



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

XXI CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO A.A. 2008/2009

**Meccanismi di vulnerabilità dei neuroni
dopaminergici mesencefalici di ratto esposti a fattori
neurotossici ambientali**

Maria Letizia Cucchiaroni

Docente Guida: Prof. Nicola Biagio Mercuri

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

INTRODUZIONE	3
IL MOVIMENTO VOLONTARIO: I GANGLI DELLA BASE	3
<i>La sostanza nera pars compacta</i>	7
Le cellule dopaminergiche.....	9
Gli interneuroni GABAergici.....	10
IL MORBO DI PARKINSON	11
<i>Le cause della malattia di Parkinson</i>	13
I FATTORI AMBIENTALI NEL PD	14
<i>Disregolatori ormonali</i>	15
<i>Metalli pesanti</i>	16
<i>I Pesticidi</i>	16
<i>I lipopolisaccaridi</i>	19
<i>La BMAA</i>	20
L' APOPTOSI.....	23
<i>Il buffering del calcio</i>	26
<i>La complessa interazione tra ER e mitocondrio nella morte cellulare</i>	28
I RECETTORI METABOTROPICI DEL GLUTAMMATO	30
<i>Eccitotossicità indotta dal glutammato nel PD</i>	32
MATERIALI E METODI	34
PREPARAZIONE DI FETTINE DI MESENCEFALO DI RATTO	34
REGISTRAZIONI DI PATCH CLAMP	35
MICROFLUORIMETRIA	38
IMMUNOISTOCHEMICA E MICROSCOPIA CONFOCALE	39
FARMACI.....	40
ANALISI DEI DATI.....	40
SCOPO DELLA RICERCA	41
RISULTATI	42
AZIONE DELLA BMAA SULLE PROPRIETÀ DI MEMBRANA DEI NEURONI DOPAMINERGICI DELLA SNC	42
LA BMAA ATTIVA I RECETTORI DEL GLUTAMMATO	48
DINAMICHE DEL CALCIO CITOSOLICO IN RISPOSTA ALL' APPLICAZIONE DELL' BMMA	51
EFFETTO DELLA BMAA SUGLI INTERNEURONI GABAERGICI DELLA SNC	53
ESPOSIZIONE PROLUNGATA ALLA BMAA INDUCE CAMBIAMENTI IRREVERSIBILI SULLE PROPRIETÀ CELLULARI E DI MEMBRANA.....	55
DISCUSSIONE	61
CONCLUSIONI.....	65
BIBLIOGRAFIA	66

INTRODUZIONE

Il movimento volontario: i gangli della base

La giusta esecuzione dei movimenti volontari risulta dalla corretta integrazione di informazioni sensomotorie nel cervello. Questa integrazione viene conseguita distribuendo i meccanismi sensoriali di controllo a feed-back o anticipatori tra tre livelli di controllo motorio: il midollo spinale, i sistemi discendenti del tronco encefalico e le aree motorie della corteccia cerebrale. Questi tre livelli di controllo dei sistemi motori sono organizzati sia in maniera gerarchica che in parallelo.

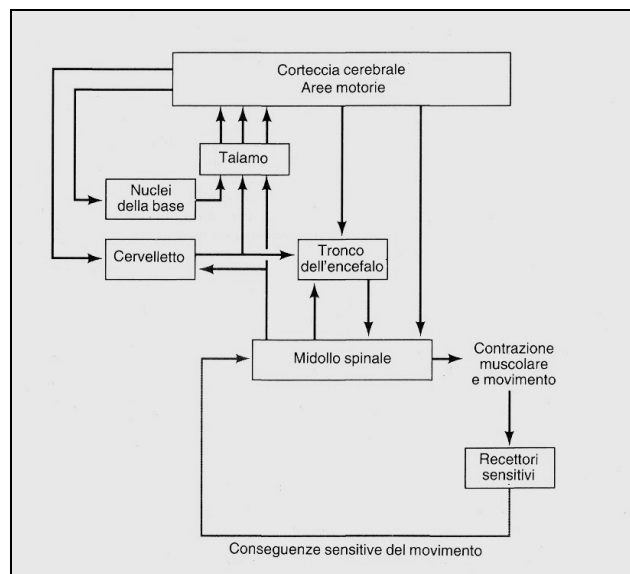


FIG 1: Rappresentazione schematica dei livelli di controllo del movimento volontario (Kandel *et al*, 1994).

Le aree motorie della corteccia cerebrale (corteccia motrice primaria, corteccia premotoria e area motrice supplementare) possono influenzare il midollo spinale sia direttamente attraverso la via cortico-spinale che indirettamente attraverso vie che prendono origine dal tronco dell'encefalo.

Tutti e tre i livelli dei sistemi motori ricevono segnali afferenti sensoriali e vengono influenzati da due sistemi sottocorticali indipendenti: i gangli della base e il cervelletto. Sia i gangli della base che il cervelletto agiscono sulla corteccia cerebrale per il tramite di nuclei talamici di ritrasmissione.

Il cervelletto contribuisce a far aumentare il grado di precisione del movimento confrontando i comandi motori discendenti con informazioni relative all'azione motoria realmente eseguita. Esso svolge la sua azione agendo sul tronco dell'encefalo e sulle aree corticali motorie che proiettano direttamente al midollo spinale, controllando sia la loro attività che i segnali sensoriali a feed-back che ricevono dalla periferia.

I gangli della base sono un gruppo di nuclei sottocorticali che mediano il movimento e alcune funzioni cognitive e mnemoniche. Questi ricevono afferenze da tutte le aree corticali, integrano le informazioni sensomotorie, associative e limbiche e proiettano poi principalmente ad aree della corteccia frontale implicate nella pianificazione del movimento (Bolam *et al*, 2000).

I gangli della base comprendono lo striato (costituito dal nucleo caudato e il putamen), il globus pallidus (esterno ed interno) e nuclei mesencefalici: la sostanza nera *pars reticulata* (SNr) e *pars compacta* (SNc) e il nucleo subtalamico (STN), (FIG 2).

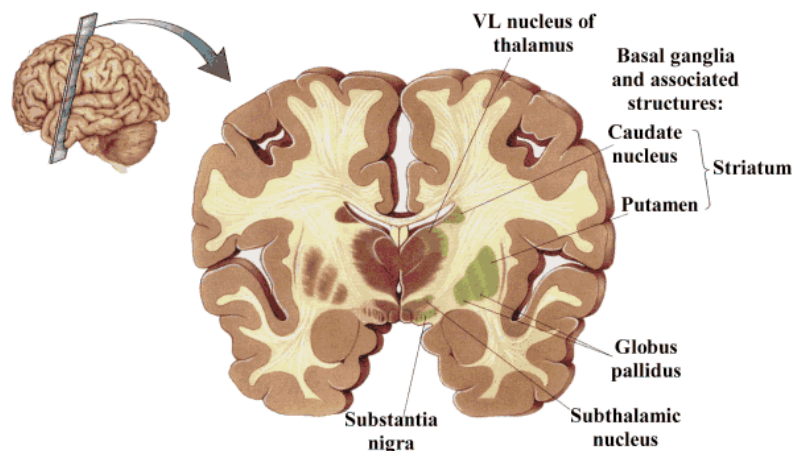


FIG 2: Gangli della base (sezione cerebrale frontale)

Negli anni 70 si pensava che i nuclei della base integrassero le proiezioni provenienti dalle diverse porzioni della corteccia e proiettassero poi queste informazioni, attraverso il talamo, alla corteccia motoria e all'area motoria supplementare. Studi neurofisiologici più recenti hanno suggerito un'organizzazione più segregata dei circuiti neuronali. Secondo questo modello le proiezioni corticali terminano su specifiche aree sottocorticali che a loro volta proiettano alle stesse aree corticali da cui è partito l'impulso iniziale (Alexander *et al*, 1986; Kelly and Strick, 2004).

Lo striato e il nucleo subtalamico (STN) ricevono inputs dalla corteccia cerebrale mentre il segmento interno del globus pallidus (GPi) e la sostanza nera pars reticulata (SNr) rappresentano i nuclei di proiezione ("nuclei outputs") dei gangli della base che proiettano al talamo e al tronco encefalico (FIG 3).

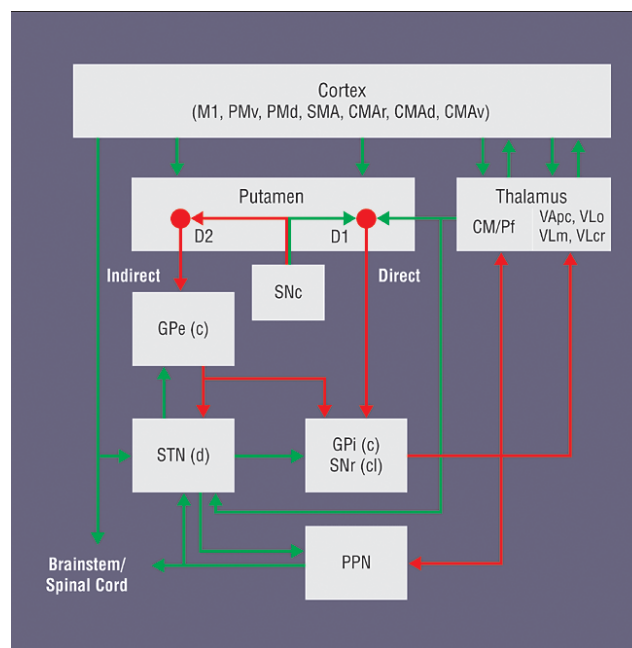


FIG 3: Rappresentazione schematica dell'organizzazione funzionale dei circuiti dei gangli basali in accordo con il classico modello della via diretta ed indiretta. Le frecce rosse indicano le connessioni inibitorie (GABAergiche); quelle verdi le connessioni eccitatorie (glutamatergiche) (DeLong *et al*, 2007).

Le connessioni tra lo striato e questi nuclei di proiezione sono organizzati in due vie: la via diretta monosinaptica ed inibitoria (striato-GPi / striato-SNr) e quella indiretta polisinaptica (striato-GPe) eccitatoria che include il globus pallidus esterno (GPe) e

il STN (Alexander and Crutcher, 1990; Graybiel, 1990, Albin *et al*, 1995). Un input addizionale alla via diretta striatale viene dai nuclei intralaminari striatali. Il GPi e la SNr inibiscono i neuroni ventrali del talamo.

L'effetto netto (eccitatorio o inibitorio) sui nuclei di proiezione deriva dal bilancio tra la via diretta e quella indiretta ed è regolato dall'azione della dopamina rilasciata dai terminali dei neuroni della SNc sui neuroni striatali. Il rilascio di dopamina nello striato aumenta l'attività della via diretta attraverso l'attivazione dei recettori D1 sui neuroni spinosi striatali mentre, per interazione con i recettori D2 di altri neuroni spinosi, diminuisce quella della via indiretta, con effetto netto inibitorio sul SNr e GPi. I neuroni della via diretta rilasciano nei nuclei output (GPi e SNr) GABA, sostanza P e dinorfina mentre quelli della via indiretta rilasciano GABA e encefalina nel GPe.

Tuttavia recentemente il modello classico del circuito corteccia-nuclei della base-corteccia è stato rivisto e integrato con nuovi dati ottenuti dagli ultimi studi.

Questi suggeriscono l'esistenza di evidenti connessioni sinaptiche tra i neuroni striatali responsabili della via diretta ed indiretta e pertanto le due popolazioni non sarebbero completamente segregate (Yung *et al*, 1996). Infatti, la somministrazione intrastriatale di agonisti D1 e D2 produce cambiamenti metabolici simili nei due principali nuclei di proiezione (SNr, GPi) (Blandini and Orzi, 2000). Inoltre alcuni studi hanno dimostrato una connessione diretta tra il GPe e i nuclei outputs GPi-SNr (Parent and Hazrati, 1995; Smith *et al*, 1998) e tra la SNc e il STN (Cossette *et al*, 1999; Hassani *et al*, 1997; Smith *et al*, 1996).

E' stata anche postulata l'esistenza di un'altra via di proiezione. Questa è rappresentata da neuroni del nucleo segmentale peduncolopontino che ricevono afferenze dal GPi e dal STN e proiettano non solo al tronco encefalico e al midollo spinale ma anche alla SNc (Winn, 2006; Mena-Sergovia *et al*, 2004; Lee *et al*, 2000).

La sostanza nera pars compacta

Situata nel mesencefalo ventrale, la sostanza nera *pars compacta* (SNc), insieme all'area tegmentale ventrale (VTA), costituisce le sedi di maggiore presenza di neuroni dopaminergici dell'encefalo. La dopamina fu riconosciuta come neurotrasmettitore negli anni '50 (Carlsson *et al*, 1958). La descrizione delle popolazioni neuronali contenenti dopamina fu in seguito possibile grazie all'uso della formaldeide fluorescente di Falck (Bjorklund *et al*, 1968) con la quale i neuroni monoaminergici del cervello potevano essere visualizzati. Questi neuroni sono organizzati in due principali sistemi che prendono il nome dalle loro rispettive aree di proiezione (Lindvall *et al*, 1984). Il sistema nigrostriatale, che origina nella SNc, e proietta allo striato dorsale (nucleo caudato e putamen) e il sistema mesolimbocorticale che parte dalla VTA e proietta alle aree limbiche dello striato ventrale (nucleus accumbens), all'amigdala e al tubercolo olfattorio, come anche alle corteccia mediale prefrontale, cingolata ed entorinale (Andén *et al*, 1996) (FIG 4).

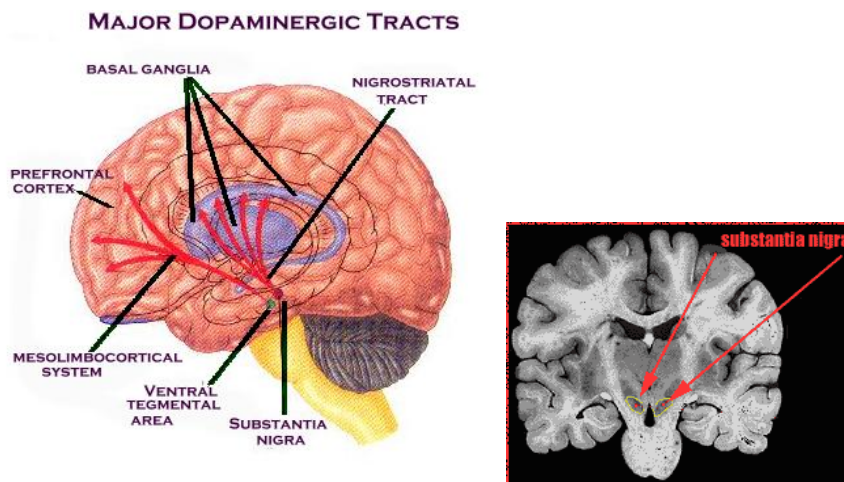


FIG 4: Localizzazione della sostanza nera e dell'area tegmentale ventrale nel mesencefalo e principali vie dopaminergiche. A sinistra SN in sezione sagittale; a destra SN in sezione frontale.

I neuroni della SNc ricevono afferenze glutamatergiche che derivano essenzialmente dalla corteccia prefrontale, dal nucleo subtalamico (STN), dal nucleo tegmentale latero-dorsale (LDTg) e dal nucleo tegmentale peduncolo-pontino (PPN).

Il rilascio di glutammato può regolare l'attività dei neuroni dopaminergici attraverso l'attivazione di recettori ionotropici di tipo NMDA o AMPA/Kainato oppure attraverso recettori metabotropici distinti in gruppo I, II e III, come descritto in seguito (Grenhoff *et al*, 1988; Mercuri *et al*, 1993). Recentemente è stata descritta una popolazione neuronale glutammatergica all'interno della VTA (Yamaguchi *et al*, 2007) che fornisce input glutammatergici locali ai neuroni DAergici. Inoltre alcuni autori hanno proposto che i neuroni DAergici della VTA e della SN possano corilasciare glutammato, poiché esprimono il trasportatore vescicolare del glutammato VGluT2 (Sulzer and Rayport, 2000; Mendez *et al*, 2008).

Afferenze GABAergiche derivano, invece, principalmente dallo striato e dal globo pallido (Bolam and Smith, 1990) oltre che dagli interneuroni GABAergici della stessa SNc e SNr (Stanford and Lacey, 1996). Il rilascio di GABA attiva recettori ionotropici (GABA_A), permeabili allo ione cloro, e recettori metabotropici (GABA_B) che modulano una classe di canali del potassio accoppiati alla proteina Gi/0 (GIRK). Afferenze colinergiche (i neuroni dopaminergici possiedono recettori sia nicotinici che muscarinici) derivano dal PPN, dal quale originano anche fibre glutammatergiche dirette alla SN (Beninato and Spencer, 1987; Bolam *et al*, 2000).

Le afferenze serotoninergiche alla SNc derivano dal nucleo dorsale del rafe che proietta anche alla corteccia frontale (Van Bockstaele *et al*, 1993) e allo striato, mentre quelle noradrenergiche provengono dal locus coeruleus (Grenhoff *et al*, 1995).

Nella sostanza nera *pars compacta* possono essere distinte due popolazioni neuronali caratterizzate da peculiari proprietà elettrofisiologiche (Lacey *et al*, 1989): i neuroni dopaminergici e gli interneuroni GABAergici.

Le cellule dopaminergiche

I neuroni dopaminergici della SNc sono stati caratterizzati attraverso tecniche elettrofisiologiche sia *in vivo* che *in vitro*. I neuroni dopaminergici descritti *in vivo*, in ratti anestetizzati, mediante registrazioni intra- ed extracellulari, mostrano una modalità di scarica di potenziali d'azione irregolare e solitamente consistente in "bursts" (Bunney e Aghajanian, 1976). Durante registrazioni *in vitro*, invece, i neuroni dopaminergici sono caratterizzati da una attività di scarica spontanea lenta e altamente regolare di 0.5-4 Hz (FIG 5C). Hanno potenziali d'azione di lunga durata (>2ms) che sembrano bifasici in registrazioni extracellulari e sono seguiti da una pronunciata iperpolarizzazione ("afterhyperpolarisation", AHP), se registrati in "patch-clamp" o tramite registrazioni intracellulari. Inoltre sono caratterizzati dalla presenza di una corrente entrante, voltaggio e tempo-dipendente (I_h) (FIG 5A), che genera una tipica depolarizzazione ("sag potential") quando, in "current-clamp", il neurone viene iperpolarizzato da una corrente negativa (FIG 5B) (Mercuri *et al*, 1995). Inoltre, questi neuroni rispondono all'applicazione di dopamina esogena generando una corrente uscente, dovuta all'attivazione dei recettori D2 accoppiati a specifici canali del potassio (GIRK) (Lacey *et al*, 1987) (FIG 5D).

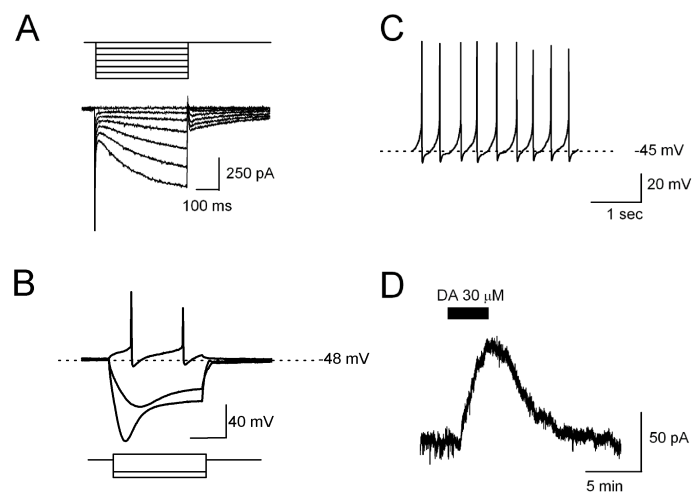


FIG 5: Caratteristiche elettrofisiologiche di un neurone dopaminergico della SNc registrato mediante la tecnica del patch-clamp.

