti discinetici e ai controlli per via intraperitoneale (3 nmol/g, una volta al giorno per 21 giorni) 30 minuti prima della somministrazione della L-DOPA. Gli AIMs sono stati monitorati per 4 giorni consecutivi per ogni settimana di trattamento (20 minuti dopo l'iniezione di L-DOPA).

Analisi di Western blot

L'analisi di Western blot è stata eseguita in tessuti striatali dal totale corpo striato. Il frazionamento subcellulare è stato eseguito come precedentemente riportato con minori modificazioni (Gardoni *et al.*, 2001). Gli striati sono stati omogenati in sucrosio 0.32 M contenente i seguenti (in mM): 1 HEPES, 1 MgCl₂, 1 EDTA, 1 NaHCO₃, e 0.1 PMSF, a pH 7.4, in presenza di un set completo di inibitori delle proteasi (Complete; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) e delle fosfatasi (Sigma, St. Louis, MO). I tessuti omogenati sono stati centrifugati a 1000 \times g per 10 minuti. Il supernatante (S1) risultante è stato centrifugato a 3000 \times g per 15 minuti per ottenere la frazione crude di membrane (P2). Il pellet è stato risospeso in HEPES 1 mM più CompleteTM in un potter di vetro e centrifugato a 100,000 \times g per 1 ora. Il pellet (P3) è stato risospeso in buffer contenente 75mM KCl e 1% Triton X-100 e centrifugato a 100,000 \times g per 1 ora. Il supernatante è stato conservato e riferito come Triton X-100-soluble fraction (TSF) (S4). Il pellet finale (P4) è stato omogenato in un glass- glass potter in 20 mM HEPES. Quindi, è stato aggiunto un uguale volume di glicerolo, e questa frazione, riferita come TIF, è stata conservata a -80°C fino al processamento. È stato adoperato il TIF invece della PSD classica poichè la quantità di materiale di partenza era molto esigua. La composizione proteica della preparazione è stata attentamente testata per escludere la presenza di proteine presinaptiche. (es: sinaptofisina) (Gardoni *et al.*, 2001). La stessa quantità di proteine è stata ottenuta nei TIF purificati dagli striati di tutti i gruppi sperimentali e la stessa quantità di proteine TIF è stata applicata per tutti i campioni per l'SDS-PAGE e immunoblot. Le nitrocellulose sono state bloccate con 10% albumina in Tris-buffered saline (TBS) e incubate per 2 ore a temperatura ambiente con gli anticorpi primari: NR1 (diluito 1:1000), NR2A (diluito 1:1000), NR2B (diluito 1: 1000), p1303ser-NR2B (diluito 1:750), p1472Tyr-NR2B (diluito 1:1000), GluR1 (diluito 1:1000), PSD-95 (diluito 1:2000), SAP97 (diluito 1:1000), SAP102 (diluito 1:1000), α -CaMKII (diluito 1:3000), CREB (diluito 1: 1000), e pCREB (diluito 1:750) in albumina 3% in TBS. In seguito ad abbondante lavaggio in TBS/0.1% Tween 20, le nitrocellulose sono state incubate con anticorpi secondari coniugati

con perossidasi di rafano [goat anti-ratto, per gli anticorpi monoclonali, diluito 1:10,000 (Pierce, Rockford, IL); goat anti-topo, per anticorpi monoclonali, diluiti 1:20000 (Pierce)], e quindi il complesso antigene-anticorpo è stato rivelato attraverso chemiluminescenza (ECL; Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Esperimenti di immunoprecipitazione

Le aliquote di omogenati striatali e TIF sono state incubate overnight a 4°C in buffer A, contenente i seguenti: 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na₂HPO₄, 0.5% NP-40, and 0.1% SDS con anticorpi contro PSD-95, o contro le subunità NR2A, NR2B del recettore NMDA. Protein A-agarose beads sono state aggiunte (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), lavate nello stesso buffer, e l'incubazione è stata continuata per 2 ore. The beads sono stati raccolti per centrifugazione e lavati 5 volte con buffer A; è stato aggiunto il sample buffer per SDS-PAGE, e la miscela è stata bollita per 5 min. Beads sono stati separati per centrifugazione, e i supernatanti sono stati applicati al 6% all'SDS-PAGE.

Anticorpi

Per l'esecuzione degli esperimenti sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anticorpo di topo per lo staining della CaMKII e anticorpi policlonali GluR1, NR2A, and NR2B sono stati ottenuti dalla Chemicon (Temecula, CA). Gli anticorpi policlonali SAP97 e SAP102 ed il monoclonale PSD-95 sono stati ottenuti dall'Affinity BioReagents (Golden, CO). L'anticorpo monoclonale SAP97 è stato ottenuto da StressGen (Victoria, British Columbia, Canada). Gli anticorpi policlonali p1472Tyr-NR2B, CREB, e p133-CREB sono stati ottenuti dalla Calbiochem (Nottingham, UK). L'anticorpo p1303Ser-NR2B e il monoclonale NR1 sono stati ottenuti rispettivamente da Upstate (Waltham, MA) e Zymed (San Francisco, CA).

Whole-cell recordings

Le registrazioni in whole-cell patch clamp dai MSNs sono state eseguite utilizzando pipette in borosilicato con un diametro esterno di 1.5mm, riempite con una soluzione intracellulare contenente i seguenti componenti in mM: 125 potassio gluconato, 15 KCl, 0.04 EGTA, 12

Hepes, 2 MgCl₂, 4 Na₂ATP e 0.4 Na₂GTP, portata a pH 7.3 con KOH. Con questa soluzione la resistenza della pipetta era in media di 3–4MΩ. Le registrazioni sono state eseguite con un amplificatore in bridge (Multiclamp 700B, Axon Instruments, Union City, CA, USA). I dati sono stati acquisiti a 10–15 kHz utilizzando il software Clampex 10.2. La resistenza di membrana (R_m) e di accesso (R_a) e la capacità della cellula (C) sono state misurate frequentemente nel corso dell'esperimento attraverso un protocollo di Test Pulse e sono stati esclusi quegli esperimenti in cui la R_a variava in misura maggiore del 20% rispetto ai valori di partenza.

Risposte sinaptiche evocate

Le risposte glutamatergiche sono state evocate in current clamp e voltage clamp mode rispettivamente come potenziali postsinaptici eccitatori (EPSPs) e correnti postsinaptiche eccitatorie (EPSCs). Queste risposte sono state evocate nello striato con un elettrodo bipolare in tungsteno. L'ampiezza della stimolazione variava tra 5-15V e la durata tra 0.01–0.1 ms. Gli esperimenti sono stati condotti in presenza di bicucullina (3 μM) al fine di isolare le risposte glutamatergiche dalle GABA_A mediate. Gli stimoli elettrici sono stati applicati ogni 10s. Questo intervallo è stato scelto perchè, dopo i primi dieci stimoli l'ampiezza delle EPSC non ha un trend significativo di variazione in funzione del tempo (analisi ANOVA, livello di significatività sempre superiore a 0.05).

Farmaci

I farmaci utilizzati per la somministrazione *in vivo* sono stati applicati dopo essere stati solubilizzati alla concentrazione finale desiderata nella soluzione salina. I farmaci usati erano: L-DOPA, benserazide, 6-OHDA (Sigma, Milano, Italy); TAT2A e TAT2B (PRIM, Milano). Per gli esperimenti di elettrofisiologia la bicucullina cloruro (Sigma, Milano, Italy) è stata dapprima sciolta in acqua distillata e poi in ACSF alla concentrazione desiderata per l'esecuzione delle registrazioni elettrofisiologiche.

5. Risultati 1

5.1. Effetto della denervazione dopaminergica nei due modelli sperimentali

Tra i fattori di rischio che favoriscono il manifestarsi delle discinesie da L-DOPA nei pazienti affetti da MP, così come negli animali lesionati con 6-OHDA, un ruolo cruciale è rivestito dal grado di denervazione dopaminergica. In particolare, lo sviluppo degli AIMs è innescato da un livello di denervazione superiore all'80% e la loro gravità è massima quando il 90% delle fibre nigostriatali è compromessa (Winkler *et al.*, 2002). Partendo da questa osservazione abbiamo monitorato il grado della lesione sulle sezioni di mesencefalo utilizzando l'immunoistochimica per l'enzima tirosina idrossilasi (TH) nei due gruppi di animali lesionati, rispettivamente trattati con alte e basse dosi di L-DOPA. I nostri dati rivelano una perdita virtuale di neuroni positivi per la TH nella regione A9 della sostanza nera (Fig 1A, B) così come delle fibre striatali ipsilaterali alla lesione (Fig 1C, D). Pertanto, l'effetto della denervazione dopaminergica non differiva tra i due gruppi sperimentali del nostro studio.

5.2. Il trattamento cronico ma non acuto è in grado di ripristinare l'LTP dopo la denervazione DAergica

Nei neuroni spinosi registrati da fettine corticostriatali di ratti denervati l'HFS delle fibre corticostriatali non è in grado di indurre l'LTP, come avviene di norma negli animali di controllo, in quanto la DA ha un controllo permissivo su questa forma di plasticità (Centonze *et al.*, 1999; Picconi *et al.*, 2003) (Fig 2A, controllo $p < 0.001$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$, $n = 10$; 6-OHDA, $p > 0.05$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$, $n = 10$). Tuttavia, l'applicazione in bagno della DA esogena (30 μ M) non è sufficiente a revertire la perdita dell'LTP corticostriatale in tali condizioni (Fig 2A, 6-OHDA e DA acuta, $p > 0.05$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$, $n = 8$).

In questo studio i ratti 6-OHDA ($n = 45$) sono stati divisi in due gruppi, rispettivamente trattati con somministrazione cronica (4-21 giorni; $n = 35$) e acuta (2 giorni $n = 10$) di dosi terapeutiche di L-DOPA (10 mg/kg metil-L-DOPA e 7.5 mg benserazide, 2 volte al giorno).

Questo trattamento ci ha permesso di concludere che la terapia in acuto di due giorni di L-DOPA non era in grado di ripristinare l'LTP che al contrario risultava inducibile in seguito al trattamento cronico con il farmaco per 4-21 giorni (Fig 2A, B, 2 giorni L-DOPA, $p > 0.05$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$; 4-7 giorni L-DOPA, $p < 0.001$, EPSP $t = -5$ vs $t = 39$; 21 giorni L-DOPA, $p < 0.001$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$; $n = 10$ per ogni condizione sperimentale).

5.3. Il trattamento cronico con alte dosi di L-DOPA induce la sensitizzazione ed un più alto grado di AIMs

La somministrazione di dosi basse di L-DOPA induceva un basso grado di turning in una parte degli animali trattati (dati non mostrati). Al contrario, alte dosi di L-DOPA (50mg/kg/al giorno) causavano un pronunciato comportamento rotazionale in tutti gli animali, sin dalla prima somministrazione (Fig 3A).

Abbiamo inoltre osservato che il numero dei giri controlaterali aumentava progressivamente durante il trattamento raggiungendo un plateau entro 2 settimane (Fig 3A, $**p < 0.001$, 1-3 giorni vs 7-9 giorni, 1-3 giorni vs 13-15 giorni, 1-3 giorni vs 19-21 giorni). La durata dei giri controlaterali indotti dalla L-DOPA subiva una progressiva e significativa riduzione dalla prima alla terza settimana di trattamento (Fig 3B, $*p < 0.05$, $**p < 0.001$, 1-3 giorni vs 7-9 giorni, 1-3 giorni vs 13-15 giorni, 1-3 giorni vs 19-21 giorni). La somministrazione di alte dosi di L-DOPA, determinava la comparsa di discinesie sin dai primi giorni di trattamento in tutti gli animali trattati (45 su 45, Fig 4).

Al contrario, il trattamento con basse dosi di L-DOPA permetteva di distinguere due gruppi di animali: un primo gruppo privo di AIMs (17 su 35) ed un secondo (18 su 35) esibente progressivamente AIMs. È interessante notare che comunque gli AIMs in questi animali erano significativamente più bassi di quelli osservati nei ratti trattati con le alte dosi di L-DOPA (Fig 4).

5.4. Plasticità sinaptica nei ratti parkinsoniani trattati con basse e alte dosi di L-DOPA

È stato precedentemente dimostrato che il trattamento cronico con L-DOPA ripristina l'LTP sia negli animali non-discinetici che nei discinetici. Tuttavia, nel gruppo di animali discinetici il protocollo di LFS perdeva di efficacia, per cui non era possibile depotenziare la sinapsi corticostriatale (Picconi *et al.*, 2003). In questo studio sono stati confermati questi dati, come mostrato in Fig 5A.

Inoltre, qui mostriamo che anche gli animali trattati con alte dosi di L-DOPA, quindi discinetici, sviluppano una normale LTP che continua a non essere depotenziata (Fig 5A, n=10, $p < 0.001$ ratti di controllo vs trattati con L-DOPA ad alte dosi).

L'uso di una bassa dose di L-DOPA forniva differenti risultati nell'espressione del depotenziamento. Tutte le cellule registrate da non discinetici (Fig 5B, n=10, $p > 0.05$, ratti di controllo vs 6-OHDA trattati per 21 giorni con basse dosi di L-DOPA, 15 min dopo la LFS) alla fine del trattamento mostravano un normale depotenziamento mentre i neuroni registrati dai ratti discinetici (Fig 5C, n=10, $p < 0.001$ ratti di controllo vs 6-OHDA trattati con L-DOPA a basse dosi, 15 min dopo la LFS) non mostravano depotenziamento. Un simile risultato rispecchia perfettamente i dati comportamentali.

5.5. Studio della correlazione tra due variabili: AIMs e depotenziamento

Per valutare una possibile relazione tra le anomalie motorie e depotenziamento è stata calcolata la correlazione lineare tra livello di AIMs e depotenziamento nei gruppi sperimentali. Sorprendentemente, questo calcolo ha rivelato una correlazione altamente significativa tra le due variabili (Fig 6, n=10 per entrambi i gruppi; $p < 0.0001$, $\rho = 0.9$).

5.6. Proprietà intrinseche di membrana dei neuroni spinosi registrati da diversi gruppi sperimentali

E' stato infine analizzato se l'espressione differenziale dei cambiamenti plastici che noi abbiamo osservato nei vari gruppi sperimentali dopo i diversi trattamenti farmacologici era causata da alterazioni delle proprietà intrinseche di membrana dei neuroni spinosi registrati dai gruppi sperimentali e sono risultati paragonabili (RPM: sham= -90 ± 5 mV; 6-OHDA= -85 ± 7 mV; 6-OHDA e basse dosi di L-DOPA= -87 ± 5 mV; 6 OHDA e alte dosi L-DOPA= 90 ± 3 mV). Concludendo, le proprietà elettrofisiologiche erano simili a quelle precedentemente riportate per i neuroni spinosi striatali (Calabresi *et al.*, 1993; Jang and North, 1991; Kita *et al.*, 1984).

6. Discussione

Numerose osservazioni sperimentali e cliniche suggeriscono che il trattamento con alte dosi di L-DOPA sia un rischio per una precoce comparsa di complicazioni motorie.

Tuttavia, i meccanismi patofisiologici che sottendono questi processi non sono stati completamente elucidati.

Pertanto, l'obiettivo del presente studio è stato di caratterizzare i meccanismi sinaptici che determinano l'espressione delle complicazioni motorie della terapia con L-DOPA negli animali parkinsoniani.

Nel 50% dei pazienti con MP le complicazioni motorie dovute alla terapia con L-DOPA si manifestano dopo 5 anni dall'inizio del trattamento e nel 100% dei pazienti con insorgenza precoce della malattia (Fahn, 2000; Golbe, 1991).

Le complicazioni motorie nei pazienti trattati con L-DOPA sono dose-dipendenti ed iniziano più precocemente di quanto prima ritenuto (Fahn *et al.*, 2004), come recentemente dimostrato nello studio ELL-DOPA.