Gli interneuroni GABAergici

A differenza dei neuroni dopaminergici, i neuroni GABAergici presentano un modesta corrente I_h e “sag potential” in risposta ad impulsi iperpolarizzanti (FIG 6A e B, rispettivamente) e una frequenza di scarica di potenziali d’azione più elevata che raggiunge i 25 Hz (FIG 6C) (Lacey *et al*, 1989; Gernet *et al*, 2004). Inoltre questi neuroni, non avendo il recettore D2, sono insensibili alla dopamina o all’agonista selettivo D2, il quinpirolo (FIG 6D).

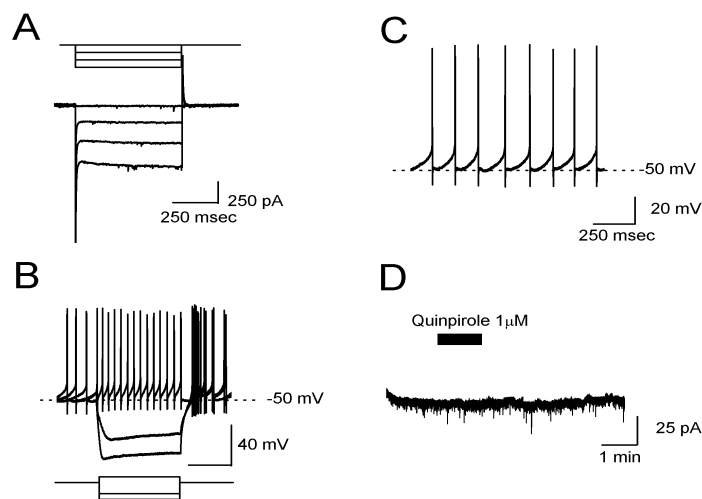


FIG 6: Caratteristiche elettrofisiologiche di un interneurone GABAergico della SNc registrato mediante la tecnica del patch-clamp.

Il morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson (PD) è una malattia cronica progressiva che si manifesta più comunemente tra i 50 e i 60 anni, nella quale è gradualmente persa la capacità di eseguire movimenti volontari. I segnali clinici più evidenti sono: tremore a riposo, bradicinesia (lentezza nei movimenti), rigidità e riflessi posturali anormali. Questi sintomi clinici sono dovuti alla diminuzione di dopamina nel cervello, causata dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici contenenti melanina (nei primati) della sostanza nera *pars compacta*. Durante il processo degenerativo, i neuroni residui mostrano caratteristiche inclusioni citoplasmatiche dette “corpi di Lewis” che sono costituiti da neurofilamenti e mostrano immunoreattività per l’ubiquitina (Lewy, 1912; Jellinger, 1987). Recenti studi sottolineano come la presenza a livello del terminale presinaptico della proteina α -sinucleina sia coinvolta nella formazione di tali inclusioni e nella patogenesi della malattia (Spillantini *et al*, 1997,1998; Di Monte, 2003; Maries *et al*, 2003; Dev *et al*, 2003). La perdita dei neuroni dopaminergici produce una drammatica denervazione dopaminergica striatale causando una cascata di modificazioni funzionali che coinvolgono tutti i componenti del circuito dei gangli della base.

Innanzitutto la mancanza di dopamina nello striato produce un’iperattività dei neuroni della via indiretta perché l’innervazione glutammatergica cortico-striatale non è più tenuta a freno dall’attivazione dei recettori D2. Nei soggetti malati di PD è stato dimostrata, inoltre, una diminuzione del numero di spine a livello dendritico dei neuroni della via indiretta (Day *et al*, 2006; Deutch, 2006; Neely *et al*, 2007) come meccanismo compensatorio per attenuare tale eccitabilità. La maggiore attivazione di questa via, associata ad una diminuita attività dei neuroni striatali della via diretta, induce un aumento dell’output inibitorio dalla SNr e GPi al talamo e, quindi, in una diminuita attività degli stessi verso la corteccia motoria.

Ma il quadro non sembra essere così semplice. L’iperattività del STN non sembra essere mediata solo dall’attivazione del GPe come indicato dal modello base (Blandini *et al*, 2000). Questa potrebbe derivare anche dalla proiezione diretta corticosubtalamica che risulta essere ancora funzionale, anche nella fase terminale della malattia (Frank *et al*, 2007).

Inoltre esiste una evidenza anatomica di una connessione glutammatergica tra il STN e la SNc (Smith *et al*, 1992 e 1996; Iribe *et al*, 1999). Attraverso questa via

eccitatoria, il nucleo subtalamico influenza l'attività dei neuroni nigrali (Smith and Grace, 1992). Quindi, la disinibizione del STN che segue il danno nigrostriatale produce una sovrastimolazione dei neuroni residui della SNc peggiorando il danno iniziale e creando un circolo vizioso sostenuto da se stesso (Rodriguez *et al*, 1998). Infatti una delle più recenti terapie per alleviare i sintomi della malattia di Parkinson è quella di ridurre l'attività del STN attraverso l'impianto di una elettrodo all'interno del nucleo che, stimolato ad elevata frequenza (Deep Brain Stimulation, DBS), dovrebbe agire attraverso questi due meccanismi: (i) inibizione del soma per stimolazione di rilascio di GABA dalle afferenze provenienti dal GPe; (ii) attivazione delle efferenze del STN ai nuclei output SNr e GPi con conseguente attivazione della via talamo-corticale compensando il difetto iniziale.

Altre due alterazioni nella fisiologia neuronale riscontrate nei pazienti non trattati che presentano la malattia di Parkinson sono: (i) un intenso fenomeno oscillatorio del potenziale d'azione tra i 10 e i 25 Hz (banda β) nel STN, SNr e GPi che viene soppresso da terapie che ristabiliscono il tono dopaminergico (Brown *et al*, 2001; Brown and Williams, 2005).

Le cause della malattia di Parkinson

Lo sviluppo di modelli animali rappresenta un valido mezzo per la sperimentazione di strategie terapeutiche utilizzabili nell'uomo. Ad oggi i trattamenti più utilizzati per indurre degenerazione delle cellule dopaminergiche includono: MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (Nicklas *et al*, 1985), 6-OH-DA (6-idrossidopamina), pesticidi come il rotenone e il paraquat o l'inibizione del proteosoma (McNaught *et al*, 2004).

Sebbene molto sia stato fatto dal 1817, quando James Parkinson descrisse nella sua monografia "Essay on the Shaking Palsy" i principali segni clinici della malattia, ancora non è completamente nota la causa della morte (il *primum movens*) dei neuroni dopaminergici e, quindi, i trattamenti ad oggi utilizzati hanno il solo scopo di alleviarne i sintomi. Sembra comunque che non esista un singolo fattore alla base della malattia ma che più fattori cooperino insieme allo sviluppo del PD. Per cui quella che seguirà sarà la descrizione delle più accreditate ipotesi responsabili della eziopatologia alla base della malattia di Parkinson.

E' stato dimostrato che pazienti parkinsoniani presentavano un deficit nell'attività del complesso I della catena respiratoria mitocondriale (Parker *et al*, 1989; Schapira *et al*, 1990). Inoltre i neuroni dopaminergici sembrano essere particolarmente esposti a stress ossidativi. Infatti il catabolismo della dopamina, l'autossidazione della melanina e la presenza di alti livelli di ferro, che inducono elevate formazioni di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Coyle and Puttfarcken, 1993), insieme alla diminuzione della quantità di glutatione (Sian *et al*, 1994) e all'aumentata attività della superossido dismutasi, descritta nei pazienti affetti dalla malattia (Poirier *et al*, 1994), rendono i neuroni dopaminergici dei pazienti più vulnerabile allo stress ossidativo.

E' stata anche dimostrata una stretta correlazione tra la malattia di Parkinson e fattori genetici. In alcune famiglie di soggetti affetti dal PD è stata dimostrata una mutazione nel gene dell' α -sinucleina nel cromosoma 4 (Polymeropoulos *et al*, 1997). Recentemente sono state dimostrate delle mutazioni nel canale ionico calcio-permeabile TRPM2 (Hermosura *et al*, 2008), nel promotore LSP del genoma mitocondriale (Lynch *et al*, 2008) e nel trasportatore gliale del glutammato (Wilson and Shaw, 2007) in pazienti affetti dalla sindrome della sclerosi laterale amiotrofica-demenza parkinsoniana ("ALS-PDC complex") presente nell'isola di Guam.

Una grande importanza rivestono i fattori ambientali, l'apoptosi e la tossicità indotta dal glutammato nella patogenesi del morbo di Parkinson dei quali parlerò successivamente.

I Fattori ambientali nel PD

L'importanza dei fattori ambientali nello sviluppo del morbo di Parkinson è stata postulata per la prima volta da Calne and Langston nel 1983. Tuttavia la maggiorparte dei pazienti affetti da PD non sono in grado di identificare nel loro passato un'esposizione ad una tossina ambientale sufficiente a generare la malattia. Se questo potrebbe diminuire l'interesse verso questo tipo di causa dall'altro sottolinea ancora di più come tale malattia sia multifattoriale ("multiple hit hypothesis"), legata cioè alla concomitante o ripetitiva presenza di fattori che cooperano alla maggiore suscettibilità alla morte cellulare (Di Monte, 2003; Greenamyre *et al*, 2003; Le Couteur *et al*, 2002).

Ad oggi è certo che la vita rurale, il bere l'acqua dal pozzo e l'esposizione ad agenti chimici usati nell'agricoltura possono aumentare il rischio di manifestare la malattia di Parkinson (Warner and Schapire, 2003).

Sebbene una grande varietà di processi neurologici potrebbero essere influenzati da neurotossine ambientali, il sistema dopaminergico sembra essere quello più colpito (FIG 7).

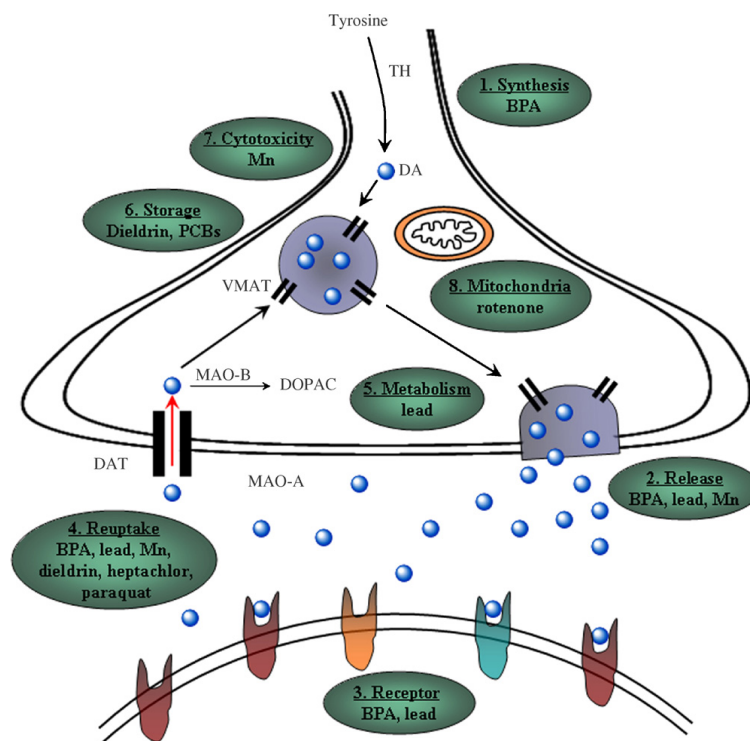


FIG 7: Rappresentazione schematica della neurotrasmissione dopaminergica e degli effetti di vari agenti tossici ambientali (Jones DC and Miller GW, 2008).

Disregolatori ormonali

I disregolatori ormonali ambientali (EDC) sono composti che colpiscono il sistema endocrino alterando l'attività ormonale. La popolazione umana viene esposta a tali sostanze prevalentemente in seguito alla ingestione di cibi contaminati. Fra questi, il più diffuso è il BPA (4,4'-isopronilidenediphenal).

L'effetto del BPA sul sistema dopaminergico è sia presinaptico, con alterazione della sintesi, rilascio, turnover ed uptake della DA (Ishido *et al*, 2007) che postsinaptico, con down-regulation dei recettori D4 (Ishido *et al*, 2007). E' ancora da dimostrare se questa azione sia mediata dall'interazione con i recettori per gli estrogeni con successiva alterazione dei processi di trascrizione o da un'interazione diretta con il sistema dopaminergico.

Metalli pesanti

I metalli pesanti sono degli elementi naturali con elevato peso molecolare, come il manganese e il piombo. Questi possono accumularsi nei tessuti umani e indurre elevata tossicità. Sono altamente presenti nell'ambiente. Il piombo, per esempio, è presente nei vecchi dipinti, nel computer, nella televisione, nella benzina e nell'acqua potabile; il manganese, nell'acciaio, nell'alluminio e come fungicida (maneb).

Il piombo penetra nella barriera emato-ecnofalica (BEE) e interferisce con il normale funzionamento del SNC provocando alterazioni nella trasmissione dopaminergica. I suoi effetti, tuttavia, sembrano dipendere molto dalla dose, dal sesso e dallo stato di sviluppo al momento dell'esposizione (Jones and Miller, 2008).

Il manganese è un cofattore di numerosi enzimi ed induce degenerazione dei neuroni dopaminergici con diminuzione dei livelli extracellulari di DA (Guilarte *et al*, 2006). Sembra che il meccanismo principale di induzione di morte cellulare sia lo stress ossidativo con aumento della quantità dei ROS sia per inibizione della catena respiratoria mitocondriale (Galvani *et al*, 1995) che per ossidazione della dopamina (Stredrick *et al*, 2004).

I Pesticidi

I pesticidi sono un gruppo di sostanze chimiche designate per uccidere insetti (insetticidi), roditori (rodenticidi), piante (erbicidi) e funghi (fungicidi).

L'introduzione in campo agricolo di pesticidi se da un lato ha migliorato la qualità, la quantità e la disponibilità dei prodotti, dall'altra ha esposto l'uomo a sostanze altamente nocive che possono contribuire ad incrementare l'incidenza di malattie neurodegenerative.

I rodenticidi e gli insetticidi non sembrano avere effetti deleteri e a lungo termine sulle cellule dopaminergiche ad eccezione del maneb.

Il paraquat è un erbicida sintetizzato nel 1961 che ha suscitato l'interesse degli studiosi per la sua potenziale neurotossicità dopo la scoperta degli effetti neurodegenerativi dell'MPTP, con il quale ha in comune la struttura chimica molto simile. Tuttavia il paraquat presenta un limitato assorbimento e non passa la BEE

(Koller WC, 1986). Esperimenti sulla sua potenziale tossicità sono contrastanti. Sebbene in passato sembrava che il paraquat non inducesse un'evidente alterazione del sistema dopaminergico (Perry *et al*, 1986), più recenti esperimenti hanno dimostrato morte cellulare, ridotta capacità di movimento nei topi trattati e aumentati livelli di α -sinucleina (Shimizu *et al*, 2003; Ossowska *et al*, 2005; Fredriksson *et al*, 1993; Manning-Bog *et al*, 2002). La morte cellulare sembra sia dovuta ad un'attivazione della trasmissione glutammatergica (via eccitotossica) con aumento dei livelli di calcio intracellulare, stimolazione dell'ossido nitrico sintetasi con produzione di ROS ed ulteriore disfunzione mitocondriale (Shimizu *et al*, 2003). Inoltre il paraquat sembra attivare cicli di ossidoriduzione tramite i quali viene rapidamente convertito in radicale libero che poi, reagendo con l'ossigeno, genera anioni superossido che, a loro volta, sono alla base di stress ossidativi (Yumino *et al*, 2002).

Molto più interesse ha sempre suscitato il rotenone. Questo è un insetticida di origine naturale (si trova nelle radici di una pianta del genere *Leguminose*) che interagisce in modo specifico con il complesso I della catena respiratoria mitocondriale (Schuler and Casida, 2001).

Inizialmente il rotenone era usato dagli Indiani come veleno per i pesci. Oggi è usato comunemente come pesticida per la sua elevata biodegradabilità (la sua vita media nell'ambiente è di pochi giorni). E' tuttavia altamente lipofilo per cui passa rapidamente la membrana cellulare, la BEE e si accumula in organelli subcellulari come il mitocondrio (Talpade *et al*, 2000).

Sia una somministrazione pulsatile (Alam and Schmidt, 2002) che cronica (Betarbet *et al*, 2000) del rotenone *in vivo* e *in vitro* induce degenerazione dei neuroni nigrostriatali, formazione di inclusioni citoplasmatiche simili ai corpi di Lewy, danno ossidativo e atteggiamento parkinsoniano compresa la bradicinesia e la rigidità.

Il meccanismo secondo cui la disfunzione sistemica del complesso I induca neurotossicità non è ancora noto.

La causa più accreditata sembra essere lo stress ossidativo (Sherer *et al*, 2003) con conseguente riduzione dei livelli di glutazione, modificazione ossidativa del DNA, dei lipidi, delle proteine e protezione ad opera di antiossidanti come l' α -tocoferolo (Alam *et al*, 1997; Floor and Wetzel, 1998).

Inoltre è stato dimostrato un aumento dei livelli di H₂O₂ e di ROS per inibizione del complesso NADH deidrogenasi e attivazione della NAD(P)H ossidasi (Tada-Oikawa

et al, 2003). Si crede che gli aumentati livelli di ROS siano anche mediati dalla microglia, attivata dallo stesso rotenone (Beal, 2003). Questo enorme stress ossidativo prodotto determina alterazione della funzionalità mitocondriale con attivazione di processi apoptotici (Tada-Oikawa *et al*, 2003).

La conseguente diminuzione dei livelli di ATP intracellulari determina l'apertura dei canali K^+ -ATP (Aguilar-Bryan *et al*, 1998). E' stato dimostrato che l'iperpolarizzazione indotta dall'applicazione del rotenone sulle cellule dopaminergiche della SNc è mediata dall'apertura di questi canali. Inoltre le cellule dopaminergiche che contengono la subunità SUR-1 del canale K^+ -ATP sono più sensibili alle alterazioni metaboliche indotte dalla tossina (Liss *et al*, 1999).

La selettività del rotenone per il sistema dopaminergico è stata spiegata sulla base dell'effetto citotossico mediato dalla stessa dopamina endogena che può avvenire sia dal suo metabolismo, attraverso la produzione di ROS o attraverso un suo diretto effetto nel processo neurodegenerativo (Stokes *et al*, 1999). E' stato infatti dimostrato che i neuroni dopaminergici, ma non quelli GABAergici, sono protetti dalla tossicità indotta dal rotenone attraverso l'uso della α -methyl-p-tyrosine (α -MT), un composto che inibisce la TH ed induce una diminuzione dei livelli di DA (Spector *et al*, 1965). Quindi, il blocco del complesso I della catena mitocondriale avviene indistintamente in tutte le cellule, tuttavia questa inibizione non induce la morte nelle cellule non-dopaminergiche in quanto l'aumento di ROS che ne consegue viene facilmente controllato dagli antiossidanti intracellulari. L'associazione ROS-dopamina nelle cellule dopaminergiche sarebbe invece alla base dello scatenarsi del processo apoptotico (Sakka *et al*, 2003).

I lipopolisaccaridi

Numerosi studi hanno dimostrato la presenza di stadi infiammatori nei cervelli dei pazienti affetti da PD (Nagatsu *et al*, 2000; Hunot and Hirsch, 2003; Gao *et al*, 2003). Da questi lavori emerge che una singola esposizione delle cellule dopaminergiche a fattori neurotossici può iniziare un processo infiammatorio. Sebbene quest'ultimo di per sé non sarebbe sufficiente per indurre morte neuronale (Hunot and Hirsch, 2003) esso potrebbe predisporre i neuroni ad una degenerazione progressiva ed indurre, a seguito di una successiva esposizione a neurotossine o ad altri stati infiammatori, il manifestarsi di malattie neurologiche (Ling *et al*, 2006).

Questo ha suscitato l'interesse di molti studiosi sulla possibile implicazione del lipopolisaccaride (LPS) dei batteri Gram (-) nel PD (l'LPS è uno dei componenti della parete esterna dei batteri Gram (-), è tossico ed attiva il sistema immunitario). E' stato dimostrato che trattando embrioni di topi con il LPS, la successiva esposizione alla 6-OHDA o al rotenone in dosi sub-tossiche, causava un grado di morte cellulare molto maggiore rispetto ai topi non trattati in utero con il lipopolisaccaride, nonché un aumento dei livelli di TNF α (Ling *et al*, 2004 a,b). Inoltre, i topi esposti a LPS durante la vita fetale presentavano inclusioni reattive all' α -sinucleina, corpi di Lewis, un aumento di radicali liberi e una diminuzione dei livelli di glutatione ridotto (GSH), noto antiossidante presente nel cervello (Ling *et al*, 2004b; Zhu *et al*, 2007).

Questo potrebbe spiegare perché l'esposizione a questo lipopolisaccaride nell'uomo, in seguito a vaginosi batteriche durante la gestazione (Damman and Leviton, 1998; Paige *et al*, 1998), complica il 14% delle nascite (Thorsen *et al*, 1998).

Con questa nuova teoria si potrebbe anche spiegare perché gli attuali modelli animali (che inducono morte cellulare dopo esposizione acuta alle tossine) sono in grado di produrre una massiva morte cellulare ma non perdita progressiva dei neuroni dopaminergici. Probabilmente i livelli di infiammazione ottenuti da questi modelli diminuiscono rapidamente prevenendo un'ulteriore e progressiva perdita cellulare a differenza di ciò che accade in animali trattati per due volte, una prima della nascita e una dopo la nascita, nei quali si ha una risposta infiammatoria che si mantiene più a lungo (Ling *et al*, 2006).

La BMAA

La BMAA (β -methylamino-L-alanine), un aminoacido non proteico contenuto nei semi della *Cycas micronesica*, è considerata la causa della sindrome nota come “ALS-PDC complex” diffusa soprattutto nelle zone del Pacifico Sud Occidentale (isola di Guam, Giappone e Nuova Guinea). Tuttavia la reale implicazione della BMAA in questa sindrome è ancora soggetto di studio.

Nel 1945 Zimmermann aveva per primo indicato un’incidenza di ALS fra le popolazioni Chamorro dell’isola di Guam 50-100 volte più elevata rispetto al resto del mondo (Zimmermann, 1945). Mulder e colleghi notarono inoltre che le stesse popolazioni presentavano sintomi di un tipico parkinsonismo associati ad evidenti difetti nella memoria (Mulder *et al*, 1954). Questa osservazione è stata seguita da studi clinici e patologici da Hirano e colleghi che nel 1961 hanno introdotto il termine di “ALS-PDC complex” (amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex) (Hirano *et al*, 1961) per indicare questa sindrome complessa, con sintomatologie cliniche tipiche di ALS, Parkinson e Alzheimer.

La prima indicazione sulla possibile causa di tale patologia venne nel 1967 nella Quinta Conferenza Internazionale, durante la quale Bell e colleghi indicarono nella BMAA, altamente diffusa in quelle aree, il potenziale agente neurotossico alla base della sindrome (Vega and Bell, 1967; Whiting, 1988). Infatti gli abitanti dell’isola di Guam erano soliti cibarsi della farina prodotta dai semi contenenti questo aminoacido. Tuttavia, poichè in tutti gli animali trattati da Vega e colleghi (polli, ratti e gatti) l’effetto della BMAA era acuto e scompariva dopo qualche giorno senza lasciare cambiamenti neuropatologici evidenti, e poiché la concentrazione dell’aminoacido contenuto nei semi della *Cycas* era bassa (30 mg/100 g), la BMAA non fu più considerata come causa della sindrome ALS-PDC (Polsky *et al*, 1972). Successivamente Spencer e colleghi dimostrarono le proprietà neurotossiche della BMAA sia *in vitro* che *in vivo*, nei topi e nelle scimmie (Spencer *et al*, 1986, 1987a, 1987b; Nunn *et al*, 1987; Ross and Spencer, 1987). Tuttavia, questi lavori furono altamente criticati per le seguenti ragioni: (i) le dosi di BMAA usate per indurre la malattia erano alte e somministrate in un periodo di tempo troppo breve; (ii) l’animale sviluppava una tossicità acuta/subacuta, invece di mostrare una neurodegenerazione progressiva; (iii) gli effetti tossici indotti dalla BMAA non erano stati riprodotti in altri studi in vivo (Duncan *et al*, 1998; Garruto *et al*, 1988; Perry *et*

al, 1989). Quindi l'interesse epidemiologico e clinico per questa malattia andò di nuovo a diminuire anche se cominciavano ad emergere sempre più evidenze sull'attività della BMAA come agonista dei recettori del glutammato (Staton and Bristol, 1997; Copani *et al*, 1991; Ross *et al*, 1987; Zeevalk and Nicklas, 1989; Manzoni *et al*, 1991; Pai *et al*, 1993; Ross and Spencer, 1987; Chang *et al*, 1993; Allen *et al*, 1993).

Questa attività "glutamate-like" era spiegata sulla base della somiglianza strutturale tra la molecola di glutammato e il derivato β - carbammato che la BMAA forma in presenza di carbonato (Myers e Nelson, 1990) (FIG 8). Alcuni studi hanno infatti dimostrato che la tossicità della BMAA è correlata alla concentrazione di carbonato del mezzo nel quale è disciolta (Allen *et al*, 1993).

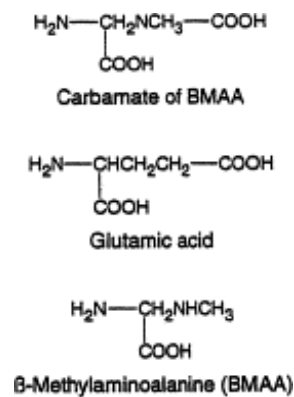


FIG 8: Il β -carbammato, a differenza della BMAA, ha una struttura simile a quella dell'acido glutammico: 2 carbossili e 1 gruppo amminico (Brownson *et al*, 2002)

Recentemente tuttavia, l'ipotesi che la BMAA sia la causa della sindrome ALS-PDC è stata reintrodotta per le seguenti ragioni: (i) i pipistrelli che vivono nelle isole di Guam e si cibano dei semi della *Cycas* fanno parte della dieta comune delle popolazioni dell'isola. Ciò aumenta la dose giornaliera di BMAA assunta con il cibo (Banack and Cox, 2003); (ii) la BMAA è stata trovata nel cervello di pazienti dell'isola di Guam morti di ALS-PDC (Cox *et al*, 2003); (iii) la BMAA viene prodotta da diverse specie di cianobatteri del genere *Nostoc* che possono comportarsi sia da simbionti delle radici della *Cycas* (Cox *et al*, 2005) che trovarsi liberi nell'acqua di mari, laghi e fiumi (Banack *et al*, 2007); (iv) la BMAA può essere

accumulata nell'ecosistema marino e terrestre attraverso una catena alimentare (Cox *et al*, 2005); (v) la BMAA si può trovare libera o legata alle proteine ("bound form") all'interno dell'organismo. In questo modo ci sarebbe una riserva endogena della tossina che potrebbe essere rilasciata lentamente nel tessuto cerebrale attraverso il catabolismo proteico (Murch *et al*, 2004).

Quindi la BMAA si inserisce nella catena alimentare delle popolazioni Chamorro attraverso diverse fonti (acque contaminate, semi, pipistrelli), si accumula nell'organismo legata alle proteine e viene successivamente rilasciata in modo continuo, costituendo un agente neurotossico subcronico per il tessuto nervoso. L'aspetto più inquietante risiede però nella possibile contaminazione da BMAA dell'ecosistema terrestre e marino mondiale sulla base del numero elevato e non circoscritto di cianobatteri che la possono produrre. E' stata infatti già dimostrata la presenza di BMAA nel cervello di pazienti canadesi deceduti a causa di una sindrome simile all'ALS-PDC (Murch *et al*, 2004) nonché in molti laghi inglesi (Metcalf *et al*, 2008) e acque raccolte in Sud Africa usate nell'irrigazione dei campi (Esterhuizen M and Downing TG, 2008).

Inoltre, a rendere il quadro ancora più inquietante, recenti studi hanno dimostrato un evidente effetto tossico indotto dalla BMAA nell'ippocampo, *in vivo*, (Buenz and Howe, 2007), nei motoneuroni spinali, attraverso l'attivazione dei recettori AMPA/kainato (Rao *et al*, 2006) e nella corteccia, a basse concentrazioni, per attivazione dei recettori NMDA e mGluR5 (Lobner *et al*, 2007).

La crescente preoccupazione sulla potenziale diffusione della BMAA nel mondo e la crescente evidenza del sua attività eccitotossica ci ha indotti ad indagare gli effetti di questo aminoacido sulle cellule dopaminergiche della SNc.

L'apoptosi

Il termine apoptosi è stato introdotto per la prima volta nel 1972 da John Kerr per indicare la morte cellulare programmata che avveniva nel rimodellamento tissutale. Oggi è noto che questo processo non solo è necessario per il mantenimento del corretto bilancio cellulare durante lo sviluppo tissutale ma contribuisce anche allo sviluppo di diverse forme di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer e il morbo di Parkinson (Yuan and Yankner, 2000). Mentre sembra che il corretto rifornimento di fattori di crescita sia alla base dell'induzione dell'apoptosi durante lo sviluppo, insulti tossici biochimici o la predisposizione genetica possono essere alla base dell'induzione dell'apoptosi nelle malattie neurodegenerative (Yuan and Yankner, 2000).

L'apoptosi coinvolge una cascata di eventi biochimici che, nell'ultima fase del processo, inducono cambiamenti caratteristici della morfologia nucleare e frammentazione del DNA (Green, 1998).

Nei mammiferi questo processo è regolato dalla famiglia di proteine Bcl-2, la proteina adattatrice Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1) e la famiglia delle caspasi.

La famiglia Bcl-2 include sia proteine anti-apoptotiche (Bcl-2 e Bcl-x_L), localizzate nella membrana esterna dei mitocondri, del reticolo endoplasmatico (ER) e della membrana perinucleare, che pro-apoptotiche (Bax, Bid e Bik), che si trovano prevalentemente libere nel citosol.

Apaf-1 trasmette i segnali apoptotici rilasciati dai mitocondri alle caspasi. In particolare, forma un complesso con il Citocromo C (Cyt C) rilasciato dai mitocondri e la caspasi 9 per mediare l'attivazione della pro-caspasi 9. La caspasi 9 attivata induce a sua volta l'attivazione della caspasi 3 con successivo danno al DNA (FIG 9).

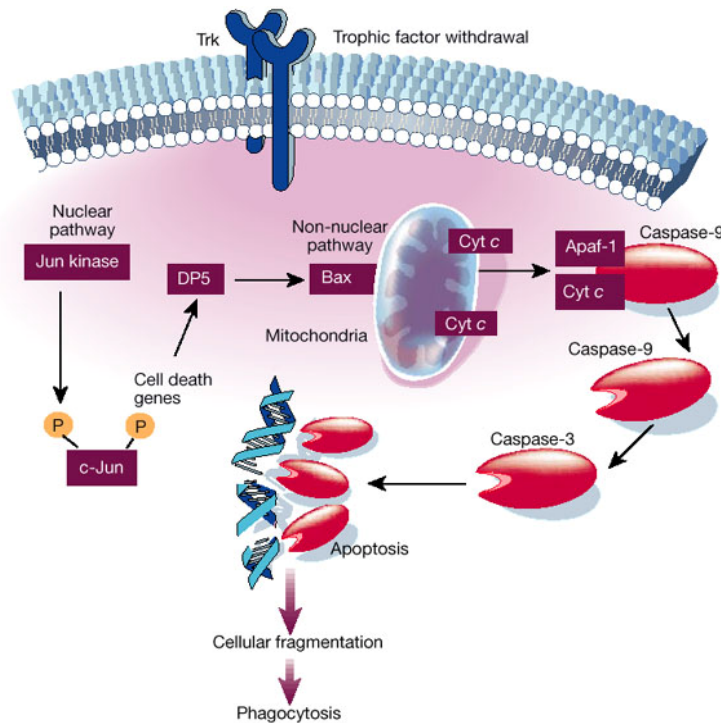


Fig 9: Rappresentazione schematica dei fattori coinvolti nell'apoptosi (Yuan J and Yanker BA, 2000).

Nei mammiferi esistono 14 forme diverse di caspasi organizzate in vie parallele, spesso sovrapposte, specializzate nella risposta a stimoli specifici e distinti. Le caspasi sono espresse come proenzimi inattivi che vengono attivati a cascata da stimoli superiori. Le due principali caspasi coinvolte nella morte neuronale sono la caspasi 9 e 3 in cui la prima attiva la seconda (Green, 1998).

Gran parte delle proteine che promuovono l'apoptosi (Cyt C e alcune pro-caspasi) risiedono nel mitocondrio, nella spazio che si forma tra la membrana interna (che circonda la matrice mitocondriale) e la membrana esterna (OMM), detto spazio intermembrana. La membrana esterna è altamente impermeabile a tutti i fattori apoptotici presenti nello spazio intermembrana quindi, mantenerne l'integrità e regolarne la permeabilità, è cruciale per evitare lo scatenarsi di morte cellulare programmata. La rottura della membrana esterna può avvenire in diversi modi: (i) la carenza di ossigeno o di ADP nella mitocondrio (Hackenbrock CR, 1966; Liu and Colombini, 1992) può danneggiare la catena respiratoria con successivo rigonfiamento della matrice mitocondriale e, quindi, rottura della OMM. ROS e fattori pro-apoptotici come Bax possono contribuire ad esacerbare il metabolismo

mitocondriale (Khaled *et al*, 1999; Mignatte and Vayssiere, 1998) mentre Bcl-xL lo migliorano (VanderHeiden *et al*, 1999) ; (ii) la formazione di uno specifico canale permeabile al Cyt C attraverso l'interazione tra Bax e il canale VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) presente sulla membrana esterna mitocondriale (Shimizu *et al*, 2000) o la polimerizzazione di proteine pro-apoptotiche come Bax e Bak che, in risposta a stress cellulari, cambiano conformazione e dal citosol si inseriscono nella OMM (Antonsson *et al*, 2000); (iii) l'apertura del canale PT (un grosso canale che, quando totalmente aperto, permette il passaggio di proteine di grandi dimensioni) sulla membrana esterna, indotta da eccessivo ingresso di calcio.

La fuoriuscita di Cyt C è regolata anche dai fattori di fusione Drp 1 e Fis 1. Questi, in presenza di stimoli pro-apoptotici, inducono il disassemblamento di Opa-1, una serie di proteine che, in condizioni normali, formano una strozzatura a livello delle creste mitocondriali che funge da riserva di Cyt C. Questo, insieme alla polimerizzazione di Bax e Bak, induce la fuoriuscita del citocromo C e l'instaurarsi dell'apoptosi (Dominic and Martinou, 2008) (FIG 10)

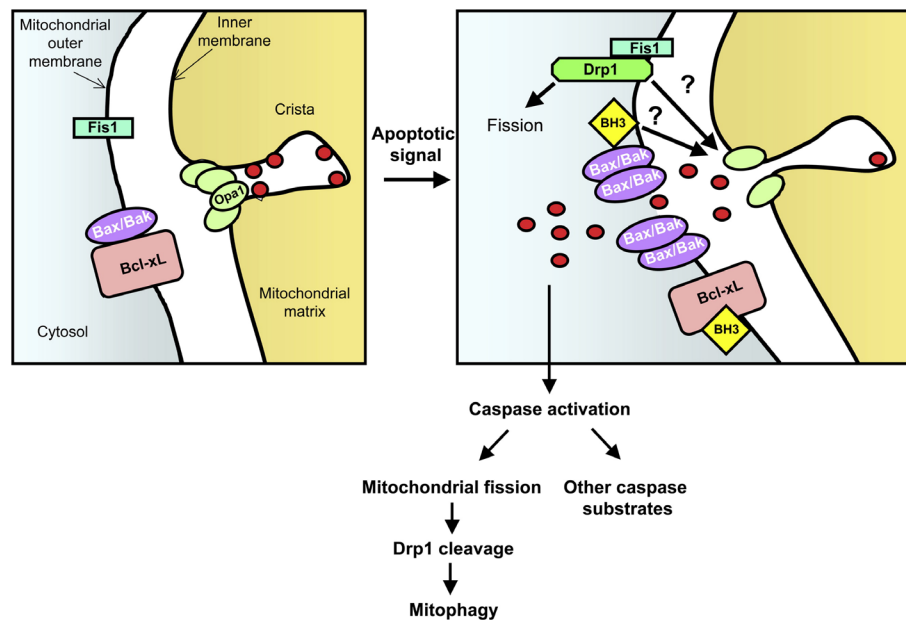


FIG 10: Il coinvolgimento delle proteine di fusione e di fissione nell'apoptosi (James DI and Martinou J-C, 2008).

Il coinvolgimento del calcio nella morte cellulare è stato indicato per la prima volta nel 1974 da Fleckenstein. L'aumento eccessivo del calcio intracellulare è stato

definito come lo step finale sia della necrosi che dell'apoptosi: la differenza è che per attivare quest'ultima sono necessari minori livelli di calcio citoplasmatico (Choi, 1995; Nicotera and Orrenius, 1998).

I meccanismi cellulari alla base del buffering del calcio non sono ancora del tutto chiari così come i meccanismi alla base della morte cellulare.

Il buffering del calcio

Uno dei maggiori consumi energetici della cellula risiede nel mantenere i livelli di calcio intracellulare 10000 volte più bassi (10-100 nM) rispetto allo spazio extracellulare (~ 2 mM). Le più importanti vie di ingresso di calcio nella cellula sono i canali voltaggio-dipendenti (VOCs) presenti sulla superficie cellulare e i recettori ionotropici del glutammato (IR) (FIG 11). Inoltre molti recettori legati alle proteine G (come i recettori metabotropici, MR) inducono la formazione di IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate) che va a sua volta ad interagire con il recettore (IP₃R) presente sulla membrana del ER con successivo rilascio di calcio nel citoplasma.

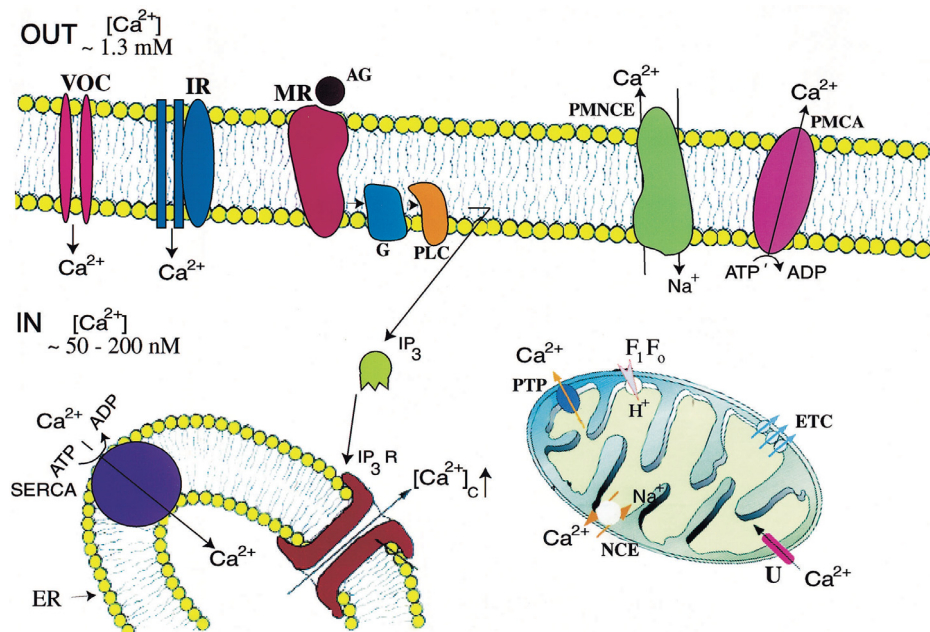


FIG 11: Meccanismi intracellulari di buffering del calcio (Smaili SS *et al*, 2000).