In accordo, ricerche condotte su modelli animali di MP nei roditori (Lindgren *et al.*, 2007) così come nei primati non-umani (Maratos *et al.*, 2001) rivelano che alte dosi di L-DOPA sono associate ad un aumentato rischio di complicazioni motorie, confermando quanto osservato nei pazienti con MP (Schrag and Quinn, 2000).

Per comprendere meglio il grado di complicazioni motorie nei due gruppi sperimentali trattati rispettivamente con alte e basse dosi di L-DOPA sono stati eseguiti test comportamentali mirati alla valutazione della sensitizzazione controlaterale rotatoria, della risposta rotazionale nonché degli AIMs, durante il periodo di trattamento di 3 settimane.

La somministrazione di alte dosi di L-DOPA induceva uno sviluppo di AIMs in tutti gli animali parkinsoniani, mentre basse dosi avevano lo stesso effetto solo in metà degli animali trattati. Comunque, anche negli animali che esibivano un comportamento discinetico lo score degli AIMs era significativamente inferiore paragonato agli animali sottoposti ad un trattamento con alte dosi.

Successivamente, sono stati eseguiti esperimenti di elettrofisiologia *in vitro* nelle slices collezionate dai gruppi sperimentali considerati nello studio.

Nel presente studio è stato confermato che i neuroni spinosi registrati da fettine corticostriatali prelevate da ratti denervati perdono la capacità di potenziare l'efficacia della trasmissione sinaptica. Semplificando, il convenzionale protocollo di HFS non è in grado di indurre l'LTP in queste condizioni (Centonze *et al.*, 1999, 2003; Picconi *et al.*, 2003; Kerr and Wickens, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

Nel tentativo di ripristinare *in vitro* questa forma di plasticità sinaptica si è proceduto alla incubazione delle slices con DA esogena. Tuttavia, questo trattamento non si è dimostrato efficace.

Anche un breve trattamento *in vivo* con L-DOPA falliva nel ripristinare l'LTP nei neuroni denervati. Quest'ultima osservazione suggerisce che l'attivazione acuta dei recettori DAergici non è sufficiente a ripristinare questa forma di plasticità sinaptica dopo la denervazione da dopamina.

In uno studio precedente era stato dimostrato che l'LTD, un'altra ben caratterizzata forma di plasticità sinaptica, è ripristinata *in vitro* attraverso applicazione di DA esogena.

È plausibile che diversamente dall'LTD, l'LTP richieda l'attivazione a lungo termine dei recettori della DA come conseguenza di un profondo rimodellamento delle spine dendritiche (Ingham *et al.*, 1998) e del compartimento post-sinaptico, in particolare nella distribuzione delle subunità del recettore NMDA e della fosforilazione della CaMKII (Picconi *et al.*, 2004; Gardoni *et al.*, 2006). Verosimilmente, il trattamento cronico con L-DOPA è in grado di correggere le alterazioni morfologiche indotte dalla denervazione (Day *et al.*, 2006) e di ripristinare il corretto assemblaggio delle subunità del recettore NMDA (Gardoni *et al.*, 2006). Entrambi i trattamenti con alte e basse dosi di L-DOPA ripristinavano l'LTP con identiche caratteristiche suggerendo che la suddetta plasticità non sia implicata nelle anomalie che si verificano in seguito al trattamento cronico con L-DOPA.

Nella totalità delle registrazioni condotte nei neuroni spinosi di fettine collezionate da animali discinetici trattati con alte dosi non era possibile osservare il depotenziamento della trasmissione sinaptica. Gli stessi esperimenti di elettrofisiologia eseguiti nel gruppo di animali non discinetici che ricevevano dosi basse di L-DOPA, rivelavano un fisiologico depotenziamento anche nell'ultima fase di trattamento.

Studi post-mortem su cervelli umani mostrano che pazienti colpiti o meno da discinesie hanno un grado di lesione nigrostriatale simile (Calon *et al.*, 2004). Questi risultati sono stati confermati in modelli animali di discinesie da L-DOPA (Cenci *et al.*, 2007; Picconi *et al.*, 2003).

Concludendo, queste evidenze suggeriscono che altri fattori al di là della disfunzione presinaptica possano avere un ruolo nell'induzione della discinesia da L-DOPA.

Nello specifico, la perdita del depotenziamento potrebbe avere profonde implicazioni nella patofisiologia delle discinesie da L-DOPA, poichè il depotenziamento è implicato nei meccanismi di forgetting (Picconi *et al.*, 2003).

Secondo questa visione, le discinesie sarebbero causate da un'aberrante storage delle informazioni per cui i neuroni striatali conservano informazioni non essenziali, ridondanti, che in condizioni fisiologiche vengono cancellate.

Figura 1

I due gruppi sperimentali riceventi basse e alte dosi di L-DOPA hanno lo stesso grado di denervazione dopaminergica.

(A) Foto ottenute dalla sostanza nera ipsilaterale e controlaterale alla lesione in un ratto ricevente basse dosi (pannello in alto) e alte dosi di L-DOPA (pannello in basso). I neuroni positivi per NeuN sono visualizzati in fluorescenza di rosso utilizzando il labeling Cy3 ed il colore verde corrisponde ai neuroni positivi per TH (visualizzati in verde utilizzando Cy2). (B) Lo staining per i neuroni positivi per TH mostra un livello di denervazione paragonabile. (C) Foto ottenute dallo striato ipsilaterale e controlaterale alla lesione con 6-OHDA in un ratto ricevente basse dosi (pannello in alto) e in quello trattato con alte dosi (pannello in basso). (D) La densità della immunostochimica per le fibre TH analizzate dello striato mostra un identico livello di denervazione.

Figura 2

Il trattamento cronico ma non acuto ripristina la plasticità sinaptica fisiologica.

(A) L'HFS delle fibre corticostriatali induce LTP in condizioni di controllo ($p < 0.001$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$, $n = 10$). Al contrario l'LTP è assente in seguito alla lesione DAergica unilaterale nei 6-OHDA ($p > 0.05$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$, $n = 10$). Come mostrato, nè il trattamento con DA esogena o la somministrazione per soli due giorni di una dose bassa di L-DOPA sono sufficienti a ripristinare l'LTP (6-OHDA e DA, $p > 0.005$ EPSP $t = -5$ vs $t = 30$, $n = 8$; 2 giorni di L-DOPA, $p > 0,05$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$, $n = 10$). (B) Il trattamento cronico con L-DOPA a basse dosi ripristina l'LTP (4-7 giorni L-DOPA, $p < 0.001$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$; 21 giorni di L-DOPA,

$p < 0.001$, EPSP $t = -5$ vs $t = 30$, $n = 10$ per ogni gruppo sperimentale. (C) Tracce degli EPSP ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali, paragonate 5 minuti prima dell'HFS e 30 minuti dopo l'HFS.

Figura 3

Trattamento con alte dosi di L-DOPA, effetti sul comportamento.

(A) Il numero di giri indotti da alte dosi di L-DOPA entro lo stesso intervallo aumenta progressivamente durante il trattamento raggiungendo il plateau dopo 15 giorni di trattamento ($p < 0.001$, 1-3 giorni vs 7-9 giorni, 1-3 giorni vs 13-15 giorni, 1-3 giorni vs 19-21 giorni). (B) La durata del turning dopo una singola dose alta di L-DOPA è progressivamente ridotta nel tempo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, 1-3 giorni vs 7-9 giorni, 1-3 giorni vs 13-15 giorni, 1-3 giorni vs 19-21 giorni).

Figura 4

Il trattamento cronico con alte dosi di L-DOPA induce un più alto livello di AIMs.

Il trattamento cronico con alte dosi di L-DOPA induce un alto grado di AIMs in tutti gli animali trattati (45 su 45). Al contrario il trattamento con basse dosi induce movimenti discinetici in metà degli animali trattati (18 su 35) e nella restante parte non sono stati osservati AIMs (17 su 35).

Figura 5

Alte dosi di L-DOPA inducono la perdita del depotenziamento mentre basse dosi inducono questo effetto solo nel 50% degli animali.

(A) In condizioni di controllo è possibile indurre rispettivamente LTP e depotenziamento mediante i protocolli di HFS e LFS. Nei ratti parkinsoniani trattati con alte dosi di L-DOPA il depotenziamento è completamente perso ($n = 10$; $p < 0.001$). (B) Le cellule registrate dagli

animali non discinetici alla fine del trattamento mostravano un normale depotenziamento (n=10, $p<0.05$). (C) I neuroni registrati dai ratti discinetici in seguito al trattamento con basse dosi di L-DOPA non mostravano depotenziamento (n=10, $p<0.001$ ratti di controllo vs 6-OHDA più 21 giorni di L-DOPA a basse dosi 15 min post-LFS).

Figura 6

Correlazione tra quantità di AIMS durante il trattamento cronico ed EPSP in seguito LFS nei neuroni spinosi.

Il grafico mostra la correlazione tra quantità di AIMS durante il trattamento cronico con L-DOPA e l'ampiezza dell'EPSP in seguito alla LFS nei neuroni spinosi. Il calcolo della correlazione lineare test unpaired mostra una correlazione altamente significativa (n=10, per ogni gruppo; $p<0.0001$, $\rho=0.9$) tra le due variabili.

7. Risultati 2

Nel presente studio abbiamo utilizzato dosi terapeutiche di L-DOPA (10mg/kg metil-L-DOPA in associazione con 7.5 mg/kg benserazide, due volte al giorno) che inducevano uno sviluppo graduale di AIMs (Picconi *et al.*, 2003) nel 50% dei ratti. Prima del trattamento con L-DOPA questi due gruppi di animali esibivano lo stesso grado di danneggiamento delle performances motorie (rotarod test, stepping test). Dopo 12 giorni di trattamento le due sottopopolazioni sono state distinte in risposta alla L-DOPA basandosi sul grado di AIMs.

7.1. Caratterizzazione dei compartimenti subcellulari

Si è proceduto alla purificazione dei compartimenti subcellulari dei tessuti striatali utilizzando un metodo di frazionamento biochimico (Fig. 1a) e l'efficacia della procedura è stata valutata attraverso analisi di Western blotting per le proteine markers dei compartimenti subcellulari (Fig. 1b). La proteina PSD-95 e le subunità del recettore NMDA sono state trovate aumentate nella frazione di membrana P2, P3 e nella frazione triton insolubile (TIF). Queste proteine sono state trovate anche se in minor quantità nell'omogenato totale (H), in low-speed supernatant (S1), and nelle membrane associate ai nuclei (P1). Comunque, le subunità NR2A ed NR2B del recettore NMDA, così come PSD-95 non erano rintracciabili nella frazione citosolica (S2) o nella frazione triton solubile (TSF). I nostri risultati ottenuti nei tessuti striatali sono in accordo con precedenti studi sulla localizzazione delle subunità del recettore NR2A ed NR2B in altre regioni cerebrali (Gardoni *et al.*, 2003b). Come precedentemente riportato, la CaMKII era presente in tutte le frazioni ma particolarmente concentrata in TSF e TIF (Gardoni *et al.*, 2003a).

7.2. Livelli delle subunità del recettore NMDA nello striato in seguito alla lesione con 6-OHDA e al trattamento cronico con L-DOPA

I livelli delle subunità del recettore NMDA sono stati monitorati mediante analisi di Western blot in omogenato e TIF (Picconi *et al.*, 2004) in campioni di tessuto prelevati dalle seguenti categorie di animali: controlli (CTRL), lesionati (6-OHDA) e trattati con L-DOPA. Le stesse quantità di proteine ottenute dai diversi gruppi sono state successivamente caricate su un gel di sodio dodecil solfato (SDS).

Nella frazione omogenato, come precedentemente riportato (Picconi *et al.*, 2004), non è stata riscontrata nessuna differenza nella espressione delle subunità del recettore NMDA (Fig. 2, pannello sinistro) rispetto ai controlli, mentre i livelli di NR2B erano ridotti selettivamente nel TIF purificato da ratti 6-OHDA paragonati con gli animali CTRL. Negli stessi campioni i livelli di subunità NR1 ed NR2A risultavano inalterati (Fig. 2, pannello destro).

Al contrario, sono state trovate profonde differenze nella composizione del recettore NMDA nel TIF di animali discinetici (DYS).

In particolare, i ratti DYS erano caratterizzati da un aumento significativo dell'immunostaining della subunità NR2A parallelo ad una riduzione dei livelli della proteina NR2B (Fig. 2, pannello destro). In entrambi i gruppi, DYS e NON-DYS, non sono state trovate modificazioni dei livelli di NR1 se paragonati ai controlli.

7.3. Interazione funzionale tra MAGUK–NMDAR in seguito alla lesione e al trattamento cronico con L-DOPA

Le interazioni delle subunità del recettore NMDA NR2A/B con SAP102 (Sans *et al.*, 2003) e SAP97 (Gardoni *et al.*, 2003a) sono coinvolte nel trafficking del recettore NMDA verso i siti sinaptici nei neuroni.

Partendo da questa considerazione abbiamo verificato se le alterazioni sinaptiche delle subunità NR2A ed NR2B erano attribuibili ad anomalie della interazione con i membri MAGUK: PSD-95, SAP97, e SAP102. I nostri dati mostrano che la lesione dopaminergica induce una significativa riduzione dei livelli delle tre proteine nel TIF (compartimento postsinaptico)

rispetto agli animali CTRL e queste modificazioni venivano riportate a livelli di controllo ed oltre in seguito al trattamento cronico con L-DOPA, eccezion fatta per PSD-95 (Fig. 3, pannello destro).

Successivamente abbiamo valutato l'interazione delle subunità NR2A ed NR2B con SAP97 e SAP102 (Prybylowski and Wenthold, 2004) per chiarire se le sopracitate alterazioni potessero essere associate ad una alterazione del trafficking delle subunità operato dalle MAGUK verso la sinapsi. Pertanto sono stati condotti esperimenti di coimmunoprecipitazione e il binding della subunità NR2A alle MAGUK è stato trovato inalterato nei diversi gruppi sperimentali (Fig. 4b) mentre il binding di NR2B a SAP102 era significativamente ridotto negli animali 6-OHDA e nei DYS (Fig. 4 a).

7.4. Fosforilazione in Ser e Tyr di NR2B in seguito alla denervazione e al trattamento cronico con L-DOPA

La dinamica regolazione del trafficking/turnover di NR2B è strettamente legata alla fosforilazione diretta della subunità da parte di CaMKII (Omkumar *et al.*, 1996; Gardoni *et al.*, 1998; Strack and Colbran, 1998) e delle tirosin chinasi (Dunah and Standaert, 2001) in specifici siti di fosforilazione.

Tenendo conto di questo importante ruolo della fosforilazione nel processo di trafficking e di turnover, abbiamo monitorato la fosforilazione di NR2B utilizzando due anticorpi fosfo-specifici contro i fosfositi CaMKII-dipendenti Ser1303 e Tyr1472 nel dominio C-terminale di NR2B (Fig. 5a,b).

I Western blotting per NR2B totale sono stati corsi sempre in parallelo. Non è stata trovata alcuna modificazione di immunostaining per p1303Ser-NR2B e p1472Tyr-NR2B negli omogenati totali striatali mentre nelle frazioni TIF il pattern di fosforilazione di NR2B era simile al livello alterato di NR2B totale, significativamente ridotto in 6-OHDA e DYS (Oh *et al.*, 1999) se paragonato al CTRL e agli animali NON-DYS (Figs. 1, 5b-d).

Pertanto, non è stata trovata nessuna differenza significativa nel rapporto di fosfo-NR2B/NR2B totale nei diversi gruppi sperimentali (Fig. 5 e,f) .