Molti meccanismi poi riportano la concentrazione di calcio a livello basale. Sulla membrana cellulare lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (PMNCE) e la pompa Ca^{2+} -ATPasi (PMCA) espellono il calcio nel compartimento extracellulare; la pompa di Ca^{2+} , ATP dipendente, nota come SERCA presente nel ER, riporta il calcio all'interno dell'organello immagazzinandolo come riserva per stimoli successivi.

I mitocondri, a parte la loro nota capacità di produrre ATP, sono responsabili, insieme al ER, della rimozione del calcio citoplasmatico soprattutto quando questo raggiunge concentrazioni micromolari intorno all'organello (Rizzato *et al*, 1993). Questi immagazzinano il calcio grazie e alle spese della differenza di potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$, negativa all'interno) soprattutto attraverso un complesso proteico denominato “uniporter” localizzato sulla membrana interna (Gunter *et al*, 1994,1998). Oltre che come riserva, il calcio mitocondriale è indispensabile per l'attività di numerosi enzimi metabolici localizzati nella matrice mitocondriale come la piruvato, l' α -chetoglutarato e l'isocitrato deidrogenasi (Pizzo and Pozzan, 2007) i quali, a loro volta, favorendo l'estrusione di protoni, contribuiscono a mantenere il gradiente elettrochimico del calcio e la produzione dei ATP. Sulla base di questo, recenti studi hanno dimostrato la presenza nel mitocondrio di un rapido uptake (RAM) che si attiva quando si formano intorno all'organello dei microdomini citosolici di calcio ad elevata concentrazione (sia dovuti ad ingresso di calcio dall'esterno che al rilascio dal ER) e che permette al mitocondrio di immagazzinare una quantità di calcio sufficiente ad aumentare l'attivazione degli enzimi metabolici Ca^{2+} -dipendenti (Sparagna *et al*, 1995). La fuoriuscita del calcio dal mitocondrio avviene attraverso 3 vie: lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (elettrogenico), lo scambiatore $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ e il poro transiente di permeabilità (PTP). Questo poro si apre sia in condizioni fisiologiche che in seguito a danno cellulare inducendo rilascio di soluti di peso < 1500 Da, collasso del gradiente protonico e diminuzione della sintesi di ATP con successiva disfunzione mitocondriale (Zoratti and Szabo, 1995; Bernardi and Petronilli, 1996). Ichas and Mazat (1998) hanno suggerito che esistono due stati di apertura per il PTP: uno a bassa conduttanza che risulta da un'apertura parziale e transiente del canale, che dipende dal pH e permette la diffusione di piccole molecole come calcio e protoni; il secondo ad elevata conduttanza dovuto ad un'apertura totale e a lunga durata del canale che permette una diffusione non selettiva di larghe molecole che porta alla distruzione del $\Delta\Psi_m$ e della struttura mitocondriale. Il passaggio da una

conformazione all'altra dipende dal legame del calcio al PTP che porta a rigonfiamento e disfunzione mitocondriale quando si ha un inappropriato aumento di calcio (Ichas *et al*, 1994 e 1997).

La complessa interazione tra ER e mitocondrio nella morte cellulare

E' chiaro oggi come sia il mitocondrio che il ER siano degli organelli altamente mobili. Questi, infatti, attraverso proteine specializzate come Milton e Miro (per il mitocondrio) o il citoscheletro si spostano nelle aree dove si ha maggiore richiesta di energia (Hollenbeck and Saxton, 2006; Rintoul *et al*, 2003). Inoltre il movimento del mitocondrio sembra avvenire in concomitanza e in sincronia con quello di specifiche regioni del ER. Recenti lavori hanno infatti dimostrato la chiara interazione fisica tra il mitocondrio e il ER (Rizzuto *et al*, 1998; Mannella CA, 2006) (FIG 12)

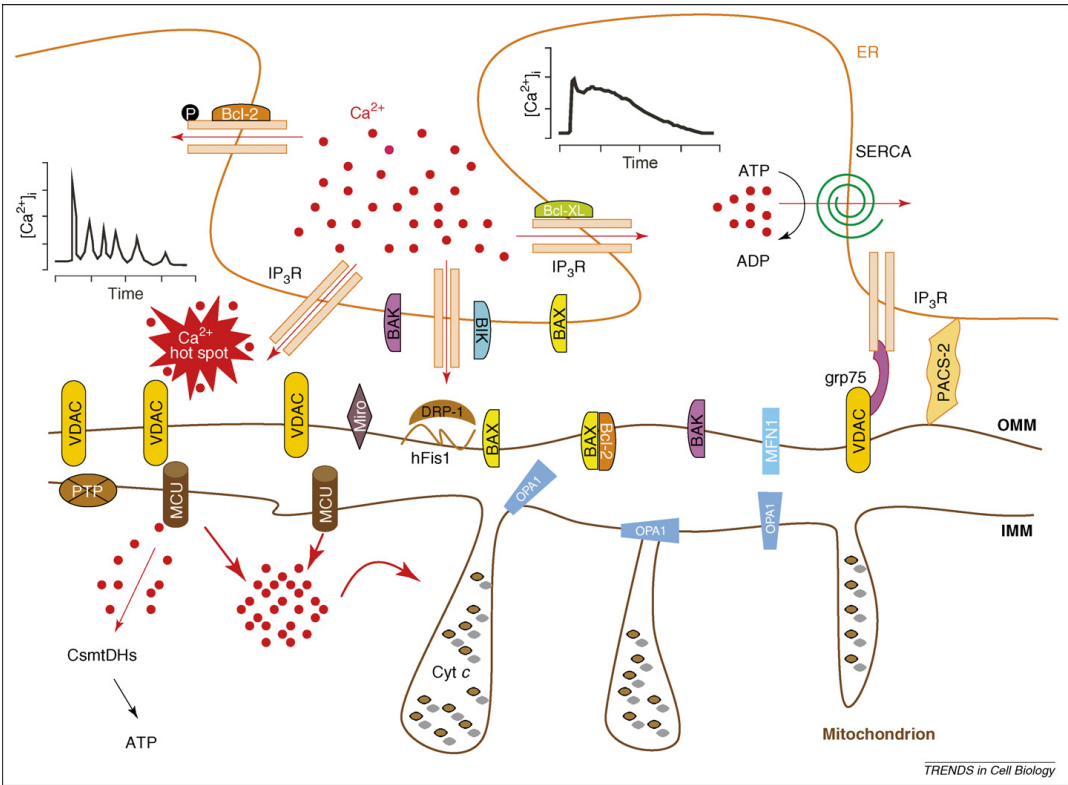


FIG 12: Interazioni locali tra il mitocondrio e il ER (Pizzo and Pozzan, 2007).

Per esempio i canali VDAC interagiscono fisicamente con il recettore IP3 del ER attraverso la molecola chaperone grp75 e la proteina PACS-2 (Szabadkai *et al*, 2006; Simmen *et al*, 2005). Bik, un membro della famiglia Bcl-2, è ancorato alla superficie del ER ed è responsabile del rifornimento di DRP-1 (di cui parlerò in seguito) da parte del mitocondrio (Germani *et al*, 2005). Inoltre, il gruppo di Snyder ha dimostrato come il Cyt C, dopo il suo iniziale rilascio Ca^{2+} -dipendente dal mitocondrio, passa nel ER e interagisce con il recettore IP3 inducendo un'ulteriore aumento del rilascio di calcio (Boehning *et al*, 2003).

Quindi l'interazione fisica tra ER ed il mitocondrio non è solo regolata dallo scambio di calcio ma anche da altri processi fisiologici come l'apoptosi.

Quando grandi quantità di calcio si accumulano nella matrice mitocondriale il calcio interagisce con la ciclofillina 2 inducendo l'apertura totale e a lunga durata del PTP (Basso *et al*, 2005; Ichas *et al*, 1994 e 1997) con ulteriore aumento di calcio e produzione di ROS e acidi grassi liberi che a loro volta favoriscono l'apertura del canale (Starkov *et al*, 2004; Scorrano *et al*, 2001). Questo induce un accumulo di soluti nella matrice mitocondriale con aumento di volume e rottura della membrana esterna con il conseguente rilascio del Cyt C, contenuto nello spazio intermembrana (Green and Kroemer, 2004) (FIG 13A), nel citoplasma.

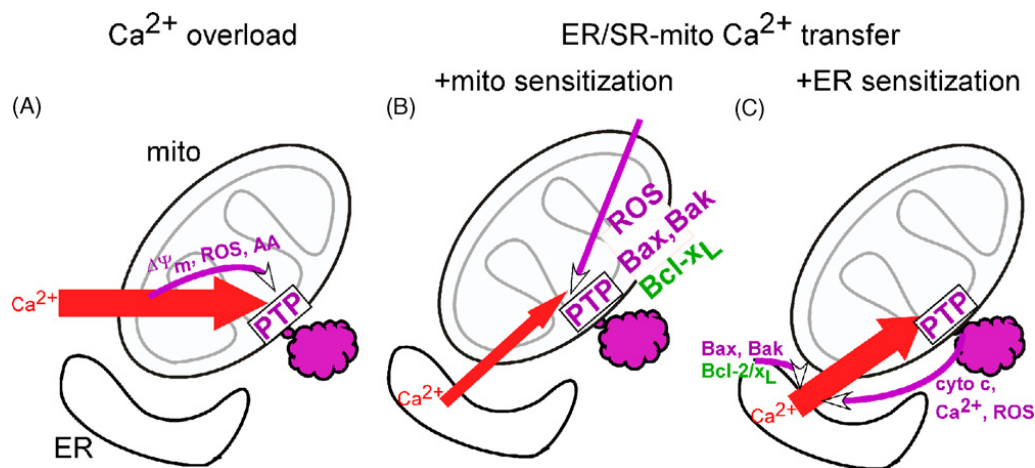


FIG 13: Schema che illustra i possibili meccanismi che inducono accumulo eccessivo di calcio nel mitocondrio (Hajnoczky *et al*, 2006).

Alcuni lavori sostengono la possibilità che concentrazioni fisiologiche di calcio mitocondriale possano indurre la permeabilizzazione della membrana portando a morte cellulare per apoptosi (FIG 13B) (Szalai *et al*, 1999; Pacher and Hajnoczky, 2001). L'apertura del canale richiede la simultanea presenza di oscillazioni della concentrazione di calcio mitocondriale e di stimoli apoptotici che abbassano la soglia di attivazione del PTP Ca^{2+} -dipendente.

Sulla base della complessa interazione tra i recettori IP3 e il riassorbimento mitocondriale, il rilascio di Ca^{2+} dal ER evoca evidenti cambiamenti nella concentrazione del calcio mitocondriale (FIG 13C) più di quelli che avvengono a livello citoplasmatico (Csordas *et al*, 1999). Inoltre il Cyt C presenta un legame ad alta affinità per il recettore IP3 che blocca l'inibizione Ca^{2+} -dipendente dell'efflusso del calcio dal recettore (Boehning *et al*, 2003). Quindi si crea un meccanismo a cascata secondo cui il rilascio di Cyt C nella fase iniziale dell'apoptosi induce ulteriore liberazione di calcio dal ER con conseguente aumento di calcio mitocondriale. Sulla membrana del ER è stata dimostrata anche la presenza di Bax e Bak, fattori anti-apoptotici che regolano l'uscita e l'immagazzinamento di calcio nel ER (Scorrano *et al*, 2003). In presenza di stimoli apoptotici Bax/Bak sopprimono l'interazione tra IP3R e il fattore anti-apoptotico Bcl-2 che controlla la fuoriuscita di calcio dal ER (Oakes *et al*, 2005).

I Recettori metabotropici del glutammato

I recettori metabotropici del glutammato (mGluRs) fanno parte della classe di recettori associati a proteine G. Nel corso degli anni sono stati clonati otto sottotipi di mGluRs sulla base di omologie nella sequenza aminoacidica, di risposte farmacologiche e del secondo messaggero coinvolto (Conn and Pin, 1997).

Possono essere divisi in tre gruppi: gruppo I (mGluRs 1 e 5), gruppo II (mGluRs 2 e 3) e il gruppo III (mGluRs 4, 6, 7 e 8). I recettori del gruppo I sono principalmente accoppiati alla famiglia di proteine G eterotrimeriche q/11, che attivano la fosfolipasi C e il conseguente incremento di calcio intracellulare. I recettori del gruppo II e del gruppo III sono invece associati alla famiglia G i/o, che regola negativamente l'adenilato ciclato e la produzione di AMP ciclico (FIG 14). Gli mGluRs del gruppo

II e III possono incrementare la corrente del potassio e diminuire le correnti calciche (Conn and Pin, 1997; Marino *et al*, 2003).

I tre sottogruppi degli mGluRs sono ampiamente distribuiti nei circuiti dei nuclei della base, dove modulano la trasmissione sinaptica attraverso meccanismi pre e postsinaptici (Conn *et al*, 2005). In generale il gruppo I è localizzato negli elementi postsinaptici, e media effetti eccitatori, mentre il gruppo II e III sono localizzati a livello presinaptico e modulano il rilascio di neurotrasmettitore, agendo da auto- o eterorecettori (Galvan *et al*, 2006). Sia il gruppo II che il gruppo III sono stati trovati nei terminali glutammatergici dello striato (Tamaru *et al*, 2001) e della SNr (Bradley *et al*, 2000). Entrambe queste famiglie di recettori regolano il rilascio di glutammato alle sinapsi eccitatorie cortico-striatali (Calabresi *et al*, 1992; Pisani *et al*, 1997) e subtalamo-nigrali (Bradley *et al*, 2000). Evidenze elettrofisiologiche indicano inoltre che gli mGluRs del gruppo III inoltre agiscono come eterorecettori che modulano il rilascio di GABA nello striato, nel globo pallido e nella sostanza nera (Wittmann *et al*, 2001; Valenti *et al*, 2003).

I neuroni della SNc esprimono sia gli mRNA che le proteine recettoriali di entrambi i sottotipi del gruppo I (mGluR1 e 5; Testa *et al*, 1994 e 1998).

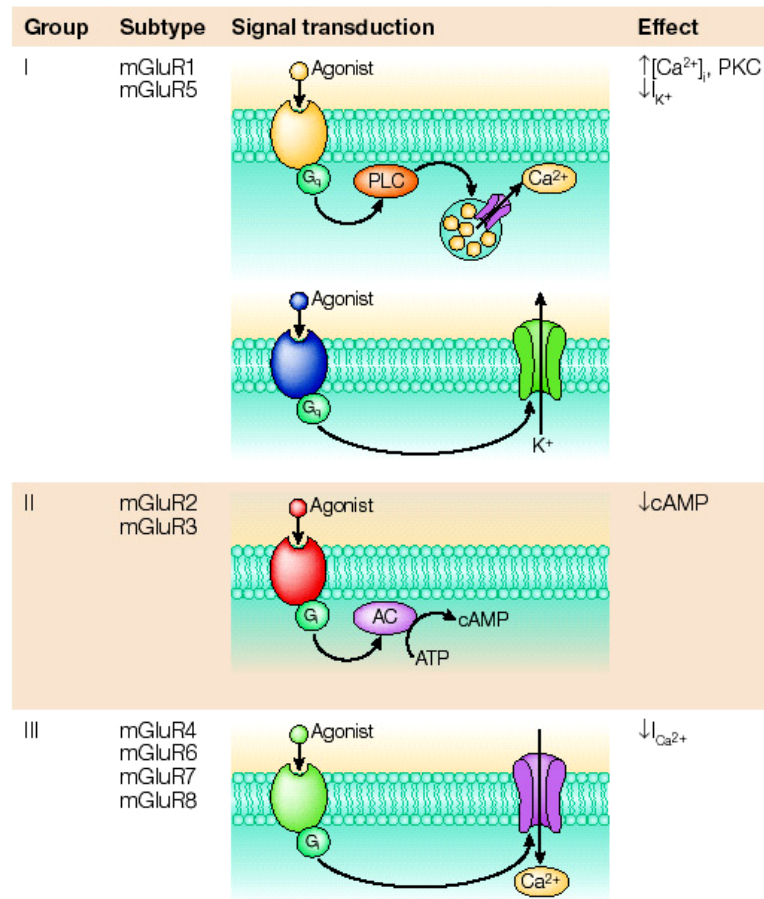


FIG 14: Schema riassuntivo delle famiglie dei recettori metabotropici del glutammato (Conn *et al*, 2005).

Eccitotossicità indotta dal glutammato nel PD

Numerosi studi di anatomia e di elettrofisiologia hanno dimostrato l'esistenza di una proiezione eccitatoria glutammatergica diretta tra il STN e la SNc (Smith *et al*, 1992 e 1996; Iribe *et al*, 1999) che diventa iperattiva durante la malattia di Parkinson come conseguenza della deplezione dopaminergica striatale.

E' stato quindi ipotizzato che l'aumento di rilascio di glutammato nei neuroni dopaminergici dai terminali subtalami ci possa contribuire alla degenerazione progressiva del sistema nigrostriatale attraverso il processo noto come "eccitotossicità indotta dal glutammato" (Rodriguez *et al*, 1998; Blandini 2001).

Agenti farmacologici che modulano negativamente la trasmissione glutammatergica nei gangli della base potrebbero essere quindi alla base di nuove strategie terapeutiche per la cura del morbo di Parkinson (Nicoletti *et al*, 1996).

A supporto di questa ipotesi, molti studi hanno dimostrato un'azione neuroprotettiva di antagonisti ionotropici dei recettori NMDA in modelli sperimentali di PD (Turski *et al*, 1991; Sonsalla *et al*, 1998; Blandini 2001). Tuttavia l'utilità clinica di questi composti è limitata dai loro effetti collaterali e dallo sviluppo di difetti cognitivi e motori (Muir, 2006).

Poiché l'attivazione degli mGluR1 dal glutammato endogeno o da specifici agonisti induce depolarizzazione dei neuroni dopaminergici (Fiorillo and Williams, 1998; Wigmore and Lacey, 1998; Guatteo *et al*, 1999) e, se prolungata, promuove numerosi processi che inducono a morte cellulare per eccitotossicità (Salinska *et al*, 2005), si è postulata l'ipotesi che anche questi recettori possano essere alla base della neurodegenerazione.

Alcuni importanti studi hanno infatti dimostrato che gli antagonisti dei recettori metabotropici di gruppo I come l'LY367385 e l'MPEP avevano effetti neuroprotettivi dose-dipendenti in animali lesionati con 6-OHDA o MPTP (Vernon *et al*, 2005 e 2007; Aguirre *et al*, 2001). La neuroprotezione, che si manifestava come mantenimento dell'integrità del corpo cellulare e dei terminali striatali delle cellule dopaminergiche, avveniva non solo quando gli antagonisti venivano applicati prima della lesione ma anche in animali già lesionati e, quindi, che già manifestavano la malattia, con importanti ripercussioni a livello clinico (Vernon *et al*, 2007; Armentero *et al*, 2006).

Inoltre a livello intracellulare l'attivazione dei recettori mGluR induce produzione di IP3 con successivo rilascio di calcio dal ER e, quindi, attivazione mitocondriale. Infatti è stato dimostrato che, contemporaneamente all'aumento di calcio citosolico, si ha un incremento della concentrazione mitocondriale di calcio (Rizzuto *et al*, 1993). Il complesso e delicato equilibrio che regola la funzionalità mitocondriale con il contenuto di calcio può essere facilmente posto alla base dei fenomeni apoptotici evidenziati nelle malattie neurodegenerative.

MATERIALI E METODI

Preparazione di fettine di mesencefalo di ratto

Per la preparazione del tessuto mesencefalico sono stati sacrificati ratti albini Wistar di ambo i sessi di un'età compresa tra i 18 e i 25 giorni.

Gli animali sono stati anestetizzati attraverso l'inalazione di alotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1, trifluoroetano, Sigma) per alcuni minuti e poi sacrificati in accordo con le direttive del Comitato Etico dell'università di Roma "Tor Vergata" sull'uso degli animali nella Ricerca.

L'encefalo, rapidamente esportato dalla scatola cranica, viene immerso in una soluzione di liquido cerebrospinale artificiale (ACSF) composta da (in mM): NaCl 126; KCl 2.5; MgCl₂ 1.2; CaCl₂ 2.4; NaH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 24; glucosio 10; saturata al 95% O₂, 5% CO₂ (pH 7.4) e mantenuta ad una temperatura di 8-12°C.

Per mezzo di un vibratomo (Leica VT 1000) vengono eseguite sezioni orizzontali di 250 micrometri a partire dalla superficie ventrale dell'encefalo che includono la regione della sostanza nera.

Dopo aver fatto recuperare il tessuto in un bagnetto riempito di ACSF e mantenuto alla temperatura di 34°C per circa 1h, una fettina per volta viene trasferita nella cameretta di registrazione e completamente sommersa dall'ACSF, saturato con una miscela di 95% O₂ e 5% CO₂, che fluisce in continuo ad una velocità di circa 3 ml/min (33-34°C, pH 7.4). La cameretta è montata sul tavolino di un microscopio (Olimpus BX51WI) connesso ad una telecamera (TILL photonics IMAGO), che trasferisce l'immagine al pc, e ad un monocromatore (Polychrome IV), che fornisce la lunghezza d'onda desiderata.

Registrazioni di patch clamp

La tecnica del “patch-clamp” è stata ideata nel 1976 da Neher e Sakmann per la registrazione delle correnti di singoli canali ionici (Neher and Sakmann, 1976). Questa tecnica utilizza un elettrodo di vetro borosilicato opportunamente preparato per mezzo di un “puller”, uno strumento dotato di una resistenza circolare che, surriscaldandosi, provoca l’assottigliamento del capillare di vetro. Varando l’intensità del riscaldamento si varia il diametro della punta dell’elettrodo e, quindi, la sua resistenza.

L’elettrodo viene riempito con una soluzione isoosmotica con il citoplasma della cellula (“soluzione intracellulare”) e collegato ad un amplificatore mediante un supporto (“holder”) contenente un filo di argento cloruro che si immerge nella soluzione di riempimento dell’elettrodo, per mantenere la continuità elettrochimica.

La punta della pipetta viene appoggiata delicatamente sulla membrana cellulare, aderendovi strettamente per formare una saldatura, detta *seal*, tale da isolare elettricamente l’ambiente interno all’elettrodo dal liquido extracellulare. La formazione di un buon *seal* è facilitata da una debole suzione tramite un tubicino di silicone collegato al microelettrodo. La qualità del *seal* può essere misurata elettricamente dalla resistenza al flusso di corrente dall’interno all’esterno dell’elettrodo, che deve raggiungere valori di almeno 1-10 Giga Ω (10^9 - 10^{10} Ohm).

La formazione del *seal* e la successiva rottura del tassello di membrana che sottende alla punta dell’elettrodo permette di ottenere una configurazione cosiddetta di *whole-cell*, così che si ottiene una continuità diretta tra il contenuto della cellula e quello dell’elettrodo. In queste condizioni si possono misurare le correnti elettriche dell’intera cellula e si possono introdurre sostanze, farmaci o enzimi all’interno della cellula usando l’elettrodo stesso.

I neuroni dopaminergici della sostanza nera oggetto del presente studio sono stati inizialmente identificati visivamente mediante un sistema ottico costituito da un microscopio (Olimpus BX51WI) fornito di obiettivi 4X e 40X (ad immersione). La luce infrarossa viene ottenuta filtrando opportunamente la luce bianca fornita da una lampada alogena e l’immagine a contrasto interferenziale-differenziale (infra-red differential interference contrast, IR-DIC) della fettina viene raccolta da una telecamera (CCD camera) (TILL photonics IMAGO) montata sul microscopio e

convertita sul monitor di un personal computer per visualizzare la regione che include MT, SN e VTA (FIG 1).

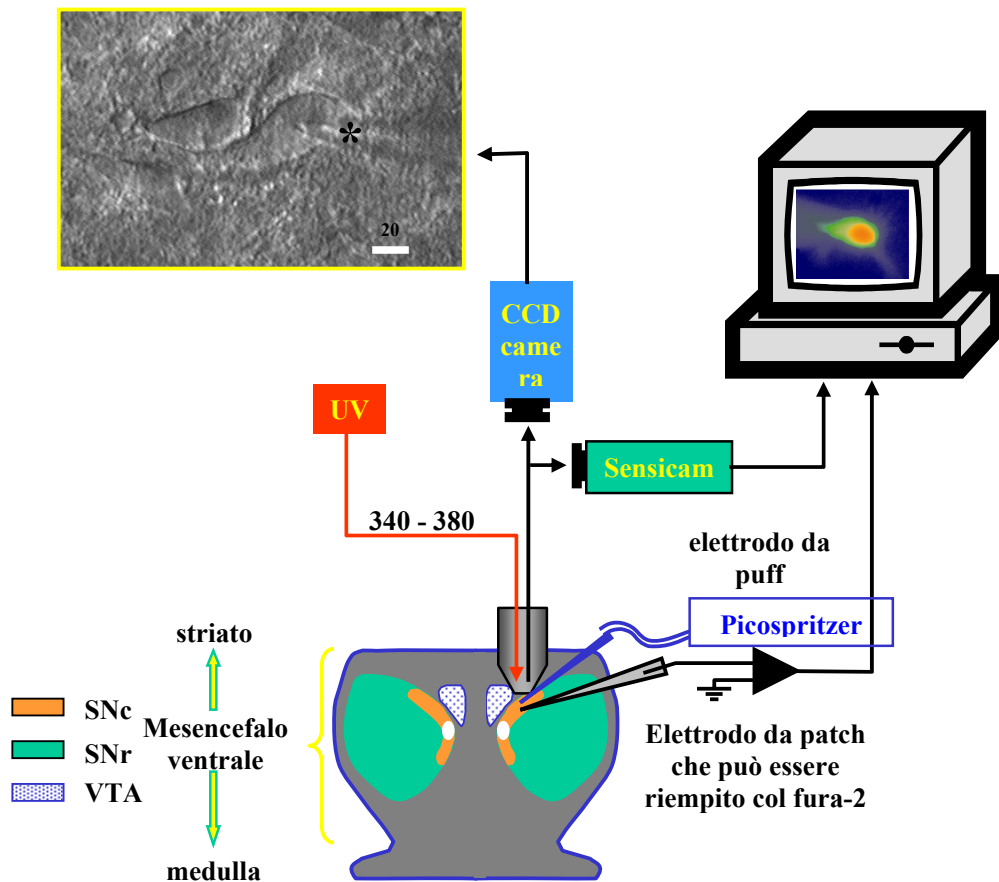


FIG 1: Rappresentazione schematica di una postazione (“set-up”) di elettrofisiologia associata alla microfluorimetria. E’ mostrata una fetтина di sostanza nera e il sistema di elettrodi di registrazione e da puff.

I neuroni dopaminergici sono localizzati in prossimità del nucleo medio terminale (MT) del tratto ottico accessorio e presentano una tipica conformazione fusiforme con lunghi dendriti prossimali poco ramificati .

Le registrazioni in “whole-cell” dei segnali bioelettrici sono state effettuate per mezzo di un amplificatore (Axopatch 200B, Axon Instrument) collegato ad una interfaccia analogico/digitale (Digidata 1322A -Axon Instruments) e poi acquisite ed analizzate attraverso un personal computer usando i software pClamp e Axoscope (Molecular Device, Axon Instruments, Union City, CA, USA).

Gli elettrodi di borosilicato (WPI, Sarasota, FL, USA) con resistenza di 3-5 M Ω sono stati riempiti con una soluzione intracellulare composta da (in mM): K-gluconate (115); CaCl₂ (4), MgCl₂ (2), KCl (10), EGTA (10), Hepes (10), Mg₂-ATP (2), Na₃-GTP (0.3) ; pH portato a 7.3 con KOH (280 mOsm). Per gli esperimenti di microfluorimetria, la concentrazione di K-gluconate è stata portata a 135 mM, quella del calcio a 0.1 mM, quella dell'EGTA a 0.75 mM ed è stata aggiunta alla soluzione intracellulare Fura-2 pentopotassium salt (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) alla concentrazione 0.25 mM.

Tutte le registrazioni in “voltage clamp” avevano un potenziale di holding di -60 mV.

I neuroni dopaminergici e quelli GABAergici sono stati identificati elettrofisiologicamente sulla base di alcune proprietà distintive (Grace e Onn, 1989): i primi presentano una prominente corrente I_h in risposta a gradini di potenziale iperpolarizzanti, un potenziale *sag* quando in un modalità “current-clamp” vengono applicate degli steps di corrente negativa, hanno una frequenza di firing di circa 1-3 Hz e rispondono con una tipica risposta iperpolarizzante all'applicazione di dopamina (10-30 μ M); i secondi presentano un modesto potenziale sag e corrente I_h in risposta a gradini di corrente e potenziale iperpolarizzanti, hanno una frequenza di “firing” > 10 Hz ed inoltre sono insensibili alla dopamina (Lacey *et al*, 1987, 1988, 1989; Mercuri *et al*, 1995).

I dati presentati nelle Figure 1, 2A, 7 e 8 sono stati ottenuti applicando la BMAA a tutta la fettina mediante la soluzione di perfusione, alle concentrazioni indicate. I dati rappresentati in tutte le altre Figure sono stati ottenuti applicando la BMAA 3 mM (e quando indicato il glutammato 10 mM) mediante un dispositivo a pressione (Pneumatic Pico-pump PV 800, WPI, Berlin, Germany) collegato ad una pipetta di borosilicato (resistenza di circa 1 M Ω) riempita con la BMAA o glutammato disciolti in ACSF e posizionata nelle immediate vicinanze della sola cellula registrata (FIG 1). Tale applicazione tramite pressione è stata usata per ottenere una corrente rapida e riproducibile. Inoltre, per limitare le variabili tra i diversi esperimenti l'elettrodo da puff è stato mantenuto sempre alla stessa distanza dal neurone registrato.

Microfluorimetria

L'indicatore fluorescente Fura-2 viene inserito all'interno della cellula attraverso l'elettrodo di registrazione ed eccitato con luce ultravioletta fornita da una lampada allo Xenon (75W), alla lunghezza d'onda desiderata (340 e 380 nm) mediante un monocromatore. La luce raggiunge il preparato attraverso un obiettivo ad immersione 40X (FIG 1). La fluorescenza di emissione passa attraverso un filtro che taglia le lunghezze d'onda al di sotto di 510 nm. Le immagini sono state raccolte da una fotocamera CCD (Photonic Science, Millham, UK) ad un intervallo di 2 secondi. Le variazioni di fluorescenza sono state calcolate per ciascuna immagine da una regione del neurone che include il corpo cellulare (soma) e sono state corrette sottraendo la fluorescenza aspecifica della zona intorno al neurone ("background", bg) (Ion Vision software, ImproVision).

Il calcio intracellulare è stato espresso come rapporto, $R = (F_{340\text{soma}} - F_{340\text{bg}}) / (F_{380\text{soma}} - F_{380\text{bg}})$, dove F_{340} e F_{380} sono rispettivamente la fluorescenza emessa se il neurone è eccitato a 340 nm o a 380 nm, per il soma e per il "background". Il Fura2 emette maggiormente quando eccitato a 380 nm, mentre il complesso Fura2-Calcio emette maggiormente quando eccitato a 340 nm. Pertanto, quando la concentrazione citosolica di calcio è bassa è maggiore la fluorescenza a 380 ($R < 1$), mentre quando aumenta la concentrazione di calcio e quindi del complesso Fura2-Calcio aumenta la fluorescenza a 340 nm ($R > 1$). Poiché alla lunghezza d'onda di 340 nm viene selettivamente eccitato il che aumenta in numero con l'aumento del calcio citosolico, un aumento della fluorescenza emessa quando il neurone è eccitato a 340 nm produce un aumento di R e quindi indica un aumento del calcio intracellulare. Viceversa, poiché a 380 nm viene maggiormente eccitato il Fura2 libero, non legato al calcio, che aumenta in presenza di basso calcio intracellulare, un aumento della fluorescenza emessa quando il neurone è eccitato a 380 nm produce una diminuzione di R e, quindi, indica una diminuzione del calcio citosolico.

Immunoistochimica e microscopia confocale

La preparazione delle fettine era identica a quella descritta per le registrazioni elettrofisiologiche. Dopo la dissezione, le fettine venivano trasferite in una cameretta e lasciate recuperare per 30 min (33°C) in ACSF saturato con una miscela di O₂/CO₂. Seguendo un protocollo già descritto dal nostro gruppo (Geracitano R. *et al*, 2005) le fettine sono state divise in 6 gruppi: il primo gruppo (controllo) era costituito da fettine mantenute per 1h in standard ACSF saturato con O₂/CO₂; il secondo gruppo (BMAA) era incubato per 1h in una soluzione di BMAA (3 mM) disciolta in ACSF saturata con O₂/CO₂; il terzo, il quarto e il quinto gruppo sono stati trattati per 1h con la soluzione di BMAA contenente anche CNQX (10 µM) o CPCOEt (100 µM) o JNJ 16259685 (1 µM) rispettivamente; il sesto gruppo era costituito da fettine trattate 1h con una miscela di BMAA, CNQX e JNJ. Dopo il trattamento, le fettine da tutti e 6 i gruppi, mantenute separate, venivano fatte recuperare per 4h in standard ACSF ossigenato e poi fissate in una soluzione di paraformaldeide al 4% per 24h a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi in tampone fosfato (PB) pH 7.5 le fettine sono state trasferite in una soluzione di saccarosio al 30 % a 4°C. Successivamente le fettine sono state tagliate in sezioni orizzontali di 35 µm di spessore usando un microtomo congelatore e raccolte in PB. Le sezioni così ottenute sono state processate per doppia immunofluorescenza utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la tirosina idrossilasi (TH; 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), e un anticorpo monoclonale diretto contro il citocromo-c (Cyt C; 1:100; Promega, Madison, WI, USA). Le sezioni sono state incubate per 24h a temperatura ambiente con gli anticorpi primari in PB+0.3% Triton X-100. Dopo 3 sciacqui in PB le stesse sono state incubate con anticorpi secondari coniugati con le cianine (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA): Cy3-coniugato donkey-anti mouse per la TH e Cy2-coniugato donkey anti-goat per il Cyt C. Dopo tre sciacqui in PB, le sezioni sono state montate su vetrini polilisinati, disidratati e chiusi con una soluzione di Gel-Mount. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale a scansione laser SP5 (Leica; Germania). Le tavole sono state generate modificando in contrasto e la luminosità delle immagini digitali utilizzando Corel Draw, 9.

Farmaci

Tutti i farmaci sono applicati in bagno, eccetto negli esperimenti in cui è indicata l'applicazione attraverso pressione della BMAA e del Glutammato. Questi includono CNQX, JNJ 16259685, SKF 96365, CPCCOEt, Rutenium Red, MPEP, DL-TBOA, APV, MK-801 acquistati dalla Tocris Cookson Ltd (Bristol, UK) e Dopamine e L-BMAA acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia).

Analisi dei dati

Le osservazioni qualitative e quantitative per i dati di immunoistochimica sono state limitate alla SNC, la quale è stata delimitata a livello anatomico facendo riferimento alle caratteristiche morfologiche del nucleo nonché alla delimitazione della struttura dal nucleo terminale mediale del tratto ottico. Per ogni fettina sono state prese in considerazione 4 sezioni e per ogni gruppo sperimentale sono stati processati 5 fettine. Solo i neuroni immunoreattivi per TH and Cyt C con il nucleo sul piano focale sono stati analizzati e contati utilizzando una griglia quadrata di 500 μm di lato per delimitare l'area di conta. La conta delle cellule è stata eseguita off-line sulle immagini precedentemente acquisite con il confocale SP5 usando un obiettivo 20x con un fattore di zoom 0.7.

Le caratteristiche delle cellule immunopositive per i due marcatori utilizzati sono state analizzate ingrandendo di volta in volta l'area selezionata per la conta ed escludendo di volta in volta un canale (verde o rosso) del laser. I neuroni singolarmente e doppiamente marcati sono stati contati, registrati e conservati in un archivio dati. Per ogni gruppo sperimentale i seguenti dati sono stati presi in considerazione: il numero totale dei neuroni TH immunoreattivi, il numero totale dei neuroni Cyt C positivi e la percentuale dei neuroni TH positivi che presentavano anche positività per il Cyt C.

Per gli esperimenti di elettrofisiologia l'analisi dei dati è stata effettuata usando Clampfit (pClamp, Axon Instrument) e il software Origin 6.1 (Microcal, Northampton, MA, USA). I dati sono espressi come media \pm S.E.M.e paragonate usando lo Student's *t* test, con $p < 0.05$ come valore minimo di significatività.

SCOPO DELLA RICERCA

E' sempre più accettata l'ipotesi secondo cui malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson siano causate dall'azione concomitante di diversi fattori, tra i quali quelli ambientali occupano un posto rilevante.

Negli ultimi 10 anni è cresciuto sempre di più l'interesse per un aminoacido non proteico trovato nei semi della *Cycas micronesica* che sembra essere alla base dell' "ALS-PDC complex", una sindrome complessa caratterizzata da sintomatologie cliniche tipiche della sclerosi laterale amiotrofica (SLA), del morbo di Parkinson e dell'Alzheimer.

Se prima il fenomeno sembrava essere confinato ad alcune aree del Pacifico Sud-Ovest, oggi sono sempre più numerose le dimostrazioni sulla larga diffusione nel mondo della BMAA.

Sulla base di tutte queste considerazioni abbiamo voluto analizzare gli effetti di questo aminoacido sulle cellule dopaminergiche della SNc da un punto di vista elettrofisiologico, farmacologico, morfologico e tossicologico. I risultati di questo studio dimostrano che l'BMAA presenta un'azione "glutamate-like" sia sugli interneuroni GABAergici che sui neuroni dopaminergici della SNc. Tuttavia, mentre nei primi si comporta da agonista dei recettori AMPA e non evoca, contemporaneamente alla corrente entrante, un aumento di calcio, nei secondi attiva prevalentemente i recettori metabotropici di gruppo I, tipo 1 (mGluR1) e la corrente entrante è associata a significativi aumenti di calcio intracellulare mediati dall'apertura dei canali SOCs/TRPC.

Quindi l'azione tossica della BMAA sulle cellule dopaminergiche è mediata dall'attivazione dei recettori glutammatergici. Una chiara dimostrazione di questo deriva dal fatto che gli antagonisti dei recettori ionotropici e metabotropici del glutammato sono in grado di revertire l'insulto tossico mediato dalla tossina.

Nonostante la somiglianza strutturale tra l'acido glutammico e la BMAA, quest'ultima non viene ricaptata dalla cellule dopaminergiche attraverso il trasportatore degli aminoacidi eccitatori EAAT.

Questa tesi quindi dà un'indicazione clinica dell'effetto tossico che la BMAA potrebbe esercitare nel cervello dei pazienti affetti dall' "ALS-PDC complex" e sottolinea l'importanza dell'eccitotossicità glutammatergica nello sviluppo del morbo di Parkinson.

RISULTATI

Azione della BMAA sulle proprietà di membrana dei neuroni dopaminergici della SNc

In modalità *current-clamp*, per studiare l'attività tonica spontanea di scarica dei potenziali d'azione (Grillner and Mercuri, 2002), l'applicazione nel mezzo extracellulare della BMAA a diverse concentrazioni (0.1, 0.3, 1, 3, 10 mM) induceva una depolarizzazione di membrana, rapida e reversibile e un aumento della frequenza di firing spontaneo seguendo un profilo dose-risposta (FIG 1E e F). Nella Figura 1 pannelli A, B, C e D, sono mostrate le tracce ottenute da diversi neuroni ai quali sono state applicate le diverse concentrazioni di BMAA. Per le concentrazioni più elevate (1, 3 e 10 mM) sono mostrate anche le variazioni della frequenza di "firing" del neurone indotte dalla BMAA relative al tracciato sottostante. Si noti come alle più alte concentrazioni testate (3 e 10 mM, pannelli C e D), l'iniziale aumento di "firing" era seguito da una riduzione (3 mM) o interruzione (10 mM) della scarica di potenziali d'azione. Ciò era dovuto alla sostanziale depolarizzazione indotta dalla tossina che causava l'inattivazione dei canali di sodio voltaggio-dipendenti.