7.5. Redistribuzione subcellulare della subunità NR2B tra i siti sinaptici ed extrasinaptici nei ratti trattati con L-DOPA e DYS

Per comprendere la distribuzione di NR2B negli animali trattati con L-DOPA, abbiamo eseguito analisi di Western blotting per questa subunità nella frazione P2 e nel TSF. I livelli di proteine NR2B non sono risultati alterati in P2 (Fig. 6a). Al contrario, erano aumentati nel TSF di animali 6-OHDA e DYS (Figs. 1, 6a). Questi risultati suggeriscono una redistribuzione di NR2B dalle frazioni insolubili di membrane alle solubili, nei 6-OHDA così come nei DYS, molto probabilmente verso i siti extrasinaptici.

Ulteriore conferma di questo risultato è stata ottenuta attraverso esperimenti di Western blotting per CREB e pCREB in omogenati striatali.

Studi precedenti dimostrano che i recettori sinaptici NMDA contenenti la subunità NR2B promuovono il signaling per CREB, mentre gli extrasinaptici lo antagonizzano (Hardingham *et al.*, 2002). I livelli di pCREB sono risultati drammaticamente ridotti in 6-OHDA ed in animali DYS paragonati con gli altri gruppi sperimentali, confermando l'indicazione di un aumentato numero di recettori extrasinaptici contenenti NR2B nei 6-OHDA e nei DYS (Fig. 6b).

7.6. Il comportamento motorio discinetico è correlato alla localizzazione sinaptica della subunità NR2B

I dati mostrati in questo studio suggeriscono che la traslocazione della subunità NR2B verso i siti extrasinaptici potrebbe essere un elemento chiave nella complessa modificazione della sinapsi glutammatergica nelle discinesie indotte da L-DOPA.

È ben chiarito che le interazioni del dominio C-terminale delle subunità NR2B con i domini PDZ delle proteine MAGUK gioca un ruolo importante nella regolazione della localizzazione del recettore NMDA ai siti sinaptici (Sheng, 2001; Prybylowski and Wenthold, 2004).

Pertanto, abbiamo testato se il comportamento motorio nei ratti NON-DYS potesse essere modificato dalla acuta dissociazione della subunità NR2B dalle MAGUK attraverso l'iniezione del peptide TAT fuso con il C-terminale degli ultimi nove aminoacidi della NR2B (TAT2B) (Aarts *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2003). Come controllo è stato eseguito il trattamento col peptide inattivo TAT2B(-SDV).

Prima della somministrazione dei peptidi ai ratti, è stato valutato l'effetto dei peptidi TAT2B e TAT2B(-SDV) negli omogenati striatali di ratti NON-DYS.

Il trattamento con TAT2B era in grado di ridurre significativamente la coprecipitazione di NR2B con PSD-95 (Fig. 7c) dimostrando che questo approccio è utile per mimare nei ratti NON-DYS il ridotto livello di interazione tra MAGUK–NR2B trovata nei ratti DYS ($-44,4 \pm 6,4$ %; $p < 0.01$ NR2B NON-DYS vs NON-DYS). Come atteso, nessun effetto è stato riscontrato in seguito alla applicazione del peptide TAT2B (-SDV) (Fig. 7c). Effetti simili sono stati ottenuti in esperimenti di coimmunoprecipitazione condotti per testare l'interazione di NR2B con SAP102 e SAP97 (dati non mostrati).

Il trattamento con TAT2B era capace di ridurre drammaticamente i livelli di proteina NR2B nel TIF di animali NON-DYS come dimostrato da analisi di Western blotting (Fig. 7 a,b $p < 0.01$, NR2B NON-DYS più TAT2B vs NON-DYS).

Il peptide non alterava l'espressione di NR2B in quanto nell'omogenato totale non è stato riscontrato alcun effetto (Fig. 7a) mentre il TAT2B(-SDV) non induceva alcun effetto sulla localizzazione di NR2B nel TIF (Fig. 7 a,b).

Quindi, gli animali sono stati trattati con L-DOPA e dopo 2 settimane, ogni gruppo sperimentale ha ricevuto 3 iniezioni consecutive di TAT2B (500 μ M) or TAT2B(-SDV) (500 μ M), 1 ora prima della somministrazione di L-DOPA nello striato ipsilaterale alla lesione.

Da un punto di vista comportamentale, l'iniezione con TAT2B non produceva alcun cambiamento del comportamento negli animali controllo, lesionati e discinetici (dati non mostrati). Sorprendentemente, la dissociazione acuta dell'interazione MAGUK–NR2B attraverso le iniezioni di TAT2B associato a somministrazione di L-DOPA era in grado di indurre AIMs nei ratti non discinetici sin dal primo giorno di trattamento, raggiungendo il 50% degli AIMs degli animali discinetici non trattati (Fig. 7d NON-DYS trattati con TAT2B AIMs 12.73 ± 3.784 ; DYS AIMs, 26.70 ± 1.787 ; $p < 0.05$, NON-DYS vs NON-DYS trattati con TAT2B e NON-DYS trattati con TAT2B(-SDV) vs NON-DYS trattati con TAT2B; $p < 0.01$, DYS vs NON-DYS).

7.7. Proprietà intrinseche dei neuroni spinosi registrati nei gruppi DYS e NON-DYS

I neuroni spinosi striatali sono stati registrati con tecnica intracellulare sharp electrode da fettine corticostriatali coronali collezionate da animali lesionati con 6-OHDA e trattati cronicamente con L-DOPA, questi ultimi divisi in DYS e NON-DYS.

I MSNs registrati dai due gruppi sperimentali presentavano proprietà intrinseche di membrana simili a quelle precedentemente riportate (Calabresi *et al.*, 1990, 1993, 1996b; Jiang and North 1991; Kita *et al.*, 1984).

Queste proprietà includono: alto potenziale di membrana a riposo (-86 ± 4 mV); risposte asimmetriche a steps di corrente positiva e negativa (inward ed outward rectification); lenta rampa depolarizzante durante steps di corrente positiva sotto soglia e ritardata comparsa di potenziali d'azione in seguito a stimoli sopra soglia, resistenza di membrana pari a 40 ± 8 M Ω .

7.8. Effetti dei peptidi disaccoppianti MAGUK/NR2B ed NR2A sul fenomeno del depotenziamento nei gruppi non discinetici e discinetici

È noto che il protocollo di HFS in fettine corticostriatali in assenza di ioni magnesio induce il potenziamento a lungo termine dei potenziali postsinaptici eccitatori (EPSPs). L'applicazione di un protocollo di LFS ripristina i livelli della trasmissione sinaptica che precedono l'HFS favorendo l'efficienza della raccolta delle informazioni attraverso la rimozione delle informazioni motorie non essenziali. Questa capacità viene persa dai MSNs registrati da fettine corticostriatali collezionate da ratti DYS (Picconi *et al.*, 2003) e tale alterato meccanismo sinaptico è stato considerato alla base delle anomalie motorie in corso di discinesie da L-DOPA. Come precedentemente detto, la modificazione della composizione quali-quantitativa del recettore NMDA svolge un ruolo cruciale nell'insorgenza del comportamento discinetico. Poiché la somministrazione del peptide TAT2B era in grado di indurre l'insorgenza di discinesie negli animali non discinetici è stato valutato l'effetto del disaccoppiante della subunità NR2B sul fenomeno del depotenziamento nei MSNs registrati da animali NON-DYS *in vitro*.

Sorprendentemente, l'incubazione del TAT2B in fettine corticostriatali, (5 min dopo l'induzione dell'LTP, 10 min pre-LFS e 10 minuti durante LFS) era in grado di bloccare il depotenziamento che è normalmente osservato negli animali trattati con L-DOPA non discinetici (Fig. 9 pannello in alto). Tale risultato elettrofisiologico *in vitro* è in accordo con quanto osservato *in vivo* in seguito alla somministrazione del peptide TAT2B nell'animale NON-DYS. Ancor più interessante, soprattutto da un punto di vista clinico, è il risultato emerso dalla applicazione del TAT2A in fettine collezionate da animali DYS. Infatti, nei MSNs registrati *in vitro* da fettine provenienti da questo gruppo il peptide restaurava la fisiologica plasticità sinaptica (Fig. 9 pannello in basso).

7.9. L'associazione di TAT2A e L-DOPA *in vivo* riduce l'incidenza delle discinesie

La somministrazione intrastriatale del TAT2A per soli 3 giorni nei ratti DYS in seguito ad un trattamento cronico di 12 giorni con L-DOPA, falliva nel ridurre i movimenti involontari

anomali (dati non mostrati). Probabilmente, il fallimento di tale approccio terapeutico trova una plausibile spiegazione nel solido ancoraggio della subunità NR2A in sinapsi, che la distingue nettamente dalla NR2B il cui trasporto è risultato facilmente perturbabile con un trattamento di breve durata. Tuttavia, i risultati elettrofisiologici rivelavano un sorprendente effetto del peptide TAT2A nel perturbamento della composizione quali-quantitativa del recettore NMDA *in vitro* tanto da ripristinare il depotenziamento nei ratti DYS.

Pertanto, abbiamo riconsiderato l'applicazione *in vivo* del peptide modificando il protocollo di somministrazione. Gli animali lesionati con 6-OHDA, sono stati divisi in due gruppi: ratti trattati con L-DOPA e TAT2A e ratti trattati con L-DOPA e TAT2A(-SDV) somministrando i peptidi per via intraperitoneale 30 minuti prima dell'iniezione di L-DOPA. Al termine di tale trattamento (21 giorni, L-DOPA i.p. 10 mg/kg più benserazide 7.5 mg/kg due volte al giorno e TAT2A o TAT2A(-SDV) in singola somministrazione i.p., 3 nmol/g) è stato possibile osservare una diminuzione significativa nella percentuale dei ratti DYS nel gruppo trattato con TAT2A e L-DOPA rispetto al gruppo trattato con L-DOPA e TAT2A(-SDV) (fig 10, per ogni gruppo n=20; n= 6 animali discinetici nel gruppo trattato con TAT2A vs n=12 discinetici nel gruppo trattato con peptide TAT2A(-SDV), $p<0.05$)

7.10. La plasticità sinaptica non è alterata dal trattamento cronico con TAT2A

In seguito al trattamento cronico col peptide TAT2A associato alla L-DOPA, sono state eseguite registrazioni elettrofisiologiche *in vitro* in configurazione whole cell patch clamp nei neuroni spinosi striatali nei gruppi DYS e NON-DYS.

Per l'induzione della LTD sono state evocate le correnti sinaptiche ad un potenziale di holding di -70 mV. Gli esperimenti sono stati condotti in presenza di bicucullina al fine di isolare la corrente non-NMDA da una eventuale contaminazione delle correnti inibitorie di natura GABAergica GABA_A mediata. Come mostrato in figura 11 (A-B), L'HFS delle fibre

corticostriatali riduceva significativamente le correnti sinaptiche evocate nei neuroni registrati *in vitro* dal gruppo di animali NON-DYS (n=5).

Al contrario, in linea con risultati precedenti al presente studio (non ancora pubblicati) i neuroni registrati dal gruppo di animali DYS perdevano la LTD (fig. n= 5).

Lo studio della LTP è stato condotto in modalità current clamp rimuovendo gli ioni magnesio dalla soluzione di perfusione per facilitare l'attivazione del recettore NMDA ed utilizzando il medesimo protocollo di HFS utilizzato per l'induzione dell'LTD.

Sia nel gruppo di animali NON-DYS (Fig.13) che DYS (Fig.14) in seguito al protocollo di stimolazione ad alta frequenza si assisteva ad un potenziamento a lungo termine dell'ampiezza dei potenziali postsinaptici eccitatori (n=4 per ogni gruppo). Inoltre, nei neuroni spinosi registrati dal gruppo di animali discinetici la LFS non ripristinava i livelli di trasmissione basale che precedono l'LTP (n=3).

8. Discussione

La redistribuzione della subunità NR2B del recettore NMDA da siti sinaptici verso gli extrasinaptici rappresenta un elemento chiave nelle complesse modificazioni della sinapsi glutammatergica nella discinesia da L-DOPA.

Nel presente studio abbiamo dimostrato che, al di là di un'alterata compartimentalizzazione delle subunità del recettore NMDA anche la complessa alterazione delle proteine associate al recettore, le MAGUK, possa rivestire un ruolo cruciale nell'insorgenza delle discinesie.

I ratti parkinsoniani trattati con L-DOPA sono stati divisi in due gruppi: uno mostrante il miglioramento motorio senza discinesie, e l'altro che sviluppa le discinesie debilitanti in risposta al trattamento (Picconi *et al.*, 2003). I nostri risultati mostrano che nel gruppo di animali non discinetici non si verifica alcuna alterazione di localizzazione della subunità NR2B sinaptica, come accade invece nei discinetici a causa di un modificato trafficking della subunità verso siti extrasinaptici. Interessante notare che gli animali discinetici hanno livelli di subunità

NR2A significativamente più alti nel compartimento postsinaptico. Questi eventi risultavano paralleli a profonde modificazioni del legame della subunità NR2B del recettore NMDA con gli elementi della famiglia delle MAGUK.

L'attivazione del recettore NMDA è strettamente dipendente dalla localizzazione del segnale attivato dal recettore NMDA (Hardingham *et al.*, 2002). I risultati qui presentati confermano e rafforzano il ruolo funzionale della cascata corretta NR2B-CREB all'interno dei neuroni striatali e propongono che una modificazione reversibile della pathway sia coinvolta nel modello sperimentale di Parkinson e nella risposta neuronale cronica alla L-DOPA.

Studi recenti nei primati suggerivano che la upregulation della subunità NR2A in membrane sinaptosomali può essere un importante fattore nelle discinesie da L-DOPA (Hallett *et al.*, 2005). In accordo, noi mostriamo che i livelli sinaptici di NR2A sono aumentati nei ratti discinetici supportando l'idea che la modificazione dei recettori NMDA ai siti sinaptici potrebbe essere considerata determinante nell'insorgenza delle discinesie da L-DOPA. Ancora più interessante è il risultato ottenuto col trattamento cronico con il peptide TAT2A e la L-DOPA. Infatti, la somministrazione del peptide, capace di perturbare il trasporto della subunità NR2A in sinapsi, è stata in grado di ridurre l'incidenza delle discinesie negli animali trattati con L-DOPA.

Un aumento di NR1/NR2B NMDA è stato osservato nel putamen di pazienti trattati per un anno con discinesie suggerendo che questi recettori possono essere considerati correlati molecolari delle complicazioni motorie. Questi studi suggeriscono che la supersensività dei recettori per il glutammato striatale può essere responsabile dello sviluppo delle discinesie in seguito al trattamento con L-DOPA.

Di recente, sono stati descritti due studi con risultati in apparente contrasto sugli effetti degli antagonisti selettivi delle subunità NR2B sulle discinesie da L-DOPA in due modelli diversi di MP (Nash *et al.*, 2004; Wessell *et al.*, 2004). Comunque, tali studi concordavano nell'identificare NR2B come l'elemento chiave nel parkinsonismo sperimentale e nello

sviluppo delle discinesie da L-DOPA (Nash *et al.*, 2000; Hadj Tahar *et al.*, 2004; Loschmann *et al.*, 2004).

Nel nostro studio, abbiamo confermato ed ampliato questo concetto in quanto, attraverso la distruzione dell'interazione della subunità NR2B con le MAGUK utilizzando il peptide TAT2B siamo stati in grado di indurre un comportamento motorio discinetico in animali trattati con L-DOPA non discinetici.

Sempre maggiore attenzione è stata mostrata nei confronti dei cambiamenti di composizione e fosforilazione dei recettori NMDA nel parkinsonismo sperimentale (Menegoz *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 1999; Dunah *et al.*, 2000; Picconi *et al.*, 2004). I nostri risultati differiscono da risultati precedenti (Nash *et al.*, 2005) che mostrano le modificazioni dei livelli totali striatali di PSD-95 e SAP-97 nel parkinsonismo e nella discinesia da L-DOPA, probabilmente a causa della diversa lesione o del trattamento con L-DOPA come pure delle tecniche di solubilizzazione usate per il frazionamento subcellulare (Nash *et al.*, 2005) in quanto i nostri esperimenti biochimici sono stati eseguiti nel TIF (triton insoluble fraction) (Gardoni *et al.*, 2001) altamente arricchito in proteine PSD. Queste discrepanze potrebbero inoltre spiegare l'assenza di modificazioni della subunità NR2B nel sito di fosforilazione per tirosina trovato nella nostra preparazione per il TIF paragonato con i precedenti studi (Menegoz *et al.*, 1995; Dunah *et al.*, 2000).