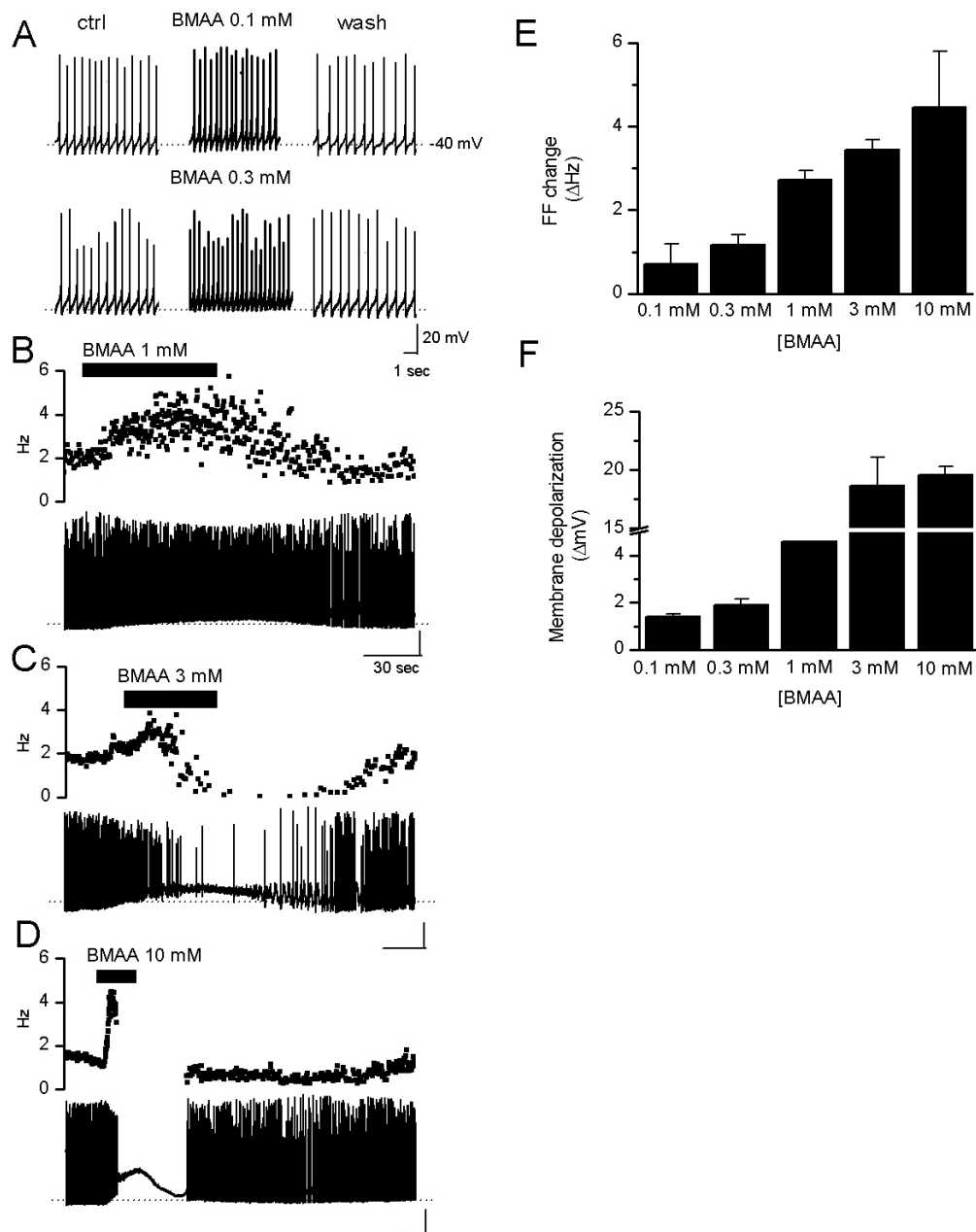


FIG 1: Depolarizzazione dei neuroni dopaminergici della SNc indotta dalla applicazione in bagno della BMAA. A, traccia registrata da un neurone dopaminergico dopo esposizione alla BMAA 0.1 (traccia in alto) e 0.3 (traccia in basso) mM. Si nota un aumento reversibile della frequenza di firing spontaneo. B,C,D, tracce registrate da neuroni esposti alla BMAA 1, 3 e 10 mM rispettivamente. In alto è mostrata la variazione della frequenza di firing (Hz) riferita allo stesso tracciato mostrato in basso. Si ha un evidente effetto depolarizzante della BMAA e un diminuzione (per le concentrazioni 1 e 3 mM) o blocco (per la concentrazione 10 mM) della frequenza di firing. E, F istogramma del cambiamento della frequenza di firing e della depolarizzazione di membrana, rispettivamente (media \pm S.E.M). Si noti come l'applicazione della BMAA in bagno determini un aumento concentrazione-dipendente della frequenza di firing e del potenziale di membrana.

In modalità *voltage-clamp*, la BMAA (0.1, 0.3, 1, 3, 10 mM) induceva una corrente entrante dose-dipendente (FIG 2A e B). Spesso, per le concentrazioni più alte (in particolare 3 e 10 mM), le correnti entranti erano seguite da correnti uscenti dovute all'attivazione dei canali del K^+ - Ca^{2+} attivati (Fiorillo and Williams, 1998).

Poiché quando applicata nel mezzo di perfusione la BMAA non induceva correnti di ampiezza riproducibile dopo applicazioni successive, abbiamo deciso di applicare la sostanza solo in prossimità della cellula registrata mediante un elettrodo riempito della sostanza stessa (3 mM) (10 psi, 0.5-1.0 s). Applicazioni rapide di BMAA evocavano una corrente media di 454.48 ± 34.65 pA (n=73) (FIG 2C)

La concentrazione usata è 3 mM in quanto era l'unica in grado di evocare delle correnti inward di ampiezza sufficientemente grande da poter essere studiate (FIG 2B). Per tutti gli esperimenti l'elettrodo da puff era posizionato ad una distanza costante dal neurone registrato.

Gli esperimenti che seguiranno, se non specificatamente indicato, saranno condotti applicando la BMAA attraverso l'elettrodo da puff ad una concentrazione di 3 mM.

La corrente entrante indotta dalla BMAA era associata ad un aumento medio del calcio citosolico di 0.368 ± 0.062 R (n = 13) (FIG 2C, pannello in basso). L'aumento di calcio era transiente, reversibile (FIG 2D, pannello in alto) e significativo rispetto al valore basale (pre-puff) (FIG 2D, pannello in basso) (da $0,40 \pm 0,019$ a $0,731 \pm 0,079$, $p < 0.001$ paired *t* test, n = 13).

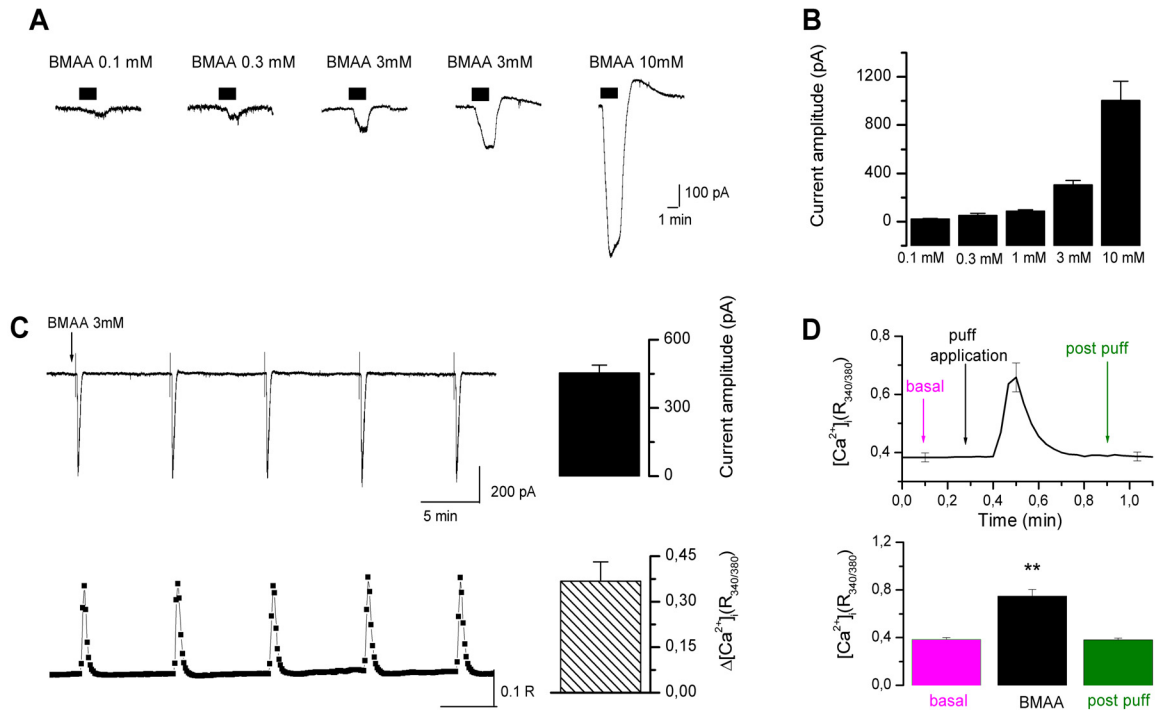


FIG 2: Correnti entranti indotte dall'applicazione della BMAA nel mezzo di perfusione e tramite "puff". A, B Dose-dipendenza dell'ampiezza delle correnti evocate dalla BMAA alle concentrazioni di 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mM. Le concentrazioni più elevate (3 e 10 mM) evocano correnti uscenti successive allo sviluppo di quelle entranti. C, tracciato che mostra la riproducibilità delle correnti (in alto) e delle contemporanee variazioni di calcio (in basso) evocate dall'applicazione tramite "puff" della BMAA (3 mM). L'ampiezza media delle correnti è di 454.48 ± 34.65 pA ($n=73$) (media \pm S.E.M.), quella del calcio è di 0.368 ± 0.062 R ($n = 13$) (media \pm S.E.M.). D, pannello in alto, tracciato medio ($n = 7$) della variazione di calcio prima (livello basale), durante e dopo l'applicazione della BMAA tramite "puff". Si noti come l'aumento di calcio è reversibile. D, in basso, istogramma che mostra la $[Ca^{2+}]_i$ basale, in presenza di BMAA e dopo il lavaggio. I valori di calcio prima (basal) e dopo (post puff) l'applicazione della BMAA non sono significativamente diversi, mentre lo è l'aumento indotto dalla BMAA (da $0,40 \pm 0,019$ a $0,731 \pm 0,079$) rispetto al valore basale.

** , $0.001 < p > 10^{-5}$.

Il coinvolgimento del trasportatore EAA nelle correnti indotte dalla BMAA

E' stato precedentemente dimostrato che la BMAA, in presenza di carbonato, si trasforma in un derivato β - carbammato che è isosterico con il glutammato (Myers e Nelson, 1990). Ciò ha fatto ipotizzare che l'attività eccitatoria della BMAA fosse simile a quella di un aminoacido eccitatorio (EAA). Sulla base di questa considerazione abbiamo voluto verificare se la BMAA fosse un substrato per il trasportatore degli EAA (EAATs) nei neuroni dopaminergici.

Abbiamo quindi paragonato l'effetto di un potente inibitore degli EAATs, DL-TBOA (100 μ M) sulle correnti entranti indotte dalla BMAA e dal glutammato (10 mM) (FIG 3A e B), utilizzando quest'ultimo come controllo positivo. Entrambi gli agonisti sono stati applicati mediante "puff". Il DL-TBOA aumentava significativamente l'ampiezza (448 ± 18.58 % del controllo, $p < 0.01$ one population t test, $n = 3$) e l'area (753 ± 127.1 % del controllo, $p < 0.05$ one population t test, $n = 3$) delle correnti indotte dal glutammato (FIG 3C e D, barra bianca), mentre non modificava significativamente gli stessi parametri delle correnti evocate dalla BMAA (90.6 ± 8.67 % del controllo, $p = 0.3$ one population t test, $n = 6$; 101.83 ± 7.27 % del controllo, $p = 0.8$ one population t test, $n = 6$, rispettivamente) (FIG 3C e D, barra nera).

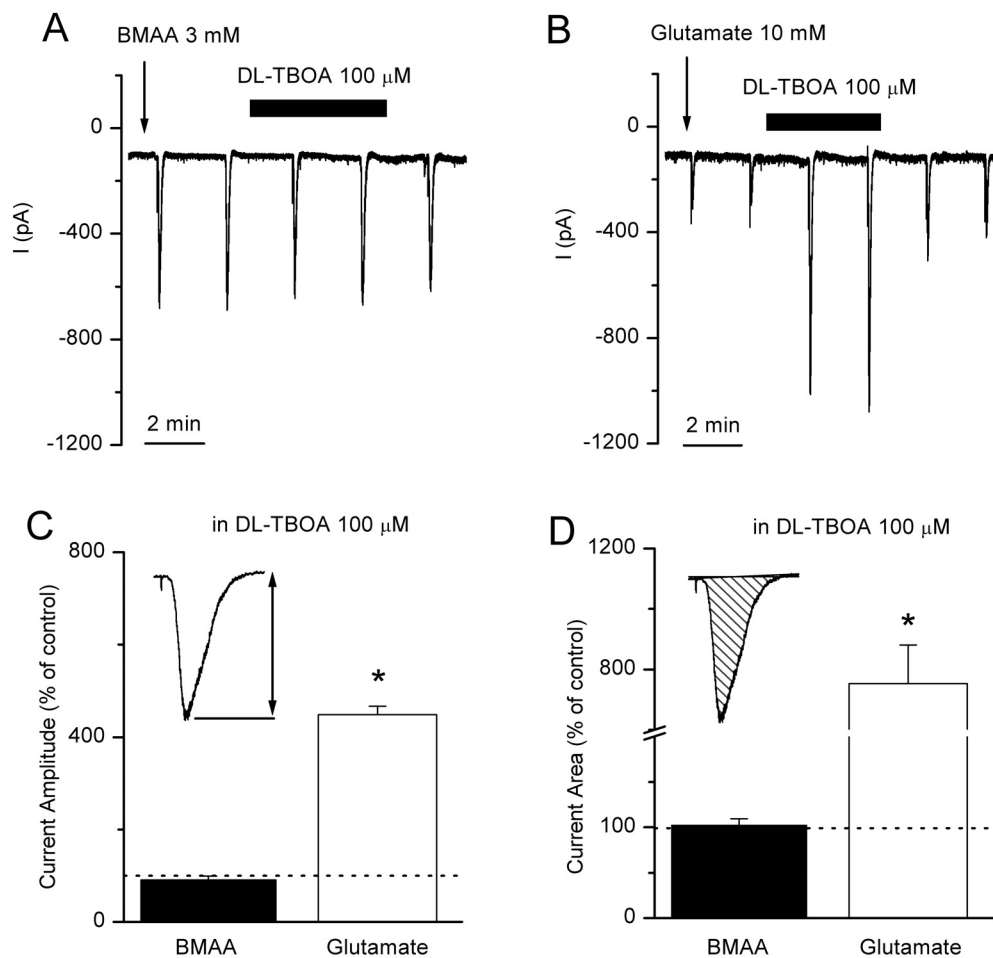


FIG 3: La BMAA non è un substrato degli EAATs. A, B tracciati delle correnti entranti in due neuroni dopaminergici a cui vengono applicati ripetutamente tramite "puff" la BMAA (3 mM, pannello A) e il glutammato (10 mM, pannello B). L'applicazione del DL-TBOA modifica notevolmente l'ampiezza delle correnti indotte dal glutammato ma non di quelle indotte dalla BMAA. C, D, istogramma indicante rispettivamente l'ampiezza della corrente e l'area sottesa dalla curva (come mostrato nell'inserto), espresse come percentuale del controllo (media \pm S.E.M).
 * $0.05 < p < 0.001$

La BMAA attiva i recettori del glutammato

L'attività della BMAA come agonista glutammatergico è già stata ampiamente dimostrata in neuroni di diverse aree cerebrali (Allen *et al*, 1993; Staton and Bristow, 1997; Pai *et al*, 1993; Spencer *et al*, 1987b; Lobner *et al*, 2007; Buenz and Howe, 2007; Rao *et al*, 2006) ma uno studio dettagliato del suo effetto sui neuroni dopaminergici non è ancora disponibile. Per questo motivo, abbiamo paragonato l'effetto della BMAA (3 mM, FIG 4A e B) e del glutammato (300 μ M, FIG 4C e D1-2) su tali neuroni, analizzando il contributo dei recettori glutammatergici ionotropici e metabotropici alle correnti indotte dai due agonisti.

La corrente indotta dalla BMAA era altamente ridotta dall'antagonista selettivo dei recettori metabotropici di gruppo I, tipo 1 (mGluR1) CPCCOEt (100 μ M) (41.56 ± 3.61 % del controllo, $p < 10^{-5}$ one population *t* test, $n = 24$) (FIG 4A e B). In 3 cellule abbiamo testato l'efficacia di un nuovo potente e selettivo antagonista del recettore mGluR1, il JNJ 16259685 (1 μ M) (Lavreysen *et al*, 2004). Questo bloccante riduceva le correnti indotte dalla BMAA del 97 ± 3.22 % rispetto al controllo ma il suo effetto non era revertito entro 1h di registrazione, per cui era poco adatto a studi di farmacologia (dati non mostrati). Anche il CNQX (10 μ M), antagonista selettivo dei recettori AMPA, produceva una riduzione piccola ma significativa della corrente evocata dalla BMAA ($93,09 \pm 1,97$ % del controllo, $p < 0.01$ one population *t* test, $n = 24$). Gli altri recettori glutammatergici (NMDA e mGluR5) non erano coinvolti nella generazione della corrente entrante indotta dalla BMAA; infatti né l'APV (50 μ M), antagonista selettivo competitivo dei recettori NMDA, né l'MK-801 (10 μ M), antagonista non competitivo dei recettori NMDA, né l'MPEP (10 μ M), antagonista selettivo dei recettori mGluR₅, riducevano significativamente le correnti inward evocate dalla BMAA ($98, 7 \pm 2,23$ % del controllo, $p = 0.6$ one population *t* test, $n = 6$; $104 \pm 8,78$ % del controllo, $p = 0.7$ one population *t* test, $n = 4$; $95,43 \pm 4,92$ % del controllo, $p = 0.4$ one population *t* test, $n = 7$ rispettivamente) (FIG 4A e B).

Solo in poche cellule (15 su 80) la BMAA produceva una corrente entrante insensibile all'antagonista mGluR1, CPCCOEt e bloccata dall'antagonista dei recettori AMPA, CNQX (dati non mostrati).

Per contro, la corrente indotta dal glutammato era significativamente ridotta dal CNQX (42.51 ± 4.16 % del controllo, $p < 10^{-5}$ one population *t* test, $n = 10$), dall'APV (75.5 ± 2.81 % del controllo, $p < 0.001$ one population *t* test, $n=6$),

dall'MK-801 (70.4 ± 1.08 % del controllo, $p < 10^{-5}$ one population *t* test, $n=5$) (FIG 4C e D1) e dal CPCCOEt ($77 \pm 2,72$ % del controllo, $p < 0.001$ one population *t* test, $n = 7$), suggerendo che i recettori AMPA, NMDA e mGluR1 contribuiscono significativamente alla generazione della corrente indotta da glutammato nei neuroni dopaminergici (Mereu *et al*, 1991; Scarnati *et al*, 1986). L'antagonista mGluR5, MPEP, aveva un effetto trascurabile ($88,67 \pm 2,848$ % del controllo, $p = 0.17$ one population *t* test, $n = 3$) (FIG 4C e D2). L'effetto inibitorio degli antagonisti metabotropici, CPCCOEt e MPEP, è stato testato sulla corrente rimanente, dopo aver bloccato la componente ionotropica della corrente glutammatergica mediante l'MK-801 e il CNQX. Tale corrente residua (29.6 ± 7.26 % del controllo, $p < 10^{-5}$ one population *t* test, $n = 5$) ha rappresentato il nuovo controllo per il calcolo della percentuale di riduzione indotta dai bloccanti metabotropici (FIG D2).

Il confronto farmacologico tra le correnti indotte dalla BMAA e dal glutammato è stato fatto evocando correnti di ampiezza paragonabile. Da questi dati emerge la particolarità dell'attività della BMAA. Infatti, nella maggioranza delle cellule dopaminergiche della sostanza nera essa si comporta come un agonista dei recettori mGluR1 e, in una minoranza, come agonista dei recettori AMPA. Per contro, nelle stesse cellule, il glutammato attiva principalmente i recettori ionotropici (NMDA e AMPA) e in parte quelli metabotropici di tipo 1. E' stato precedentemente dimostrato dal nostro gruppo (Tozzi *et al*, 2003) che nelle cellule dopaminergiche mesencefaliche i recettori glutamatergici metabotropici di gruppo 1 sono accoppiati, mediante proteine G e una via PLC-dipendente, ai canali TRPC (Transient Receptor Potential). Le cellule dopaminergiche della SNc esprimono prevalentemente le isoforme TRPC1 e TRPC5 (Tozzi *et al*, 2003; Riccio *et al*, 2002).

Abbiamo voluto verificare se le correnti indotte dalla BMAA fossero mediate dall'attivazione dei canali TRP (FIG 4 E e F). L'applicazione di SKF 96365 (100 μ M) e ruthenium red (RR, 20 μ M), composti noti come bloccanti dei canali TRP (Boulay *et al*, 1997; Tozzi *et al*, 2003), riducono notevolmente l'ampiezza delle correnti indotte da BMAA (42.125 ± 4.35 % del controllo, $p < 10^{-5}$ paired *t* test, $n = 8$; 27.05 ± 8.3 % del controllo, $p < 10^{-5}$ paired *t* test, $n = 6$). Questi risultati suggeriscono che la BMAA, legandosi ai recettori mGluR1, attiva i canali TRP.

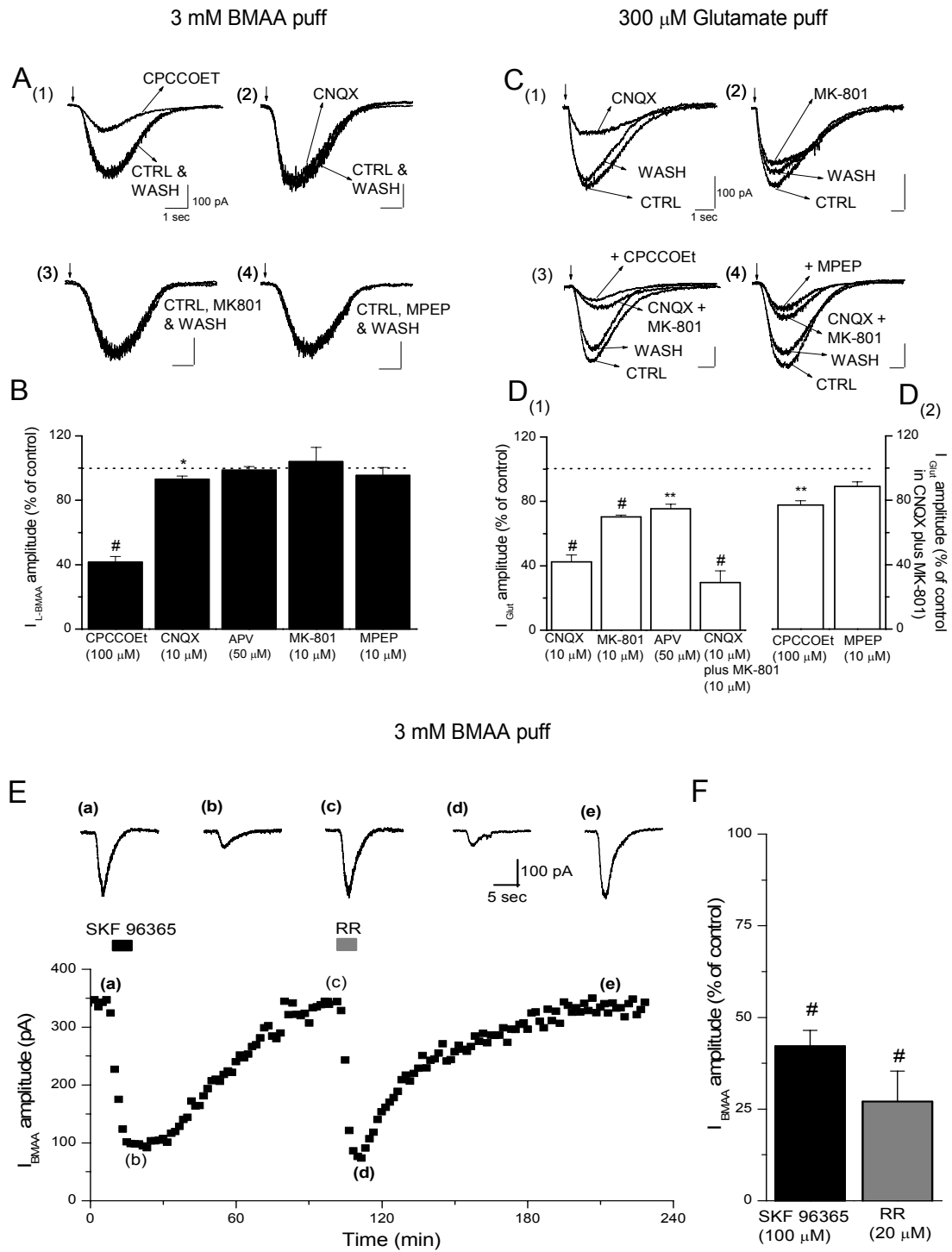


FIG 4: La BMAA è un agonista selettivo dei recettori metabotropici 1 (mGluR1) del glutammato. Infatti l'antagonista mGluR1 è l'unico che produce una riduzione significativa della corrente entrante (A, B) indotta da BMAA. Per contro, le correnti indotte da glutammato sono mediate in varia misura dai recettori ionotropici e metabotropici (C, D). Il recettore mGluR1, attivato dalla BMAA, è accoppiato ai canali TRP infatti sia l'SKF 96365 che il Ruthenium Red (RR) riducono in modo altamente significativo le correnti (E, F). * $0.05 < p < 0.001$; ** $0.001 < p < 10^{-5}$; # $p < 10^{-5}$.

Dinamiche del calcio citosolico in risposta all'applicazione dell'BMMA

Come mostrato in FIG 2, la BMAA induceva sui neuroni dopaminergici una corrente entrante associata ad un aumento transiente e reversibile di calcio. Abbiamo quindi voluto verificare se gli stessi antagonisti che avevano diminuito significativamente la corrente indotta dalla BMAA (FIG 4) avessero anche effetto sui transienti di calcio.

Abbiamo ripetuto gli esperimenti di farmacologia usando una soluzione intracellulare con bassa concentrazione di EGTA (0.75 mM) alla quale è stato aggiunto il Fura-2 (0.25 mM) per valutare, contemporaneamente alle variazioni di corrente, le variazioni del calcio citosolico.

Le correnti e il calcio indotto dalla BMAA erano reversibilmente ridotte dal CPCCOEt (100 μ M) e dall'SKF 96365 (100 μ M) (FIG 5A e B) (per le correnti: 21.14 ± 4.23 % del controllo, $p < 10^{-5}$ one population t test, $n = 7$; 54.14 ± 4.079 % del controllo, $p < 10^{-5}$ one population t test, $n = 7$, rispettivamente. per il calcio: 28.43 ± 5.96 % del controllo, $p < 10^{-5}$ one population t test, $n = 7$; 43.57 ± 7.9 % del controllo, $p < 0.001$ one population t test, $n = 7$, rispettivamente). Il CNQX (10 μ M), non aveva alcun effetto sul calcio mentre riduceva significativamente l'ampiezza della corrente (FIG 5C), (per la corrente: 75 ± 7.02424 % del controllo, $p < 0.05$ one population t test, $n = 5$; per il calcio: 100.17 ± 9.93 % del controllo, $p = 0.99$ one population t test, $n=6$).

Questi esperimenti dimostrano che l'aumento di calcio citosolico indotto dalla BMAA è dipendente dall'attivazione dei recettori mGluR1 e, quindi, dall'apertura dei canali TRPC ma non dai recettori AMPA. Futuri esperimenti saranno condotti per verificare il coinvolgimento del reticolo endoplasmico liscio (REL) nel rilascio di calcio nel citosol in seguito alla stimolazione degli mGluR 1 da parte della BMAA.

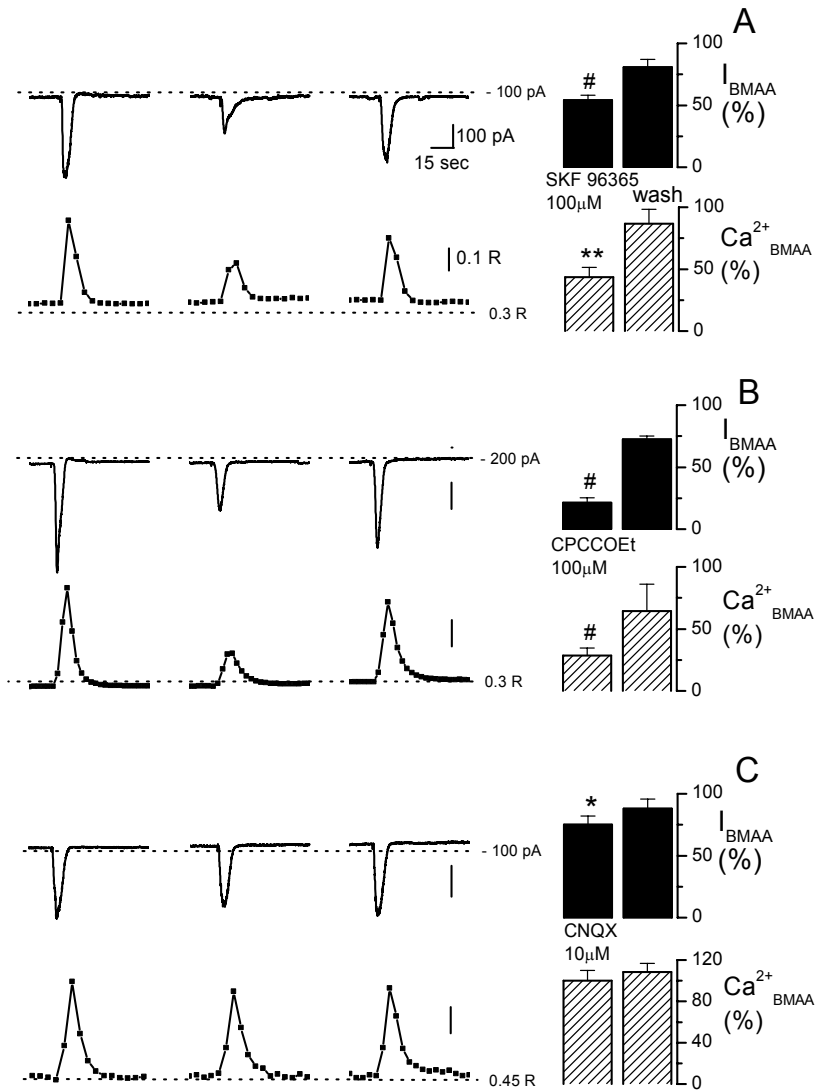


FIG 5: Gli aumenti di calcio indotti dalla BMAA sono sensibili ai bloccanti dei canali TRP (A) e dei recettori mGluR1 (B). I recettori AMPA contribuiscono solamente ad una piccola quota della corrente (C, in alto) ma non all'aumento di calcio citosolico (C, in basso). * $0.05 < p < 0.001$; ** $0.001 < p < 10^{-5}$; # $p < 10^{-5}$.

Effetto della BMAA sugli interneuroni GABAergici della SNC

La peculiarità dell'azione della BMAA nel tessuto nervoso risiede nel fatto che essa sembra agire su diversi tipi di recettori glutammatergici nelle diverse aree del cervello (Allen *et al*, 1993; Staton and Bristow, 1997; Pai *et al*, 1993; Spencer *et al*, 1987; Lobner *et al*, 2007; Buenz and Howe, 2007; Rao *et al*, 2006). A tal riguardo abbiamo voluto studiare il suo effetto anche sulle cellule GABAergiche della SNC.

In queste cellule la BMAA induceva delle correnti entranti di ampiezza media di 166 ± 20.06 pA ($n = 9$) (FIG 6 C, in alto) accoppiate a transazioni reversibili (FIG 6D e E) e riproducibili di calcio di ampiezza media pari a $0,0225 \pm 0,001$ R (FIG 6C, in basso). In particolare la concentrazione di calcio intracellulare aumentava da $0,4295 \pm 0,03$ (valore basale "pre-puff") a $0,45 \pm 0,038$ (valore al picco) (FIG 6E). Tuttavia, a differenza di quanto osservato nelle cellule dopaminergiche, tale aumento di calcio citosolico non è significativo ($p = 0.14$, $n = 4$).

Inoltre, le correnti indotte dall'applicazione della BMAA erano mediate dai recettori AMPA e non dagli mGluR1 in quanto solo il CNQX, ma non il CPCCOEt, riduceva significativamente l'ampiezza di tali correnti (FIG 6A e B) ($97,43 \pm 5,20$ % del controllo, $p = 0.64$ one population *t* test, $n = 7$ per il CPCCOEt ; $33,44 \pm 2,84$ % del controllo, $p < 10^{-5}$ one population *t* test, $n = 9$ per il CNQX).

Da questi esperimenti possiamo concludere che nelle cellule GABAergiche la BMAA attiva i recettori AMPA e la corrente indotta non è associata a significativi aumenti di calcio citosolico.

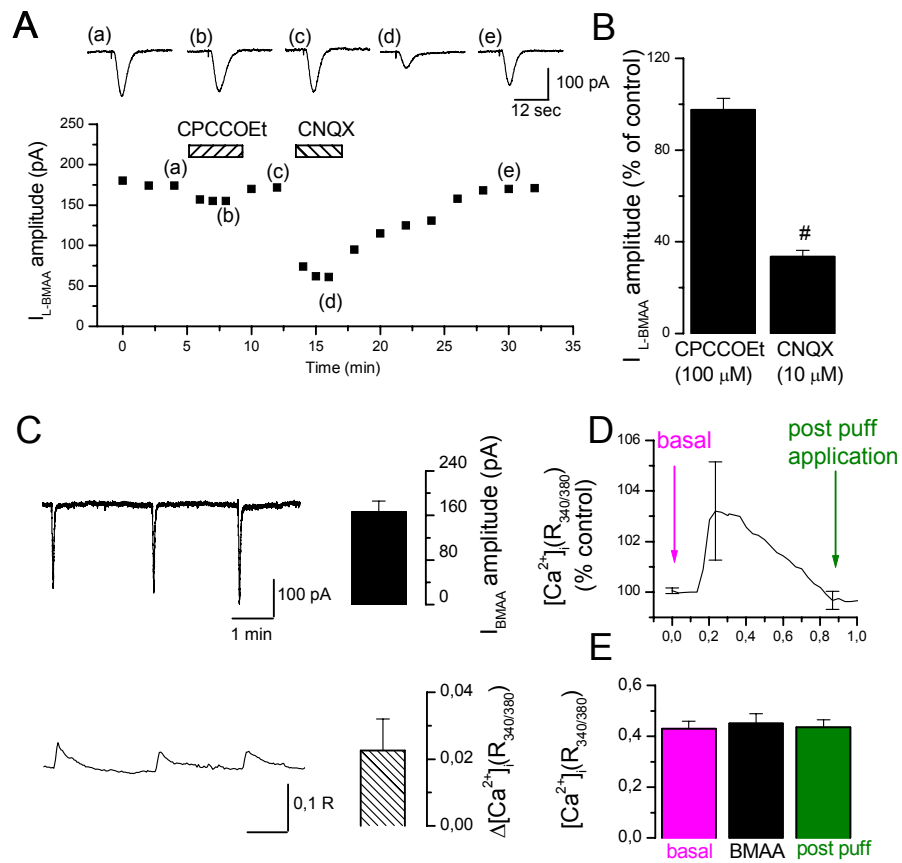


FIG 6: Effetti della BMAA nelle cellule GABAergiche della SNc. In queste cellule la corrente indotta dalla BMAA è mediata principalmente dai recettori AMPA (A, B). Inoltre tale corrente non produce significative variazioni intracellulari di calcio (C,D, E) rispetto ai valori basali. # $p < 10^{-5}$.

Esposizione prolungata alla BMAA induce cambiamenti irreversibili sulle proprietà cellulari e di membrana

La BMAA è considerata un fattore neurotossico ambientale che potrebbe contribuire, di per se o come cofattore, alla neurodegenerazione che si osserva nella sindrome dell' "ALS-PDC complex" (Murch *et al*, 2004). Inoltre, l'eccitotossicità indotta dal glutammato (o agonisti glutammatergici) sembra essere una delle cause più comuni di morte cellulare nelle malattie neurodegenerative umane. In relazione a tali evidenze, abbiamo voluto verificare se l'applicazione prolungata (12, 20, 30 min) della BMAA (3 mM) sui neuroni dopaminergici inducesse modificazioni irreversibili delle proprietà di membrana (potenziale di membrana, V_m ; resistenza di membrana, R_m) o della vitalità cellulare (variazione del calcio citosolico, $[Ca^{2+}]_i$; numero di potenziali d'azione al secondo, Hz) tali da iniziare la cascata di eventi che potrebbero portare a morte cellulare (FIG 7). Questi parametri (V_m , R_m , $[Ca^{2+}]_i$, Hz) sono stati misurati dopo 20 minuti dalla rimozione della BMAA dal mezzo extracellulare e sono stati normalizzati per il loro valore iniziale ($t = 0$). Il nostro controllo (ctrl) è rappresentato da una registrazione di durata paragonabile a quella di un esperimento con la BMAA (50 minuti circa), durante la quale non è stata applicata nessuna sostanza. Tutte le registrazioni sono state fatte in modalità di current-clamp per permettere la variazione spontanea del potenziale. Negli esperimenti di controllo né il numero di "spikes" al secondo, né il calcio citosolico, né la R_m , né il V_m variavano nel corso dei 50 minuti di registrazione (Hz: $99,83 \pm 17,75$ % del controllo, $p = 0,99$, $n = 11$; $[Ca^{2+}]_i$: $105,44 \pm 3,11$ % del controllo, $p = 0,12$, $n = 9$; R_m : $86,88 \pm 7,18$ % del controllo, $p = 0,11$, $n = 8$; V_m : $101,77 \pm 2,24$ % del controllo, $p = 0,44$, $n = 13$).

Al contrario, il numero di "spikes" evocate da una corrente depolarizzante di 100 pA e la R_m diminuivano progressivamente col tempo di applicazione della sostanza (dopo 12 min: $70,44 \pm 20,21$ % del controllo, $p = 0,21$, $n = 6$; $77,8 \pm 2,67$ % del controllo, $p < 0,01$, $n = 5$; dopo 20 min: $14,46 \pm 7,96$ % del controllo, $p < 10^{-5}$, $n = 10$; $80,2 \pm 3,87$ % del controllo, $p < 0,01$, $n = 5$; dopo 30 min: $0 \pm 0,25$ % del controllo, $p < 10^{-5}$, $n = 4$; $32 \pm 9,01$ % del controllo, $p < 0,01$, $n = 4$, rispettivamente) (FIG 7A e C). La concentrazione del calcio citosolico aumentava prolungando i tempi di applicazione della BMAA, triplicando dopo 30 minuti di esposizione all'aminoacido eccitatorio (dopo 12 min: $123,25 \pm 8,89$ % del controllo, $p < 0,05$, n

= 8; dopo 20 min: 147.46 ± 14.19 % del controllo, $p < 0.01$, $n = 11$; dopo 30 min: 284.5 ± 56.71 % del controllo, $p < 0.05$, $n = 4$). Il potenziale di membrana non variava anche dopo prolungata esposizione alla BMAA. Questo dato è altamente riproducibile nelle cellule che sono state esposte alla BMAA per 12 minuti. Dopo 20 o 30 minuti di esposizione i tempi di recupero del Vm dopo la sostenuta depolarizzazione erano molto elevati ed inoltre spesso si aveva inizialmente una tendenza alla iperpolarizzazione causata dall'attivazione dei canali del K^+ - Ca^{2+} attivati (Fiorillo and Williams, 1998). Questo sottolinea come un trattamento prolungato alla BMAA alteri in modo profondo e irreversibile le proprietà di membrana dei neuroni inducendo meccanismi di morte cellulare.