In accordo con studi precedenti (Menegoz *et al.*, 1995; Dunah *et al.*, 2000; Hallett *et al.*, 2005), i livelli di proteine del complesso del recettore NMDA (NMDA subunità ed elementi MAGUK) presenti negli omogenati totali non erano modificati nei lesionati e nei ratti trattati con L-DOPA. Nel loro complesso i nostri risultati confermano l'idea che la redistribuzione subcellulare e non l'alterata espressione degli elementi del complesso del recettore NMDA potrebbe rappresentare il principale evento nei neuroni striatali nel parkinsonismo sperimentale e nelle discinesie da L-DOPA.

Un altro aspetto fondamentale da considerare è il ruolo principe della composizione della PSD nell'attività di tutte le sinapsi glutammatergiche. Infatti l'attivazione, il corretto assemblaggio e la corretta localizzazione in sinapsi del complesso recettoriale NMDA sono condizioni necessarie per l'instaurarsi di una forma di plasticità sinaptica come l'LTP (Picconi *et al.*, 2004).

Nel presente studio è stata dimostrata una profonda alterazione della composizione in subunità del recettore NMDA nella PSD striatale, un compartimento altamente ricco di recettori ionotropici al glutammato (Kim and Sheng, 2004). In particolare, i livelli di NR2A e NR2B nello striato sono modificati in modo tale da portare a un aumento del rapporto NR2A/2B, sebbene le MAGUK responsabili del trasporto di queste subunità non siano alterate. Questa modificazione nella composizione in subunità potrebbe contribuire alle alterazioni osservate del mancato depotenziamento della LTP nel gruppo di animali discinetici.

Risultati precedenti dimostravano che i peptidi analoghi al dominio C-terminale di NR2B non mostravano alcun effetto sulla trasmissione sinaptica o sulla induzione della LTP in fettine ippocampali (Lim *et al.*, 2003) anche se producevano una riduzione nel numero di clusters dendritici della PSD-95 e dei recettori NMDA, suggerendo un ruolo di PSD-95 e dei suoi omologhi nella organizzazione dei recettori NMDA nelle sinapsi.

Nelle nostre condizioni, il trattamento cronico con TAT2A, oltre ad avere una significativa efficacia nella prevenzione del comportamento discinetico, si è rivelato privo di effetti deleteri sui fenomeni di plasticità sinaptica striatale. Infatti, né l'induzione né il mantenimento della LTP in striato venivano compromessi dal peptide, come dimostrato dalle registrazioni elettrofisiologiche condotte *ex vivo* in fettine corticostriatali.

Un risultato apparentemente discrepante riguarda gli effetti del peptide *in vitro* sui fenomeni del depotenziamento rispetto agli effetti ottenuti in seguito alla somministrazione *in vivo*.

L'efficacia dell'applicazione del TAT2A nel ripristinare il depotenziamento *in vitro* ha infatti incoraggiato la successiva sperimentazione del peptide *in vivo* associandolo alla L-DOPA sin

dall'inizio della terapia. Sorprendentemente, l'uso concomitante del peptide e di L-DOPA riduceva significativamente l'insorgenza delle discinesie rispetto al gruppo trattato con L-DOPA ed il peptide inattivo TAT2A(-SDV). Tuttavia, il peptide non era in grado di ripristinare il depotenziamento negli animali già discinetici. Questo risultato indica che il peptide è in grado di ridurre significativamente l'incidenza delle discinesie, ma non è in grado di revertirle una volta che queste si siano instaurate. Questo dato è in accordo con quanto osservato precedentemente con un trattamento che prevedeva la somministrazione intrastriatale di TAT2A per 3 giorni negli animali che erano affetti da discinesie.

Il fatto che il trattamento *in vivo* non sia in grado di ripristinare il depotenziamento mentre l'applicazione *in vitro* è efficace è solo apparentemente in contrasto.

Come è noto le due condizioni sperimentali sono molto diverse in quanto il trattamento *in vitro* perturba probabilmente più profondamente l'assemblaggio delle subunità in sinapsi di quanto non faccia il trattamento *in vivo* in cui subentrano fenomeni di compensazione legati verosimilmente alla trascrizione genica.

Qui aggiungiamo una rilevante conoscenza sul ruolo delle proteine MAGUK nel guidare una risposta motoria fisiologica mostrando che una modificazione del binding delle MAGUK a specifiche subunità del recettore NMDA è strettamente correlato ad un anomalo comportamento motorio dopo il trattamento cronico con L-DOPA. Inoltre, questi risultati rivelano che la somministrazione dei peptidi TAT *in vivo* potrebbe costituire una nuova strategia terapeutica nella prevenzione delle discinesie indotte da L-DOPA. Infatti, il trattamento con il peptide non è in grado di ridurre le discinesie una volta instaurate, ma è in grado di prevenirne l'insorgenza se somministrato sin dall'inizio della terapia con L-DOPA.

Figura 1.

a, Caratterizzazione del metodo di frazionamento biochimico utilizzato nel presente studio. La procedura per il frazionamento subcellulare è descritta in Materiali e Metodi. b, Frazioni isolate biochimiche da tessuti striatali separate mediante SDS-PAGE. Blots sono stati testati con anticorpi contro NR2B, NR2A, PSD-95, sinaptofisina, CaMKII. Wb, Western Blot.

Figura 2.

Effetti della lesione e del trattamento con L-DOPA sulle subunità del recettore NMDA in striato. Gli animali lesionati sono stati trattati cronicamente con L-DOPA e divisi in due gruppi in base alla presenza (DYS) o assenza di discinesie (Non DYS). Gli omogenati striatali (Homo) e TIF da 6-OHDA, discinetici e non discinetici sono stati analizzati mediante western blot utilizzando anticorpi NR1, NR2A ed NR2B. La stessa quantità di proteina è stata caricata per ogni campione (NR2A, $p < 0.05$ discinesia vs controllo; NR2B, $p < 0.01$, discinetici vs controllo e 6-OHDA vs controllo; $n = 8$ per ogni gruppo sperimentale, C, controllo).

Figura 3.

Omogenati striatali (Homo, sinistra) e TIF (destra) da ratti lesionati, DYS e NON-DYS analizzati mediante western blot con anticorpi PSD-95, SAP-97 e SAP-102.

Gli istogrammi mostrano la quantificazione del western blotting per le proteine MAGUK nelle frazioni omogenato e TIF. I dati sono normalizzati come percentuale di PSD-95, SAP-97 e SAP-102 nei ratti controllo (C) ($p < 0.05$, SAP 97 e PSD-95 6-OHDA vs controllo; $p < 0.005$, SAP-102 6-OHDA vs controllo, $n = 8$ per ogni gruppo).

Figura 4.

Omogenati striatali da sham, 6-OHDA e animali trattati con L-DOPA discinetici e non-discinetici immunoprecipitati con anticorpi NR2A ed NR2B. Analisi di western blot eseguita in

omogenati immunoprecipitati con anticorpi NR2B, NR2A, SAP 102, SAP 97, PSD 95 e GluR1. Gli istogrammi mostrano la quantificazione del western blot per le MAGUK eseguita nel materiale immunoprecipitato. I dati sono normalizzati per lo staining totale di NR2A ed NR2B nell'immunocomplesso ($p < 0.01$, SAP102/NR2, 6-OHDA vs controlli e discinetici vs controlli; $p < 0.05$, PSD-95/NR2B e SAP97/NR2B, non-discinetici vs controlli, $n=6$ per ogni gruppo).

Figura 5.

Omogenati striatali e TIF degli sham, 6-OHDA, discinetici e non-discinetici analizzati con anticorpi per NR2B, p1472Tyr, p1303 Ser-NR2B. Gli omogenati striatali (homo) e la frazione insolubile al triton (TIF) da controlli, 6-OHDA, DYS e non DYS sono stati analizzati mediante western blot con anticorpi NR2B, p1472tyr-NR2B e p1303ser-NR2B. Gli istogrammi mostrano la quantificazione del western blotting eseguito sulla frazione TIF. I dati sono normalizzati per l'immunoreattività totale di NR2B nel TIF.

Figura 6.

Omogenati striatali, frazioni di membrane crude (P2), TSF, e TIF ottenute dai controlli, 6-OHDA, discinetici e non-discinetici, analizzate con western blot con anticorpi NR2B.

a, Omogenati striatali (Homo), frazioni di membrana cruda (P2), TSF, e TIF, da ratti controllo (c), 6-OHDA, DYS e Non DYS, sono stati analizzati mediante tecnica di western blotting con anticorpo NR2B. b, Gli omogenati striatali da ratti controllo, 6-OHDA, DYS e Non DYS sono stati analizzati mediante western blotting con CREB e pCREB. Gli istogrammi mostrano la quantificazione della CREB fosforilata negli omogenati striatali nei vari gruppi sperimentali. I dati sono normalizzati per l'immunoreattività di CREB striatale nei rispettivi campioni ($p < 0.01$, pCREB/CREB 6-OHDA vs controllo e discinetici vs controllo; $n= 8$ in ogni gruppo sperimentale).

Figura 7.

a. Omogenati striatali e il TIF in controllo, 6-OHDA, DYS e non DYS, non DYS e TAT2B e nonDYS e TAT2B(-SDV) analizzati mediante western blotting con anticorpi per PSD-95, NR2A ed NR2B. b. Gli istogrammi mostrano la quantificazione di NR2A, NR2B e PSD-95 nel TIF degli striati dei diversi gruppi sperimentali ($p < 0.05$, NR2B 6-OHDA vs controllo e discinesia vs controllo; $p < 0.02$, R2B non dys e TAT2B vs non DYS e non DYS e TAT2B (-SDV) vs non DYS e TAT2B; $p < 0.05$ NR2A DYS vs controllo; $p < 0.05$, PSD-95 6-OHDA vs controllo; $n = 6$ per ogni gruppo sperimentale). c. Coimmunoprecipitazione di PSD-95 e NR2A NR2B nell'omogenato di ratti non DYS in presenza o assenza di TAT2B (500 μ M) o TAT2B(-SDV) (500 μ M). d. Analisi degli effetti della iniezione del TAT2 B intrastriatale nei ratti non DYS. Tre tes consecutivi di AIMs nei ratti non DYS (** $p < 0.05$, non DYS vs non DYS e TAT 2B e non DYS e TAT2B(-SDV) vs non DYS e TAT2B; *** $p < 0,01$ DYS vs non DYS; $n = 6$ in ogni gruppo sperimentale).

Figura 8.

Lo schema rappresenta la distribuzione delle subunità del recettore NMDA nel gruppo di animali discinetici e non-discinetici e la conseguente attivazione o inibizione della via di trascrizione CREB mediata.

Figura 9.

Grafici rappresentanti il time-course dell'LTP e del depotenziamento rispettivamente nel gruppo discinetico ($n = 5$) e non discinetico ($n = 4$). L'applicazione *in vitro* del peptide TAT2B 10 min prima del protocollo di LFS e durante tale protocollo blocca l'induzione del depotenziamento nel gruppo di animali non-discinetici e al contrario, il peptide TAT2A ripristina il depotenziamento negli animali discinetici in cui tale fenomeno è assente.

Figura 10.

La somministrazione del peptide TAT2A riduce l'incidenza delle discinesie. Nel grafico sono mostrati due gruppi sperimentali, animali lesionati con 6-OHDA trattati con TAT2A o con TAT2A-SDV (per ogni gruppo n=20) ed il numero di soggetti che sviluppa le discinesie. Il numero di soggetti discinetici nel gruppo trattato con TAT2A risulta significativamente minore rispetto al numero di tali soggetti nel gruppo trattato con peptide inattivo (n= 6 trattati con TAT2A, n=12 trattati con TAT2A-SDV, $p<0.01$).

Figura 11.

LTD negli animali discinetici e non-discinetici trattati cronicamente con il peptide TAT2A. (A) In grafico è rappresentato il time-course dell'LTD nel gruppo di animali discinetici e non-discinetici (Dys, n=5, $p>0.05$, pre vs post HFS; non Dys, n=4, $p<0.01$, pre vs post HFS) (B) Medie delle tracce delle EPSC evocate 10 minuti prima dell'HFS e 30 minuti dopo la sua induzione.

Figura 12.

Time-course dell'LTP negli animali non-discinetici. (A) In grafico è mostrato l'andamento dell'LTP negli animali non-discinetici trattati cronicamente con TAT2A e L-DOPA (n=3, $p<0.01$, pre vs post HFS). (B) Esempio di tracce delle EPSCs evocate nei MSNs 10 minuti prima e 30 minuti dopo l'HFS.

Figura 13.

Il trattamento cronico con TAT2A non perturba l'induzione dell'LTP nel gruppo di animali discinetici, tuttavia non ripristina il depotenziamento in questo gruppo. In (A) è mostrato il time-course dell'LTP nei neuroni spinosi (n=4, $p<0.01$, pre vs post HFS) e l'assenza del

depotenziamento in seguito ad un protocollo di LFS. In (B) è mostrato un esempio di medie delle tracce degli EPSP registrati 10 min prima e 15 minuti dopo l'HFS e 20 minuti dopo la LFS.

9. Bibliografia

ARNT, J. & HYTTTEL, J. (1985). Differential involvement of dopamine D-1 and D-2 receptors in the circling behaviour induced by apomorphine, SKF 38393, pergolide and LY 171555 in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Psychopharmacology*, (Berl) 85, 346-52.

AHLSSKOG, J.E., MUENTER, M.D. (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord.*, 16(3):448-58.

ALEXANDER, G.E., (1990) Crutcher Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.*,13(7):266-71. Review.

ARBUTHNOTT, G.W., INGHAM, C.A., WICKENS, J.R. (2000). (Review) Dopamine and synaptic plasticity in the neostriatum. *J. Anat.*, 196 (Pt 4), 587-596.

BERGMAN, H., FEINGOLD, A., NINI, A., RAZ, A., SLOVIN, H., ABELES, M., VAADIA, E. (1998) Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci.*, 21(1):32-8. Review.

BERENDSE, H.W., GROENEWEGEN, H.J. (1990) Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J Comp Neurol.*, 299(2):187-228.

BEZARD, E., BROTHIE, J.M. & GROSS, C.E. (2001). Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 577-88.

BEZARD, E., CROSSMAN, A.R., GROSS, C.E., BROTCHE, J.M. (2001) Structures outside the basal ganglia may compensate for dopamine loss in the presymptomatic stages of Parkinson's disease. *FASEB J.*, 15(6):1092-4.

BEZARD, E., DOVERO, S., PRUNIER, C., RAVENSCROFT, P., CHALO, S., GUILLOTEAU, D., CROSSMAN, A.R., BIOULAC, B., BROTCHE, J.M. GROSS, C.E. (2001) Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci.*, 21(17):6853-61.

BLANCHET, P.J., METMAN, L.V., MOURADIAN, M.M., CHASE, T.N. (1996) Acute pharmacologic blockade of dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord.*, 11(5):580-1.

BLANDINI, F., NAPPI, G., TASSORELLI, C., MARTIGONI, E. (2000). (Review) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.*, 62(1),63-88.

CALABRESI, P., PISANI, A., MERCURI, N.B. & BERNARDI, G. (1992). Long-term potentiation in the striatum unmasked by removing the voltage-dependent magnesium block of NMDA receptor channels. *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 929-35.

CALABRESI, P., MAJ, R., PISANI, A., MERCURI, N.B., BERNARDI, G. (1992a). Long-term depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J. Neurosci.*, **12**, 4224-33.

CALABRESI, P., MAJ, R., MERCURI, N.B., BERNARDI, G. (1992c) Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. *Neurosci. Lett.*, **142**, 95-99.

CALABRESI, P., PISANI, A., MERCURI, N.B. & BERNARDI, G. (1996). The corticostriatal projection: from plasticity to basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.*, **19**, 19-24.

CALABRESI, P., CENTONZE, D., BERNARDI, G., (2000a). Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *Trends Neurosci.*, **23** (Suppl.), S57-S63.

CALABRESI, P., FEDELE, E., PISANI, A., FONTANA, G., MERCURI, N.B., BERNARDI, G., RAITERI, M. (1995) Transmitter release associated with long-term synaptic depression in rat corticostriatal slices. *Eur J Neurosci.* 7(9):1889-94.

CALON, F., GRODIN, R., MORISSETTE, M., GOULET, M., BLANCHET, P.J., DI PAOLO, T., BEDARD, P.J., (2000a). Molecular basis of levodopa-induced dyskinesias. *Ann. Neurol.* 47, S70-S78.

CALON, F., HADJ TAHAR, A., BLANCHET, P.J., MORISSETTE, M., GRODIN, R., GOULET, M., DOUCET, J.P., ROBERTSON, G.S., NESTLER, E., DI PAOLO, T., BEDARD, P.J., (2000b). Dopamine-receptor stimulation: biobehavioral and biochemical consequences. *Trends Neurosci.* 23, S92-S100.

CALON, F., DRIDI, M., HORNYKIEWICZ, O., BEDARD, P.J., RAJPUT, A.H., DI PAOLO, T., (2004). Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain* 127, 1075-84.

CARLSSON, M., CARLSSON, A. (1990). (Review) Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.*, 13(7), 272-76.

CENCI, M.A, LEE, C.S & BJORKLUND, A. (1998). L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 2694-2706.

CENCI, M.A., LUNDBLAD, M., (2006). Post- versus presynaptic plasticity in LDOPA-induced dyskinesia. *J. Neurochem.* 99, 381–92.

CENCI, M.A., (2007). Dopamine dysregulation of movement control in LDOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci.* 30, 236–243.

CENTONZE, D. *et al.* (1999). Unilateral dopamine denervation blocks corticostriatal LTP. *J. Neurophysiol.*, **82**, 3575-79.

CENTONZE, D., GRANDE,, C., SAULLE, E., MARTIN, A.B., GUBELLINI, P., PAVON, N., PISANI, A., BERNARDI, G., MORATALLA, R., CALABRESI, P., (2003). Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 23, 8506–12.

CHASE, T.N, OH, J.D. (2000). Striatal dopamine- and glutamate-mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *Trends Neurosci.*, **23**, S86-S91.

CHEN, Y.L., HUANG, C.C., HSU, K.S., (2001). Time-dependent reversal of long term potentiation by low-frequency stimulation at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *J. Neurosci.* 21, 3705–14.

CLARKE, C.E., BOYCE, S., ROBERTSON, R.G., SAMBROOK, M.A., CROSSMAN, A.R. (1989) Drug-induced dyskinesia in primates rendered hemiparkinsonian by intracarotid administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *J Neurol Sci.* 90(3):307-14

CRISWELL, H.E., MUELLER, R.A., BREESE, G.R. (1990). Long-term D1-dopamine receptor sensitization in neonatal 6-OHDA-lesioned rats is blocked by an NMDA antagonist. *Brain Res.*, 512(2), 284-90.

DAY, M., WANG, Z., DING, J., AN, X., INGHAM, C.A., SHERING, A.F., WOKOSIN, D., ILIJIC, E., SUN, Z., SAMPSON, A.R., MUGNAINI, E., DEUTCH, A.Y., SESACK, S.R., ARBUTHNOTT, G.W., SURMEIER, D.J., (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci.* 9, 251–59.

DELONG, M.R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.*, 13, 281-85.

FAHN, S., (2000). The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. *Ann. Neurol.* 47, S2–S9 (discussion S9-11). Review

FAHN, S., (2005). Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? *J. Neurol.* 252 (Suppl 4), IV37–IV42.

FAHN, S., OAKES, D., SHOULSON, I., KIEBURTZ, K., RUDOLPH, A., LANG, A., OLANOW, C.W., TANNER, C., MAREK, K., (2004). Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 2498–2508.

FUJII, S., MATSUMOTO, M., IGARASHI, K., KATO, H., MIKOSHIBA, K., (2000). Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of mice lacking type 1 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. *Learn. Mem.* 7, 312–20.

GARDONI, F., CAPUTI, A., CIMINO, M., PASTORINO, L., CATTABENI, F., DI LUCA, M. (1998) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with NR2A/B subunits of NMDA receptor in postsynaptic densities. *J Neurochem* 71:1733–41.

GARDONI, F., SCHRAMA, L.H., KAMAL, A., GISPEN, W.H., CATTABENI, F., DI LUCA, M. (2001) Hippocampal synaptic plasticity involves competition between Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 21:1501–09.

GARDONI, F., MAUCERI, D., FIORENTINI, C., BELLONE, C., MISSALE, C., CATTABENI, F., DI LUCA, M. (2003a) CaMKII-dependent phosphorylation regulates SAP97/ NR2A interaction. *J Biol Chem* 278:44745–752.

GARDONI, F., PAGLIARDINI, S., SETOLA, V., BASSANINI, S., CATTABENI, F., BATTAGLIA, G., DI LUCA, M. (2003b) The NMDA receptor complex is altered in an animal model of human cerebral heterotopia. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:662– 75.

GARDONI, F., PICCONI, B., GHIGLIERI, V., POLLI, F., BAGETTA, V., BERNARDI, G., CATTABENI, F., DI LUCA, M., CALABRESI, P., (2006). A critical interaction between NR2B and MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. *J. Neurosci.* 26, 2914–22.

GLINKA, Y.Y., YODIM, M.B. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 292(3-4), 329-32.

GOLBE, L.I., (1991). Young-onset Parkinson's disease: a clinical review. *Neurology* 41, 168–173.

GOMEZ-MANCILLA B, BÉDARD PJ. (1993) Effect of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys. *Clin Neuropharmacol.* 16(5):418-27

GRANDAS, F., GALIANO, M.L., TABERNERO, C. (1999) Risk factors for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *J Neurol.* 246(12):1127-33.

GRAYBIEL, A.M., (2004). Network-level neuroplasticity in cortico-basal ganglia pathways. *Parkinsonism Relat. Disord.* 10, 293–96.

GREENAMYRE, J.T., O'BRIEN, C.F. (1991). N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. *Arch. Neurol.*, 48, 977-81.

GREENANYRE, J.T. (2001). Glutamatergic influences on the basal ganglia. [Review]. *Clin. Neuropharmacol.*, 24, 65-70.

GREENANYRE, J.T. (2001). Glutamatergic influences on the basal ganglia. [Review]. *Clin. Neuropharmacol.*, 24, 65-70.

HADJ TAHAR, A., GREGOIRE, L., DARRE, A., BELANGER, N., MELTZER, L., BEDARD, P.J. (2004) Effect of a selective glutamate antagonist on L-dopa-induced dyskinesias in drug-naïve parkinsonian monkeys. *Neurobiol Dis* 15:171–76.

HALLETT, P.J., DUNAH, A.W., RAVENSCROFT, P., ZHOU, S., BEZARD, E., CROSSMAN, A.R., BROTCHE, J.M., STANDAERT, D.G. (2005) Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 48: 503–16.

HALLIDAY, G., BAKER, K., HARPER, C. (1995) Serotonin and alcohol-related brain damage. *Metab Brain Dis* 10(1): 25-30.

HARDINGHAM, G.E., FUKUNAGA, Y., BADING, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405–14.

HENRY, B., CROSSMAN, A.R., BROTCHE, J.M., (1998). Characterization of enhanced behavioral responses to L-DOPA following repeated administration in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 151, 334–42.

HENRY, B., CROSSMAN, A.R., BROTCHE, J.M. (1999). Effect of repeated L-DOPA, bromocriptine, or lisuride administration on preproenkephalin-A and preproenkephalin-B

mRNA levels in the striatum of the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp. Neurol.* 155, 204-20.

HUANG, C.C., LINAG, Y.C., HSU, K.S., (2001). Characterization of the mechanism underlying the reversal of long term potentiation by low frequency stimulation at hippocampal CA1 synapses. *J. Biol. Chem.* 276, 48108–117.

INGHAM, C.A., HOOD, S.H., TAGGART, P., ARBUTHNOTT, G.W. (1998). Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J. Neurosci.*, 18, 4732-43.

INGHAM, C.A., HOOD, S.H., ARBUTHNOTT, G.W. (1989). Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res.*, 503(0), 334-38.

IRAVANI, M.M., COSTA, S., JACKSON, M.J., TEL, B.C., CANNIZZARO, C., PEARCE, R.K., JENNER, P., (2001). GDNF reverses priming for dyskinesia in MPTPtreated, L-DOPA-primed common marmosets. *Eur. J. Neurosci.* 13, 597–608.

KERR, J.N., WICKENS, J.R., (2001). Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. *J. Neurophysiol.* 85, 117–124.

KIM, E., SHENG, M. (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771–81.

KITA, T., KITA, H., KITAU, S.T., (1984). Passive electrical membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res.* 300, 129–39.

JANKOVIC, J., (2002). Levodopa strengths and weaknesses. *Neurology* 58, S19–S32.

JANKOVIC, J., (2005). Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestations. *Mov. Disord.* 20 (Suppl 11), S11–S16.

JIANG, Z.G., NORTH, R.A., (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *J. Physiol.* 443, 533–53.

LANG, A.P., LOZANO, A.E. (1998) Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339:1044–53.

LANGSTON, J.W., QUIK, M., PETZINGER, G., JAKOWEC, M., DI MONTE, D.A. (2000) Investigating levodopa-induced dyskinesias in the parkinsonian primate. *Ann Neurol.* 47 (4 Suppl 1):S79-89. Review

LEE, C.S., CENCI, M.A., SCHULZER, M., BJORKLUND, A. (2000) Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain.* 123 (Pt 7):1365-79.

LIM, I.A., MERRILL, M.A., CHEN, Y., HELL, J.W. (2003) Disruption of the NMDA receptor-PSD-95 interaction in hippocampal neurons with no obvious physiological short-term effect. *Neuropharmacology* 45:738-54.

LINAZASORO, G., (2005). New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 391–97.

LINDGREN, H.S., RYLANDER, D., OHLIN, K.E., LUNDBLAD, M., CENCI, M.A., (2007). The “motor complication syndrome” in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. *Behav. Brain Res.* 177, 150–59.

LOSCHMANN, P.A., DE, GROOTE, C., SMITH, L., WULLNER, U., FISCHER, G., KEMP, J.A., JENNER, P., KLOCKGETHERL, T. (2004). Antiparkinsonian activity of Ro 25-6981, a NR2B subunit specific NMDA receptor antagonist, in animal models of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 187(1), 86-93.

LOVINGER, D.M, TYLER, E.C, MERRITT, A. (1993) Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *J Neurophysiol.* 70(5):1937-49.

LOZANO, A.M., LANG, A.E., HUTCHISON, W.D., DOSTROVSKY, J.O. (1998) New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and in its treatment. *Curr Opin Neurobiol.* 8(6):783-90. Review.

LUNDBLAD, M., ANDERSSON, M., WINKLER, C., KIRIK, D., WIERUP, N. & CENCI, M.A. (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.*, 15, 120-32.

MARATOS, E.C., JACKSON, M.J., PEARCE, R.K., JENNER, P., (2001). Antiparkinsonian activity and dyskinesia risk of ropinirole and L-DOPA combination therapy in drug naive MPTP-lesioned common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Mov. Disord.* 16, 631–41.

MARIN, C., RODRIGUEZ-OROZ, M.C., OBESO, J.A., (2006). Motor complications in Parkinson's disease and the clinical significance of rotational behaviour in the rat: have we wasted our time? *Exp. Neurol.* 197, 269–74.

MARKEY, S.P, JOHANNESSEN, J.N., CHIUEH, C.C, BURNS, R.S., HERKENHAM, M.A. (1984) Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature.* 4-10;311(5985):464-67.

MARRAS, C., LANG, A., KRAHN, M., TOMLISON, G., NAGLIE, G., (2004). Quality of life in early Parkinson's disease: impact of dyskinesias and motor fluctuations. *Mov. Disord.* 19, 22–8.

MCGEORGE, A.J., FAULL, R.L. (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience.* 29(3):503.

MORELLI, M., FENU, S., DI CHIARA, G. (1992) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors potentiates dopaminergic responses in the 6-OHDA model of Parkinson: differential role of D-1 and D-2 receptors. *Neurochem Int.* 20 Suppl:261S-264S.

MORGAN, S.L., COUSSENS, C.M., TEYLER, T.J., (2001). Depotentiation of vdcc LTP requires NMDAR activation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 76, 229–38.

MORGANTE, F., ESPAY, A.J., GUNRAJ, C., LANG, A.E., CHEN, R., (2006). Motor cortex plasticity in Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesias. *Brain* 129, 1059–69.

NASH, J.E., FOX, S.H., HENRY, B., HILL, M.P., PEGGS, D., MCGUIRE, S., MANEUF, Y., HILLLE, C., BROTCHE, J.M., CROSSMAN, A.R. (2000). Antiparkinsonian actions of ifenprodil in the MPTP-lesioned marmoset model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 165, 136-42.

NITSCH, C. & RIESENBERG, R. (1995). Synaptic reorganisation in the rat striatum after dopaminergic deafferentation: an ultrastructural study using glutamate decarboxylase immunocytochemistry. *Synapse*, 19(4), 247-63.

NUTT, J.G., WOODWARD, W.R., CARTER, J.H., GANCHER, S.T. (1992) Effect of long-term therapy on the pharmacodynamics of levodopa. Relation to on-off phenomenon. *Arch Neurol.* 49(11):1123-30.

OBESO, J.A., RODRIGUEZ-OROZ, M.C., CHANA, P., LERA, G., RODRIGUEZ, M., OLANOW, C.W. (2000) The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology*;55(11 Suppl 4):S13-20; discussion S21-3. Review.

OBESO, J.A., RODRIGUEZ-OROZ, M., MARIN, C., ALONSO, F., ZAMARBIDE, I., LANCIEGO, J.L., RODRIGUEZ-DIAZ, M. (2004) The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. *Neurology*. Jan 13;62(1 Suppl 1):S17-30. Review.

OLANOW, C.W., OBESO, J.A., STOCCHI, F., (2006). Continuous dopamine receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications. *Lancet Neurol.* 5, 677-87.

PAILLÈ, V., BRACHET, P., DAMIER, P., (2004). Role of nigral lesion in the genesis of dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 15, 561–64.

PAPA, S.M., BOLDRY, R.C., ENGBER, T.M., KASK, A.M., CHASE, T.N. (1995) Reversal of levodopa-induced motor fluctuations in experimental parkinsonism by NMDA receptor blockade. *Brain Res.* Dec 1;701(1-2):13-8.

PAPA, S.M., CHASE, T.N. (1996) Levodopa-induced dyskinesias improved by a glutamate antagonist in Parkinsonian monkeys. *Ann Neurol.* May;39(5):574-8.

PARTRIDGE, J.G., TANG, K.C., LOVINGER, D.M. (2000). Regional and postnatal heterogeneity of activity-dependent long-term changes in synaptic efficacy in the dorsal striatum. *J. Neurophysiol.*, 84(3), 1422-29.

PEPPE, A., DAMBROSIA, J.M., CHASE, T.N. (1993) Risk factors for motor response complications in L-dopa-treated parkinsonian patients. *Adv Neurol.*;60:698-702.

PERESE, D.A., ULMAN, J., VIOLA, J., EWING, S.E., BANKIWICZ, K.S. (1989). A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res.*, 494(2), 285-93.

PICCONI, B., CENTONZE, D., HAKANSSON, K., BERNARDI, G., GREENGARD, P., FISONE, G., *et al.* (2003). Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Neurosci.*, **6**, 501-506.

PICCONI, B., GARDONI, F., CENTONZE, D., MACERI, D., CENCI, M.A., BERNARDI, G., CALABRESI, P., DI LUCA, M. (2004). Abnormal Ca²⁺-calmodulin-dependent protein

kinase II function mediates synaptic and/or deficits in experimental parkinsonism. *J Neurosci.*, **24**, 5283-91.

PICCONI, B., PISANI, A., CENTONZE, D., BATTAGLIA, G., STORTO, M., NICOLETTI, F., BERNARDI, G., CALABRESI, P., (2002). Striatal metabotropic glutamate receptor function following experimental parkinsonism and chronic levodopa treatment. *Brain* 125, 2635–45.

PICCONI, B., PISANI, A., BARONE, I., BONSI, P., CENTONZE, D., BERNARDI, G., CALABRESI, P., (2005). Pathological synaptic plasticity in the striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 26, 779–83.

PRYBYLOWSKY, K. & WENTHOLD, R.J. (2004). N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9673-76.

SANS N, PRYBYLOSKI, K., PETRALIA, R.S., CHANG, K., WANG, Y.X., RACCA, C., VICINI, S., WENTHOLD, R.J. (2003) NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nat Cell Biol* 5:520-30.

RILEY, D.E., LANG, A.E., (1993). The spectrum of levodopa-related fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology* 43, 1459–64.

RUBERG, M., SCHERMAN, D., JAVOY-AGID, F., AGYD, Y., (1995). Dopamine denervation, age of onset, and Parkinson's disease. *Neurology* 45, 392.

SAUER, H. & OERTEL, W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, 59, 401-15.

SCHRAG, A., QUINN, N. (2000). Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain* 123 (Pt 11), 2297–2305.

SCHWARTING, R.K. & HUSTON, J.P. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioural brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments *Prog. Neurobiol.*, 50, 275-331.

SHENG, M. (2001). Molecular organization of the postsynaptic specialization *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 7058-61.

SMITH, Y., BEVAN, M.D., SHINK, E., BOLAM, J.P. (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86(2):353-87. Review.

STRACK, S., COLBRAN, R.J. (1998) Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 273:20689–692.

TOVAR, K.R., WESTBROOK, G.L. (2002) Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 34:255–64.

TRANZER, J.P., THOENEN, H. (1967) Electronmicroscopic localization of 5-hydroxydopamine (3,4,5-trihydroxy-phenyl-ethylamine), a new 'false' sympathetic transmitter. *Experientia*. 23(9):743-5.

VERAGHEN METMAN, L., DEL DOTTO, P., NATTÈ, R., VAN DEN MUNCKHOF, P., CHASE, T.N. (1998) Dextromethorphan improves levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Neurology*. 51(1):203-6.

VERAGHEN METMAN, L., BLANCHET, P.J., VAN DEN MUNCKHOF, P., DEL DOTTO, P., NATTÈ, R., CHASE, T.N. (1998) A trial of dextromethorphan in parkinsonian patients with motor response complications. *Mov Disord*. 13(3):414-7.

VIDAILET, M., BONNET, A.M., MARCONI, R., DURIF, F., AGID, Y., (1999). The phenomenology of L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov. Disord*. 14 (Suppl 1), 13–18.

ZHANG, C., STEINER, J.P., HAMILTON, G.S., HICKS, T.P., POULTER, M.O., (2001). Regeneration of dopaminergic function in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by neuroimmunophilin ligand treatment. *J. Neurosci*. 21, RC156.

ZIGMOND, M.J. (1997) Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism. *Neurobiol Dis.*;4(3-4):247-53. Review.

WESSELL, R.H., AHMED, S.M., MENNITI, F.S., DUNBAR, G.L., CHASE, T.N., OH, J.D. (2004). NR2B selective NMDA receptor antagonist CP-101,606 prevents levodopa-induced motor response alterations in hemi-parkinsonian rats. *Neuropharmacol.*, 47, 184-94.

WOLTERS, E.C., FRANCO, C., BERGMANS, P., Winogrodzka, A., BOOIJ, J., BERENDSE, H.W., STOOF, J.C., (2000). Preclinical (premotor) Parkinson's disease. *J. Neurol.* 247 (Suppl 2), II103–II109.

Risultati 1

Figura 1

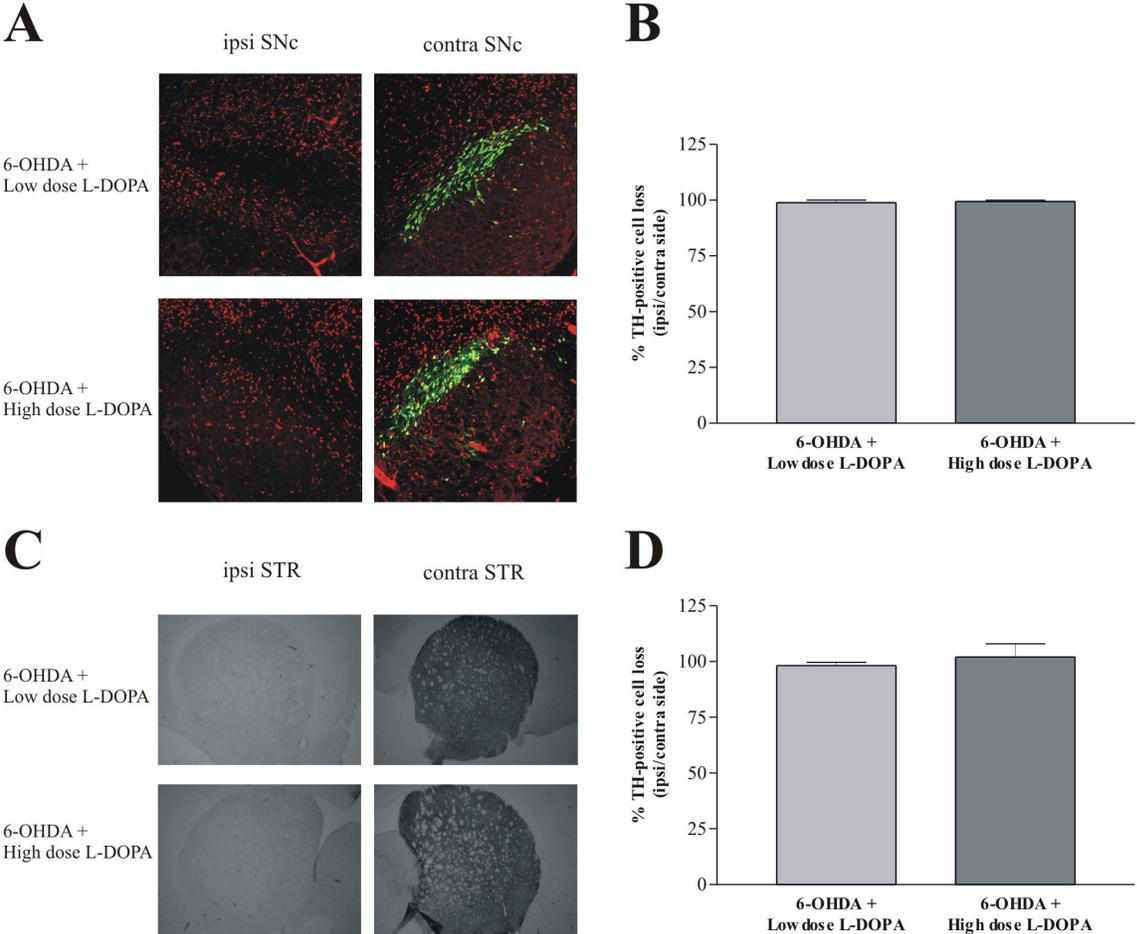


Figura 2

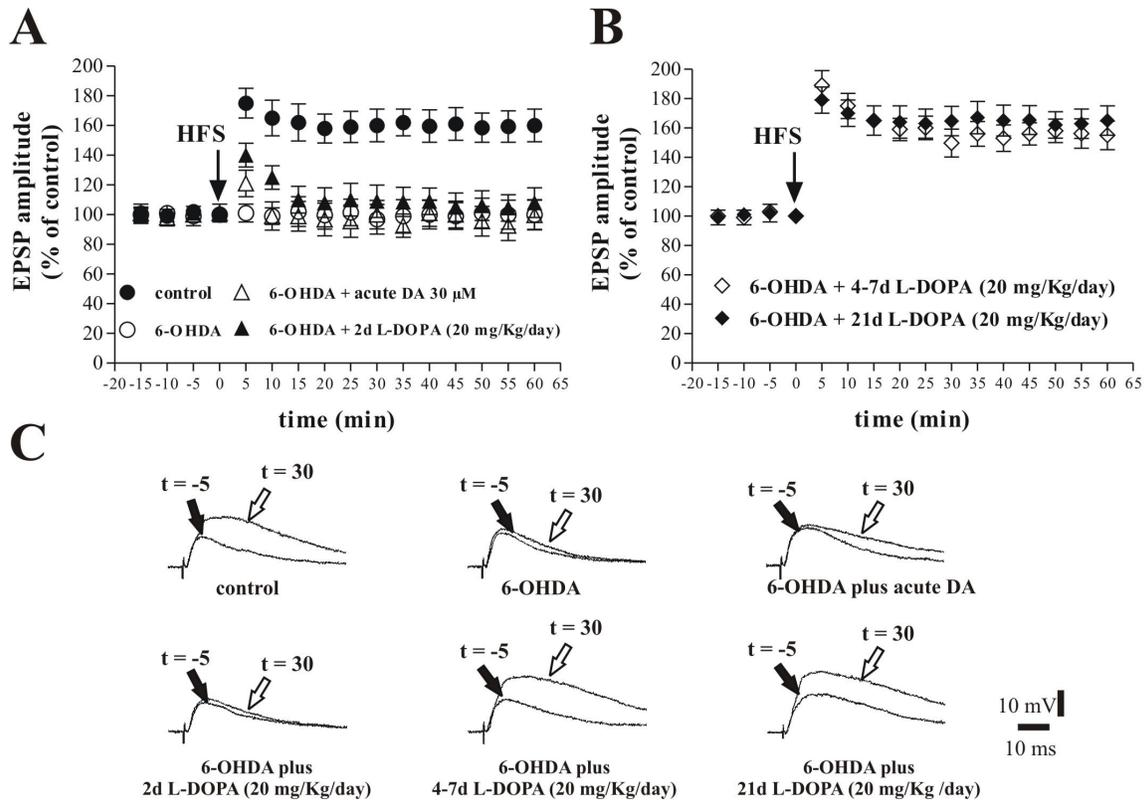


Figure 3

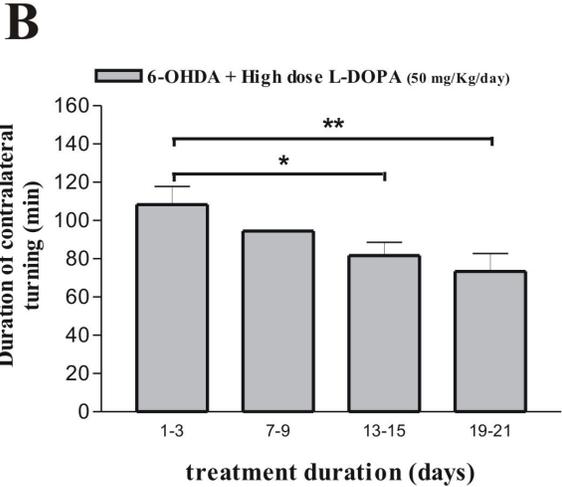
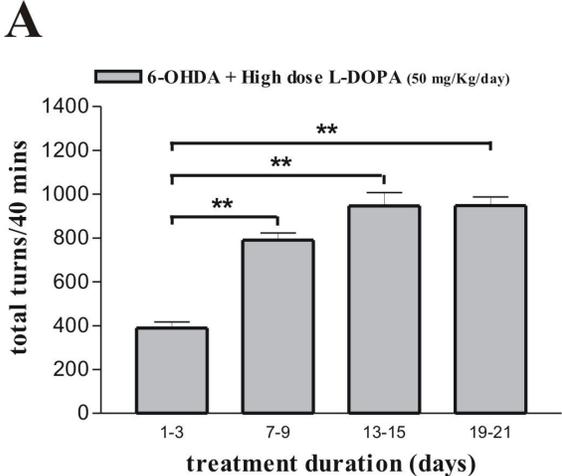


Figure 4

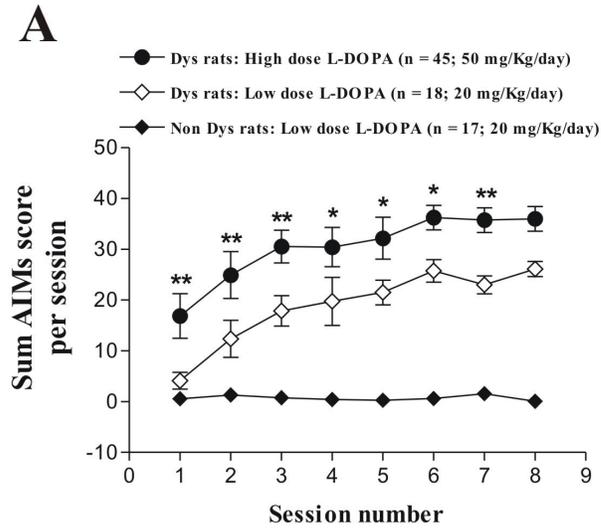


Figure 5

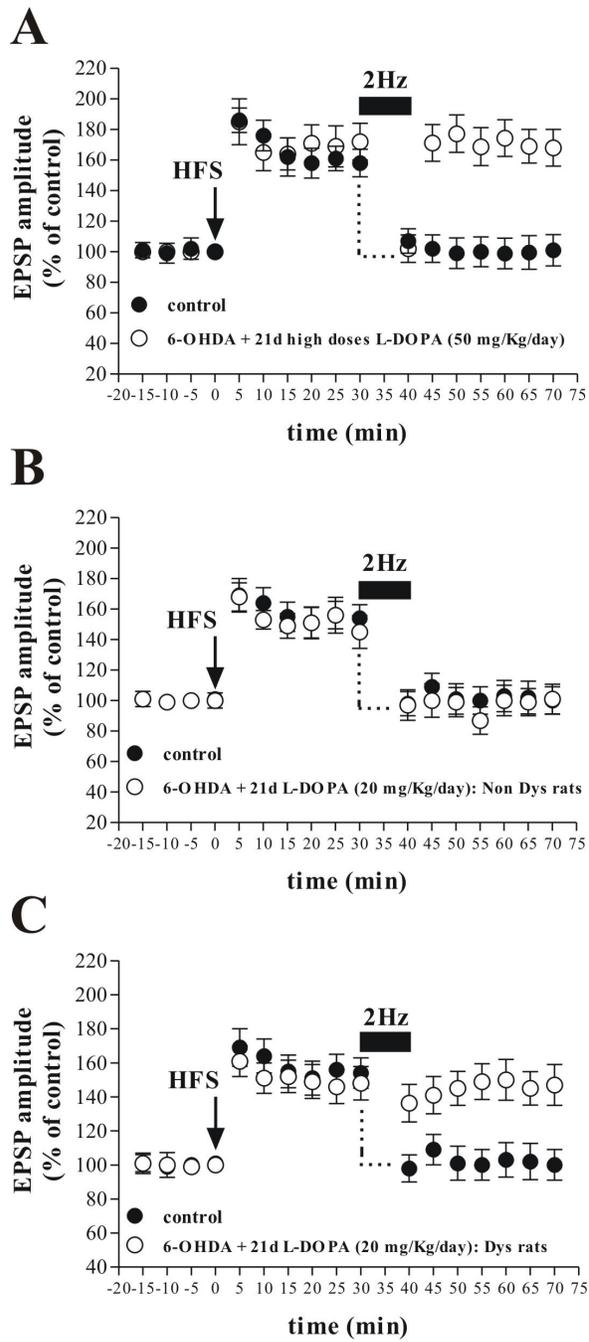
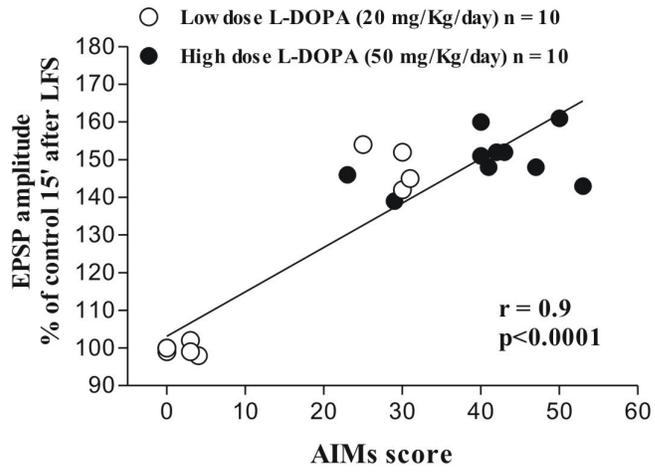


Figure 6

A



Risultati 2

Figure 1

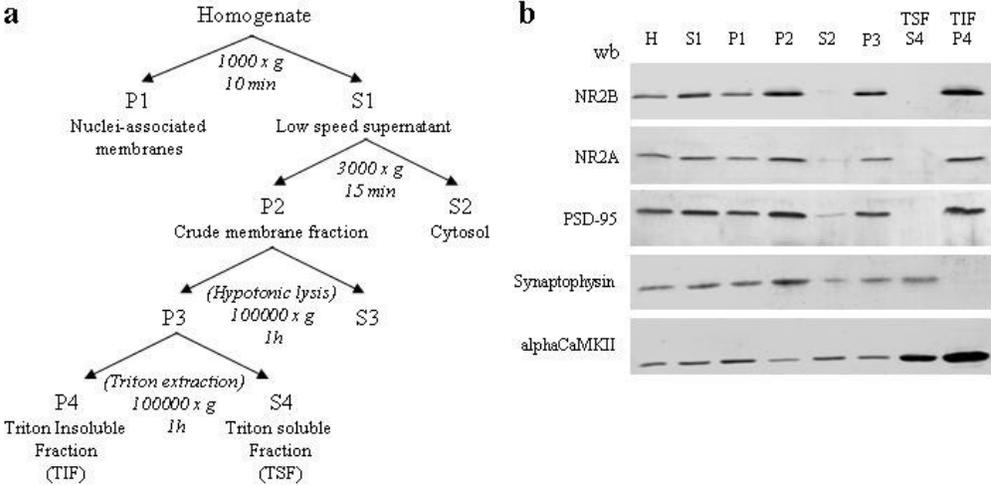


Figure 2

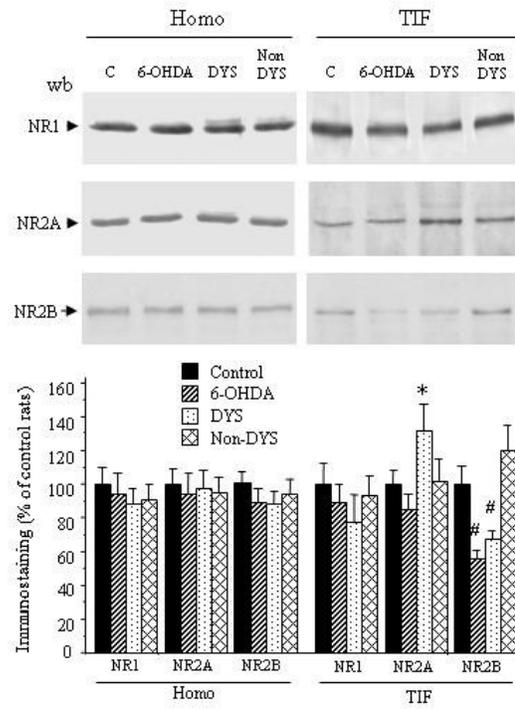


Figure 3

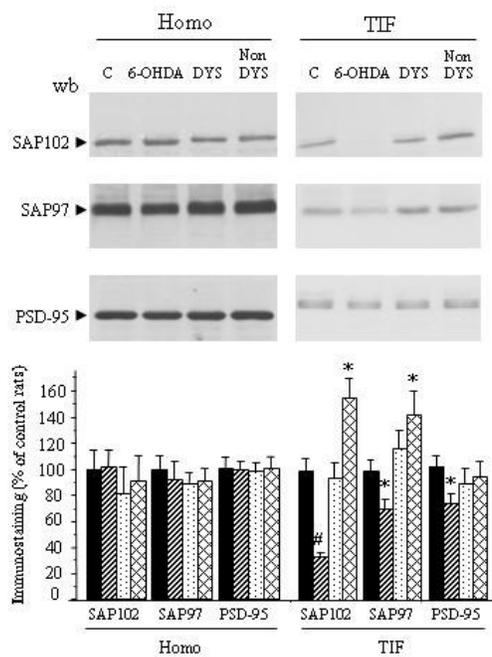


Figure 4

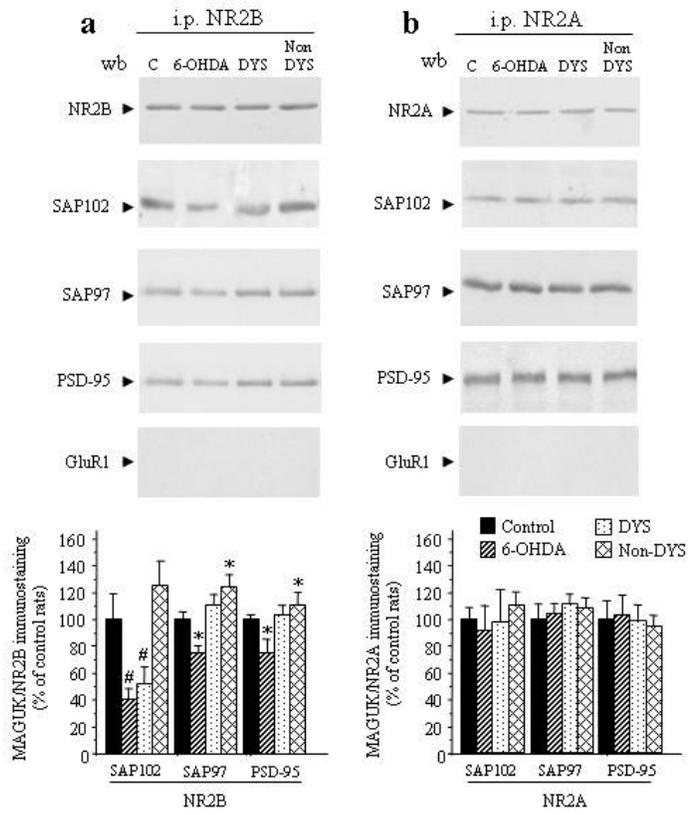


Figure 5

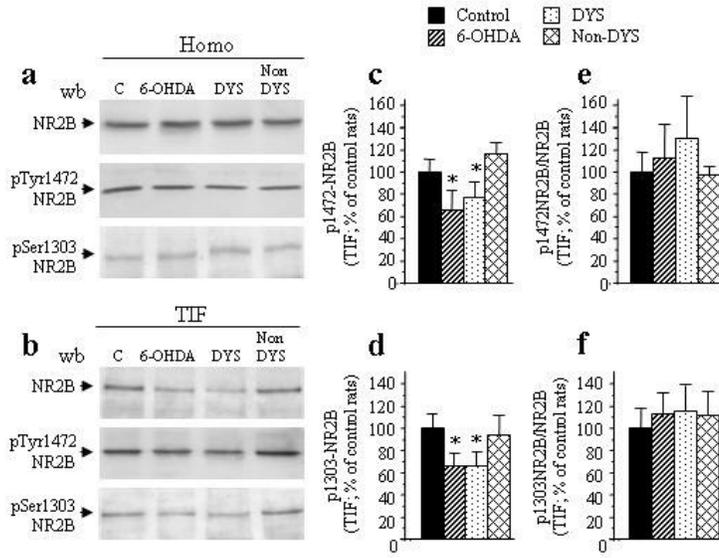


Figure 6

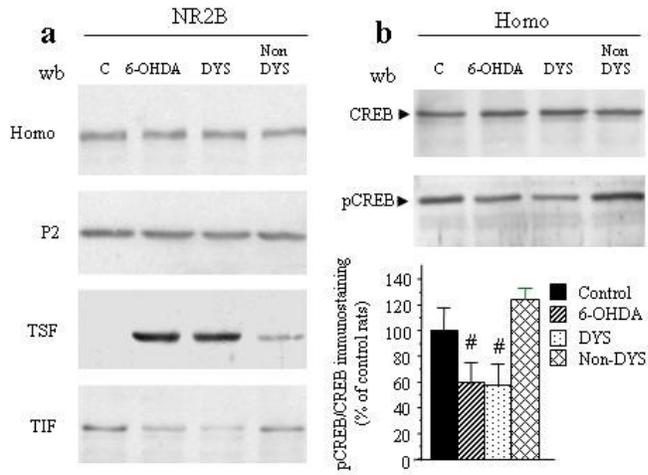


Figure 7

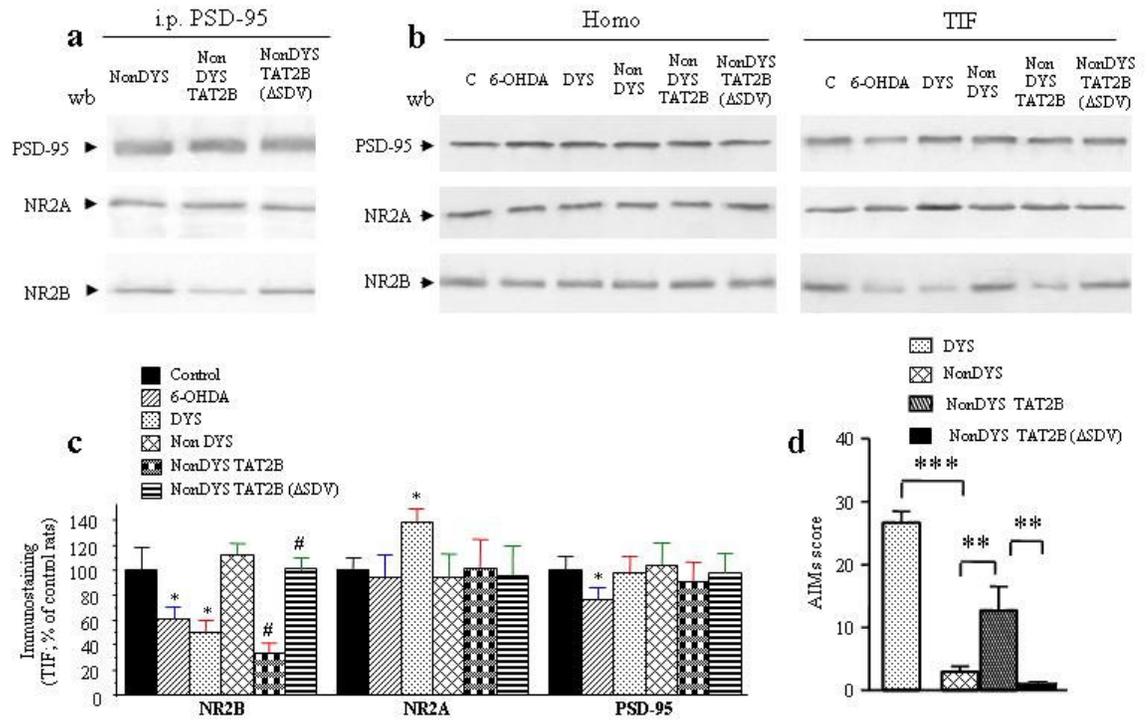
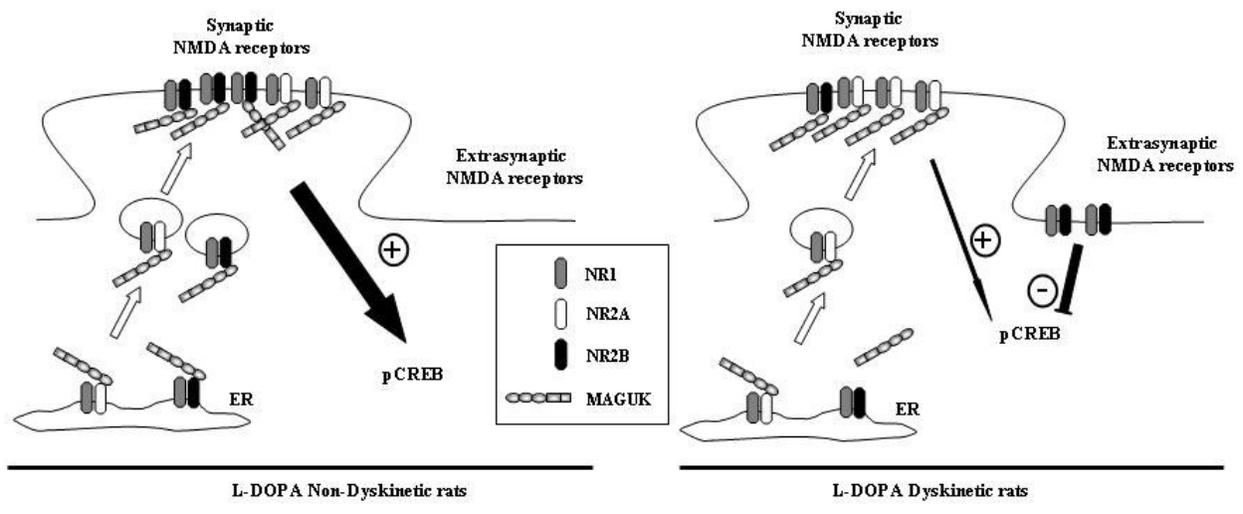


Figure 8



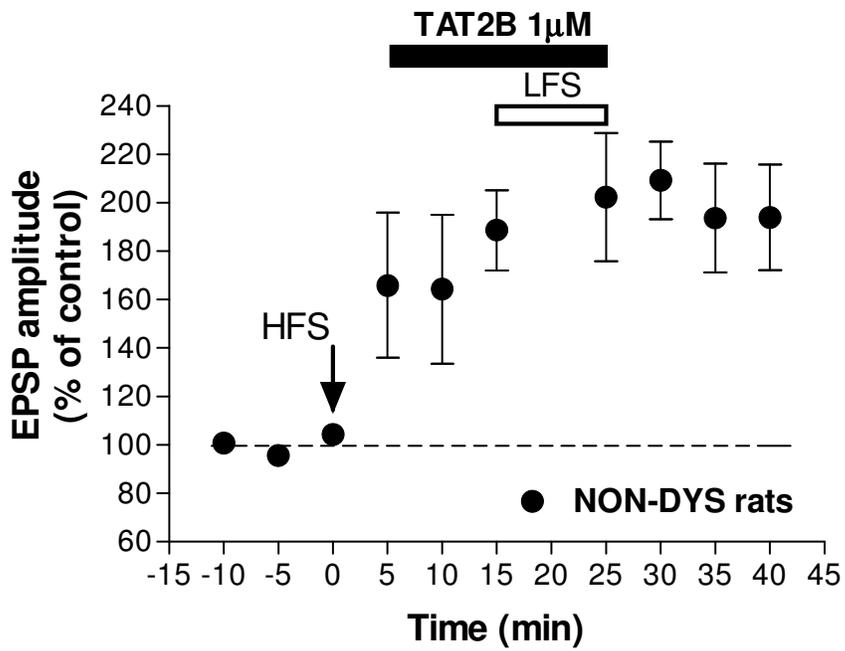
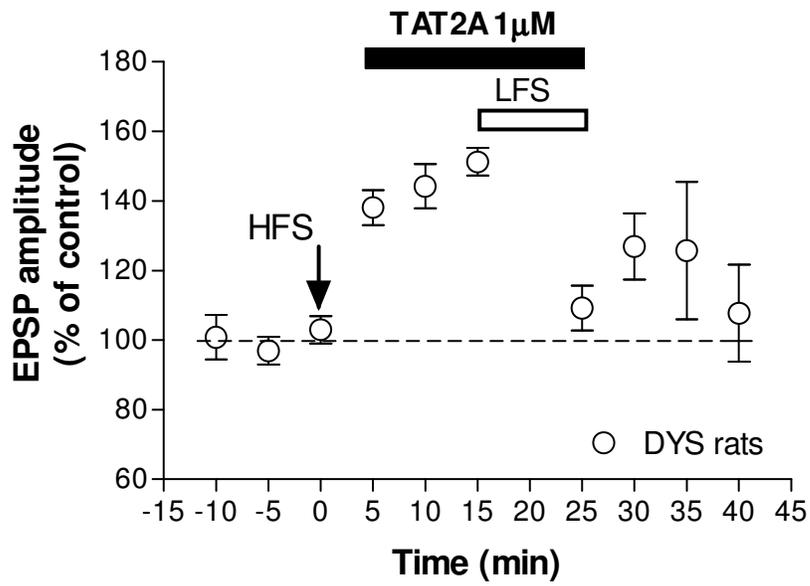


Figura 9

Figura 10

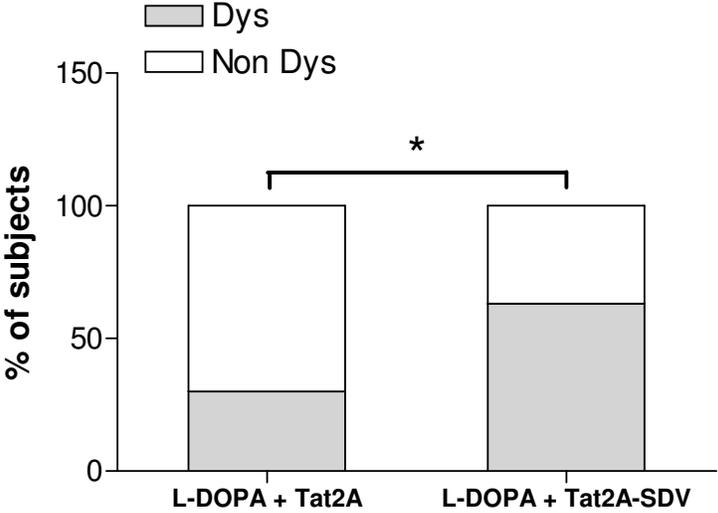


Figura 11

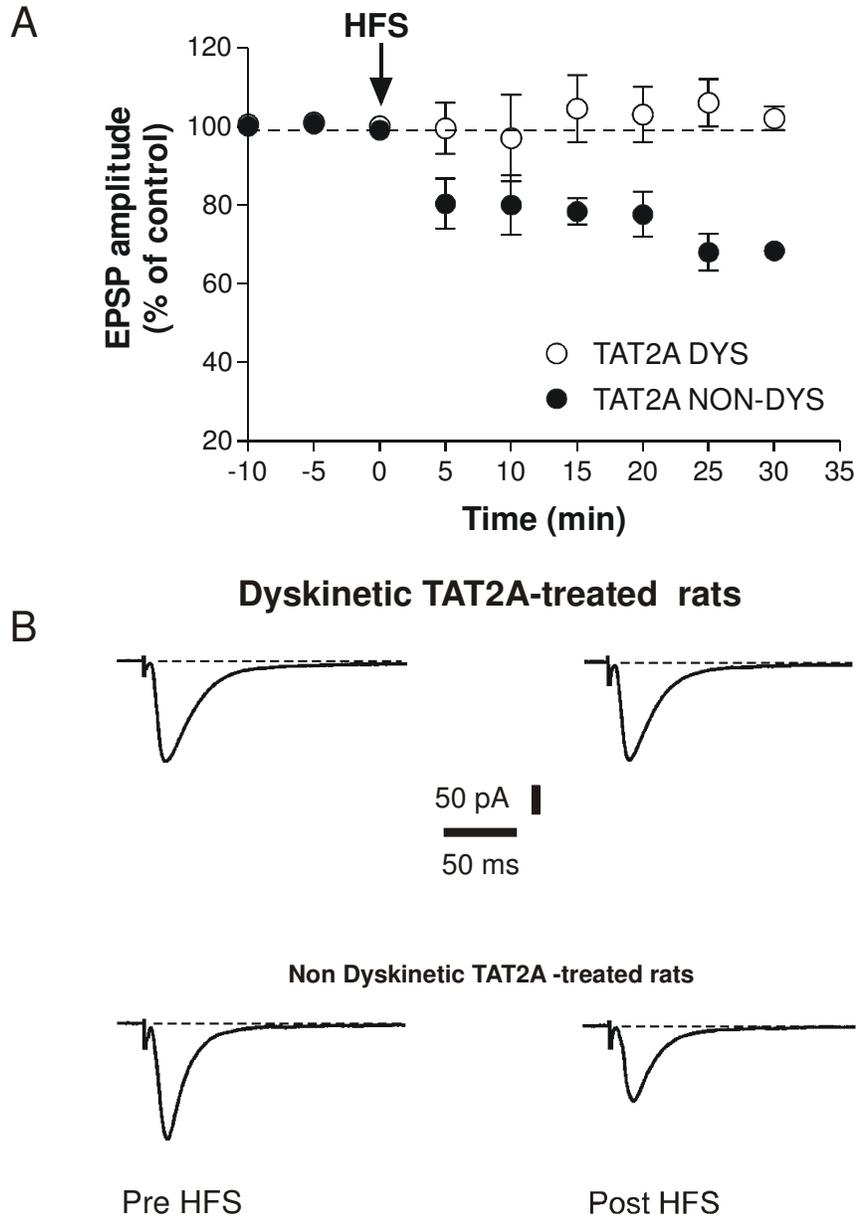
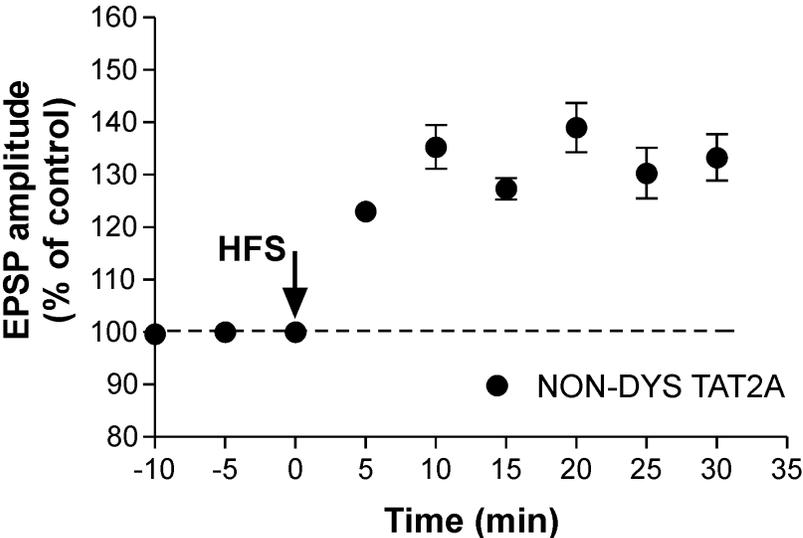


Figura 12

A



B

Non Dyskinetic TAT2A-treated rats

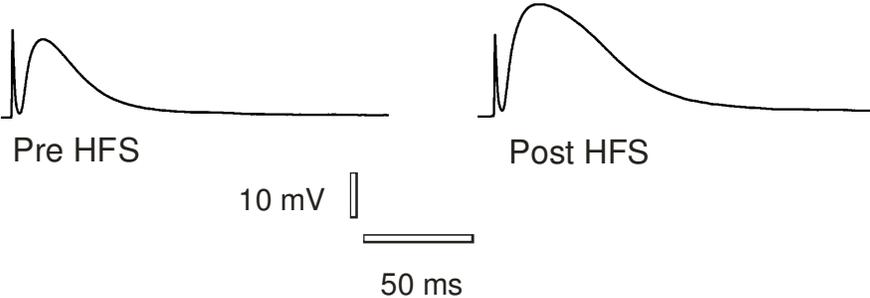
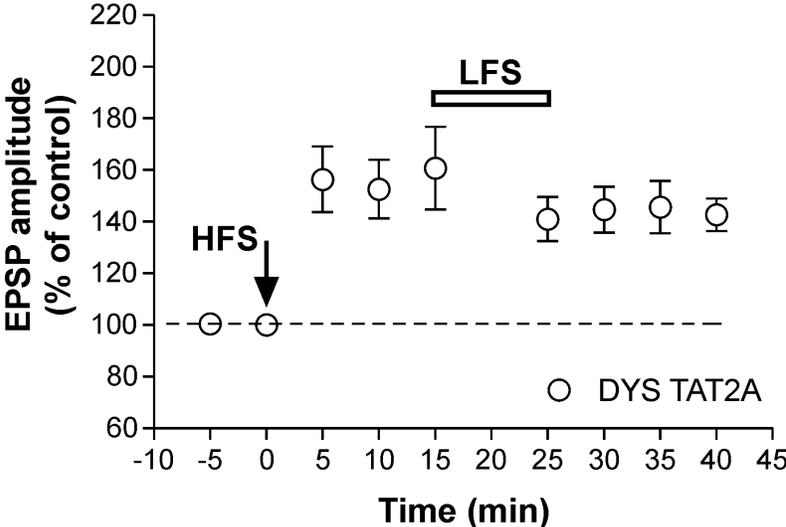


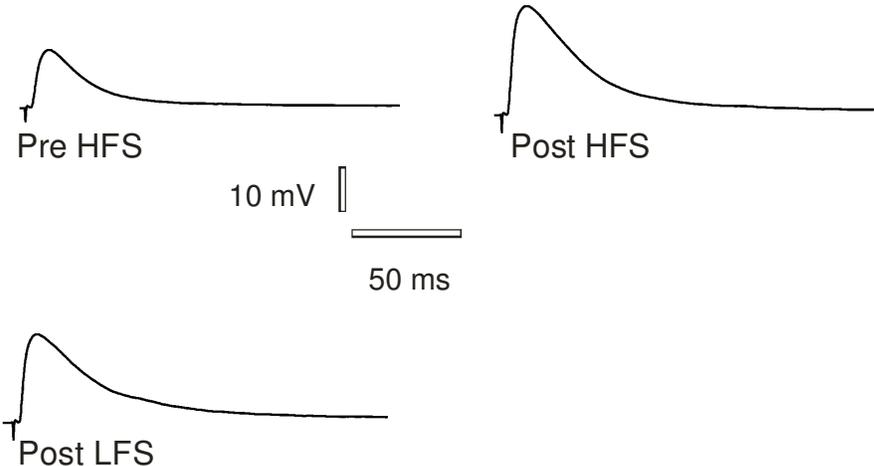
Figura 13

A



B

Dyskinetic TAT2A-treated rats



Verbale n° 32

In data 21 Ottobre, 2008, alle ore 9.00, nei locali della Facoltà di Farmacia dell'Università di Catanzaro "Magna Graecia", si è riunito il Collegio dei Docenti del Dottorato di Ricerca in "Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare" per discutere e deliberare sul seguente ordine del giorno:

- 1) Approvazione relazione attività anno 2008 e passaggio anni successivi Dottorandi di ricerca afferenti al XXI, XXII e XXIII ciclo (art. 46, comma I Regolamento Dottorato);
- 2) Valutazione e giudizio finale Dottorandi XIX e XX ciclo;
- 3) Proposta Commissione esame finale XIX e XX ciclo;
- 4) Varie ed eventuali.

Sono presenti il Coordinatore, Prof. G. Bagetta, i Proff. M.T. Corasaniti, P.L. Nicotera, D. Rotiroti, e per consultazione telematica, ai sensi del Regolamento didattico, i Proff. D. Borgese, G. Genchi, N. Mercuri, L.A. Morrone e R.G. Nisticò, i Dott.ri D. Amantea, L. Berliocchi, M.C. Caroleo, R. Curcio, G. Lauria, C. Nucci, L. Rombolà, R. Russo.

Risulta assente giustificata la Dott.ssa E. Cione.

Sono assenti i Proff. E. Clementi, G. Melino, V. Mollace.



Svolge le funzioni di Presidente il Prof. G. Bagetta e di Segretario il Prof. D. Rotiroti.

OMISSIS

2) Valutazione e giudizio finale dottorandi XX ciclo

Valutazione finale della candidata **Dott.ssa Vincenza Bagetta**

Tesi: Studio elettrofisiologico, biologico-molecolare e comportamentale dei meccanismi alla base delle discinesie indotte dalla L-DOPA in modelli murini di Malattia di Parkinson

Il Collegio dei Docenti ha esaminato il percorso formativo e di ricerca condotto dalla candidata, che risulta essere stato indirizzato verso tematiche di grande attualità della ricerca di base nel campo della neurofisiologia e neurofarmacologia. L'attività formativa della Candidata è stata inizialmente orientata alla comprensione delle basi neuroanatomiche, neurofisiologiche, delle proprietà plastiche e dei correlati comportamentali normali e patologici dei circuiti neuronali nigrico-striatale e cortico-striatale del cervello dei mammiferi. Tale attività è stata, successivamente, estesa all'apprendimento delle tecniche di registrazione delle proprietà biofisiche di membrana, dei potenziali sinaptici e dei correlati elettrofisiologici della plasticità sinaptica da popolazioni o da singoli neuroni striatali presenti in fettine di tessuto cerebrale mantenuto in vitro. La Dottoranda ha anche svolto uno stage della durata di un anno presso la Faculty of Life Sciences della University of Manchester (UK) dove sotto la guida del Dott. Enrico Bracci ha esteso le sue competenze neurofisiologiche.



2



L'attività di ricerca della Dottoranda è stata rivolta allo studio dei meccanismi sinaptici alla base della dipendenza dei movimenti discinetici dal dosaggio di L-DOPA, ancora oggi principale approccio farmacologico alla terapia di Parkinson. A tal fine, sono state studiate le alterazioni elettrofisiologiche, comportamentali, cellulari e molecolari che intervengono in un modello sperimentale di discinesie da L-DOPA nel parkinsonismo indotto da 6-OHDA nel ratto. Ciò ha consentito la decifrazione delle modificazioni quali-quantitative e della distribuzione delle singole subunità del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA) per il glutammato nonché le interazioni di tale complesso recettoriale con le proteine MAGUK unitamente ai correlati elettrofisiologici nel depotenziamento sinaptico in ratti parkinsoniani trattati con L-DOPA, discinetici e non-discinetici.

Il Collegio dei Docenti valuta, nel complesso, estremamente positivo il lavoro svolto dalla candidata che, durante i quattro anni di corso, ha partecipato attivamente alle iniziative didattiche organizzate sotto forma di workshops e seminari. Pertanto, il Collegio dei Docenti ritiene la candidata idonea a sostenere l'esame finale di Dottorato.

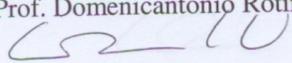
OMISSIS

Alle ore 19.00 la seduta è tolta.

Letto, approvato e sottoscritto

Il Segretario

Prof. Domenicantonio Rotiroti



Il Presidente

Prof. Giacinto Bagetta