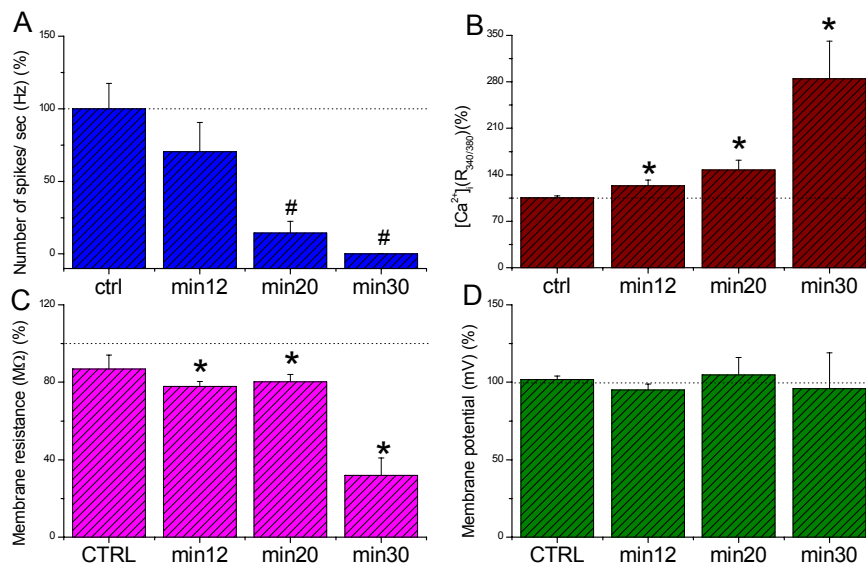


FIG 7: Effetti di esposizioni prolungate a BMAA su diversi parametri di vitalità cellulare (capacità della cellula di produrre potenziali d'azione, resistenza di membrana R_m , potenziale di membrana V_m , concentrazione di calcio citosolico $[Ca^{2+}]_i$). Tutti i parametri, ad eccezione del potenziale di membrana, sono profondamente modificati proporzionalmente alla durata dell'esposizione a BMAA. I risultati sono espressi come percentuale del controllo misurati a $t = 0$. * $0.05 < p < 0.001$; # $p < 10^{-5}$.

I bloccanti dei recettori mGluR1 e AMPA inibiscono in modo additivo il rilascio di Cytochrome C indotto dalla BMAA

Una valutazione qualitativa e quantitativa degli effetti tossici della BMAA sui neuroni dopaminergici della SNc è stata ottenuta dal materiale processato per doppia immunofluorescenza. Per questo scopo abbiamo analizzato l'espressione per la TH, marcatore tipico delle cellule dopaminergiche e il cytochrome C, il cui rilascio da parte dei mitocondri nel citosol viene considerato un indice di apoptosi (Springer *et al*, 1999; Sugawara *et al*, 2002; Vanderluit *et al*, 2003).

In tutti i gruppi sperimentali analizzati l'espressione della TH era intensa e specifica ed evidenziava una buona conservazione della morfologia cellulare dei neuroni dopaminergici (FIG 8 A, B, C, D, E, F immagine a sinistra). Il numero medio di cellule TH positive presentava una leggera diminuzione, non significativa, nei 5 gruppi trattati rispetto al gruppo di controllo. Infatti, mentre nel gruppo di controllo il numero delle cellule TH positive era 76.25 ± 3.304 , nel gruppo trattato con la BMAA si riduceva leggermente (68.75 ± 4.272) (Fig 9A). Nel gruppo sperimentale trattato con BMAA + CNQX era 72.25 ± 3.594 , in quello trattato con BMAA + CPCCOEt 70.50 ± 4.041 , in quello trattato con BMAA + JNJ 16259685 73.5 ± 4.203 e in quello trattato con BMAA + CNQX + JNJ 16259685 72.75 ± 3.862 (Fig 9A). L'analisi della varianza a un fattore (one-way ANOVA) non ha evidenziato in effetti una significativa differenza del numero delle cellule TH positive nei diversi gruppi analizzati ($F = 1.75$; $P = 0.18$).

Per quanto riguarda l'espressione del Cyt C è stata osservata una marcatura visibilmente diversa tra i diversi gruppi sperimentali analizzati (FIG 8 A, B, C, D, E, F immagine centrale). Nel gruppo di controllo, la marcatura per il Cyt C era scarsa e puntiforme a livello citosolico, riconducibile all'espressione basale del Cyt C a livello mitocondriale (Fig 8A). Nel gruppo trattato con BMAA è stato osservato un aumento significativo dell'espressione del rilascio di Cyt C (Fig 8B). I neuroni dopaminergici positivi per il Cyt C erano caratterizzati da una marcatura intensa distribuita uniformemente nel citosol. Dopo trattamento con BMAA + CPCCOEt l'espressione e la distribuzione del Cyt C non appariva diversa dal gruppo trattato con BMAA (FIG 8C). Dopo trattamento con BMAA + CNQX la marcatura del Cyt C appariva mediamente intensa e meno diffusa a livello cellulare, anche se invadeva

buona parte del citosol delle cellule dopaminergiche (FIG 8D). Un'espressione meno intensa e meno diffusa del marcatore è stata osservata in seguito a trattamento con BMAA+ JNJ 16259685 (FIG 8E). Nel gruppo trattato con BMAA+ JNJ 16259685+ CNQX l'espressione e la distribuzione del Cyt C appariva meno intensa, più puntiforme e piuttosto scarsa, simile a quella osservata nel gruppo di controllo (FIG 8F).

L'analisi quantitativa ha evidenziato un differenza significativa del numero di cellule immunoreattive per il Cyt C tra i diversi gruppi sperimentali presi in considerazione (FIG 9B). Infatti mentre nel gruppo di controllo il numero delle cellule Cyt C positive era di 4.5 ± 2.082 , nel gruppo trattato con BMAA era significativamente più alta e raggiungeva il 64.25 ± 3.304 . Nel gruppo trattato con BMAA + CPCCOEt era 44 ± 4.690 . Dopo trattamento con BMAA + CNQX era 47.00 ± 2.582 , e dopo trattamento con BMAA + JNJ 16259685 era 25 ± 3.559 fino a scendere a 13.25 ± 3.5 dopo trattamento con BMAA + CNQX + JNJ 16259685. L'analisi della varianza a un fattore (trattamento) ha evidenziato un effetto significativo del trattamento sul numero dei neuroni Cyt-c positivi ($F = 178,5; P < 0.0001$).

L'analisi del materiale processato per doppia immunofluorescenza eseguita con l'ausilio del microscopio confocale, ha dimostrato un diverso grado di co-localizzazione della TH con il Cyt C nei diversi gruppi sperimentali (FIG 8 A, B, C, D, E, F immagini a destra; 9C). Nel gruppo di controllo il 3.213 % (± 0.7644) delle cellule TH positive erano anche immunoreattive per il Cyt C. Nelle fettine esposte alla BMAA è stata osservata un alto grado di co-localizzazione TH-Cyt C rispetto al controllo. In questo gruppo l' 80.75 ± 2.98 % delle cellule TH positive erano anche immunoreattive per il Cyt C (FIG 9C).

In presenza di BMAA + CPCCOEt la percentuale dei neuroni TH/Cyt C positivi era del 54% (± 3.16) e scendeva leggermente nel gruppo BMAA + CNQX a 51.2% (± 6.56). Dopo trattamento con BMAA + JNJ 16259685 la percentuale scendeva a 24% (± 4.96) fino ad arrivare a 10% (± 3.651) nel gruppo BMAA + CNQX + JNJ 16259685 (FIG 9C). L'analisi della varianza a un fattore ha evidenziato una percentuale di cellule TH positive per il Cyt C significativamente diverso nei diversi gruppi sperimentali analizzati ($F = 212.0; P < 0.0001$) (Fig 9C) eccetto che tra il controllo e il gruppo trattato con BMAA + CNQX + JNJ 16259685 tra i quali non si evidenzia alcuna differenza significativa.

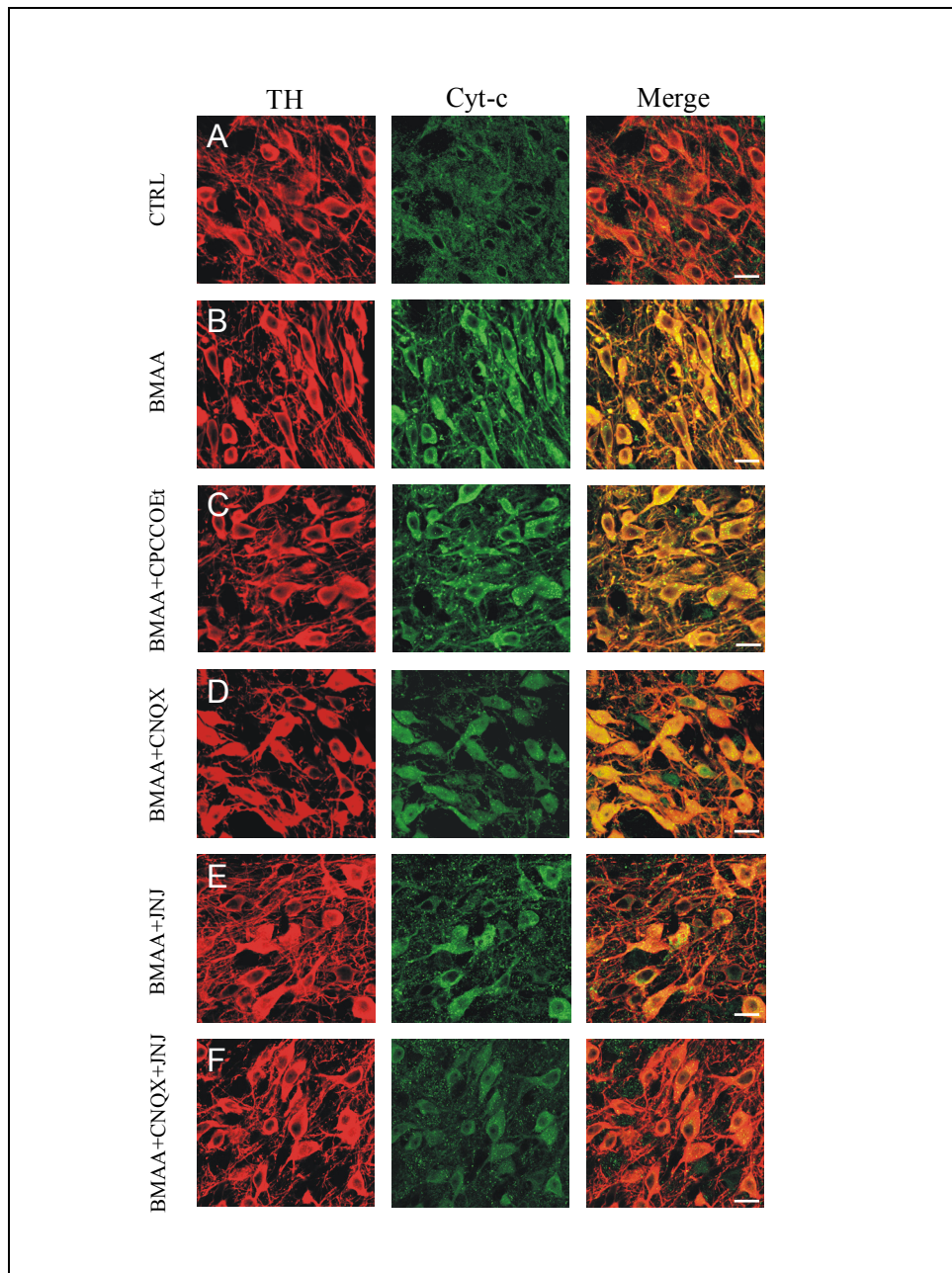


FIG 8: Immagini di microscopia confocale della SNc nei diversi gruppi sperimentali (A-F). Doppia immunofluorescenza per la tirosina idrossilasi (TH, rosso) e il Citocromo C (Cyt C, verde). (A) Gruppo di controllo: notare la scarsa co-localizzazione tra la TH e il Cyt C nelle cellule dopaminergiche. (B) Gruppo BMAA: dopo trattamento con BMAA 3 mM è possibile osservare un elevato grado di co-localizzazione tra i due marcatori. (C, D, E, F): Gruppo BMAA+CPCCOEt, gruppo BMAA+CNQX, gruppo BMAA+JNJ 16259685 e gruppo BMAA+JNJ 16259685 +CNQX rispettivamente. Notare come, mentre nel gruppo C,D,E il grado di co-localizzazione tra i due marcatori di interesse sia ancora piuttosto elevato, nel gruppo F il numero di cellule dopaminergiche che esprimono entrambi i marcatori è notevolmente diminuita ed è paragonabile al gruppo A di controllo.

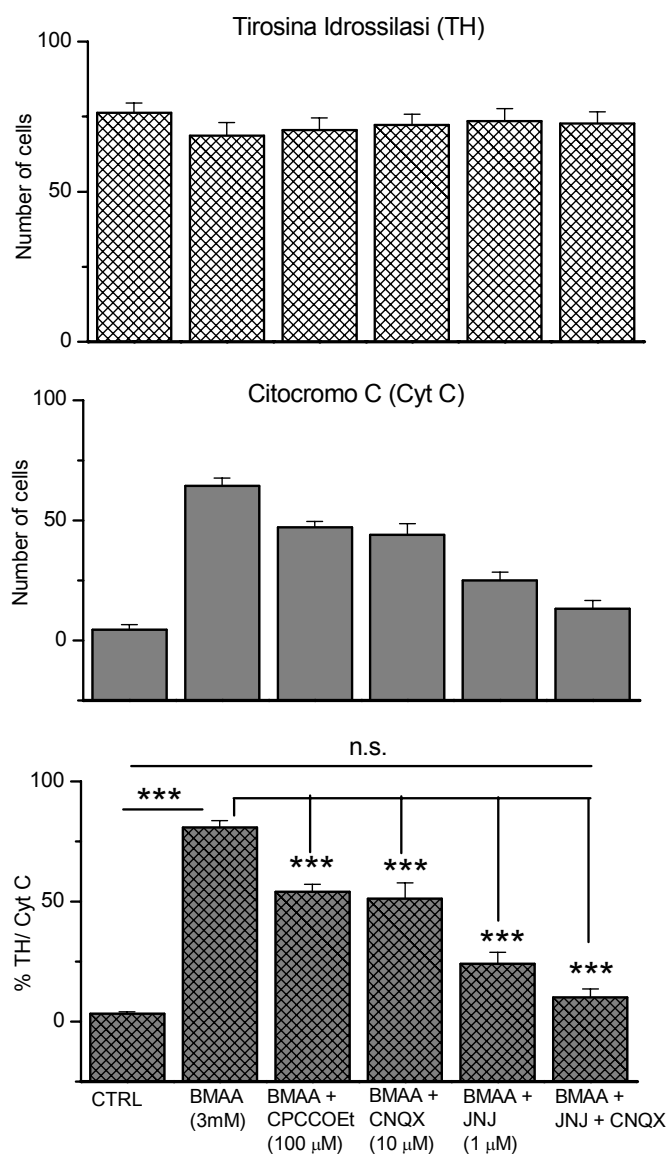


FIG 9: Istogrammi indicanti il numero di cellule che esprimono il marcatore per la tirosina idrossilasi (TH) (A), per il Citocromo C (Cyt C) (B) e di quelle che co-esprimono entrambi i marcatori (C) nei diversi gruppi sperimentali. Notare nel pannello C come il trattamento con la BMAA induce un significativo aumento rispetto al controllo di cellule TH che esprimono il marcatore per il Cyt C. Questo aumento è tuttavia ridotto significativamente dall'aggiunta dei bloccanti selettivi CPCCOEt, CNQX e JNJ 16259685 fino ad ottenere, dopo aggiunta di JNJ 16259685 e CNQX un numero di cellule che co-esprimono entrambi i marcatori paragonabile a quello del controllo.

*** $p < 0.001$, varianza a un fattore.

DISCUSSIONE

La BMAA è un aminoacido non proteico che sembra essere alla base della sindrome nota come “ALS-PDC complex” che colpisce prevalentemente le popolazioni dell’isola di Guam (Hirano *et al*, 1961). Da studi recenti sembra tuttavia che questa tossina venga prodotta da una grande varietà di cianobatteri sia marini che terrestri del genere *Nostoc* largamente diffusi in tutto il pianeta (Banack *et al*, 2007; Cox *et al*, 2005). Infatti, concentrazioni elevate di questo aminoacido sono state trovate non solo nelle acque di laghi inglesi (Metcalf *et al*, 2008) e del Sud Africa (Esterhuizen and Downing, 2008) ma anche in campioni di cervelli di pazienti canadesi affetti dalla malattia di Alzheimer (Murch *et al*, 2004b).

Inoltre, dopo la dimostrazione che la BMAA viene accumulata nell’organismo in una forma legata alle proteine e viene rilasciata durante il catabolismo proteico per molto tempo dopo il contatto, inducendo un lento e progressivo danno cellulare, l’interesse clinico per questa tossina è andato crescendo (Murch *et al*, 2004a).

Tali informazioni, insieme alle evidenze della sua tossicità *in vivo* e *in vitro* in diverse aree del cervello (Allen *et al*, 1993; Staton and Bristow, 1997; Pai *et al*, 1993; Spencer *et al*, 1987; Buenz and Howe, 2007; Rao *et al*, 2006), anche a basse dosi (Lobner *et al*, 2007), ha suscitato in noi l’interesse di caratterizzare gli effetti, ancora non del tutto noti, di questa tossina sulle cellule dopaminergiche della SNc.

Nei neuroni dopaminergici la BMAA induce una depolarizzazione del potenziale di membrana, l’attivazione di una corrente entrante, ed un aumento transiente della concentrazione di calcio citosolico. Questi effetti sono mediati prevalentemente dai recettori metabotropici del glutammato di gruppo I, tipo 1 (mGluR1) in quanto il CPCCOEt, antagonista selettivo dei recettori mGluR1, riduce significativamente sia l’aumento di calcio che le correnti indotti dalla BMAA. In alcune cellule è stato testato anche il JNJ 16259685 (Lavreysen *et al*, 2004), nuovo bloccante dei recettori mGluR1, avente una EC_{50} 10^4 volte inferiore rispetto al CPCCOEt, che riduce quasi completamente le correnti entranti. La corrente indotta da BMAA è anche dipendente in piccola parte dai recettori AMPA. Infatti il CNQX, antagonista selettivo per questi recettori riduce poco, ma in modo significativo, le suddette correnti. Gli altri recettori glutamatergici non sembrano essere attivati dalla tossina, in quanto nessuno dei loro bloccanti ha un effetto significativo sulle correnti.

Gli effetti della BMAA sono stati paragonati a quelli del glutammato, dato che, in presenza di carbonato, essa forma un derivato β -carbammato con struttura molto simile a quella dell'acido glutammico (Myers e Nelson, 1990). Ciò giustifica le sue evidenti proprietà eccitatorie come agonista glutammatergico. Tuttavia, mentre il glutammato attiva tutte le classi recettoriali con prevalenza di quelle ionotropiche, la BMAA, nelle stesse cellule, presenta una maggiore affinità per i recettori metabotropici. E' interessante che negli interneuroni GABAergici della SNc la BMAA agisce sui recettori AMPA ma non su quelli metabotropici. In queste cellule, tuttavia, l'agonista selettivo degli mGluR1, il DHPG (30 μ M), evoca correnti entranti (dati non mostrati), a conferma della presenza degli mGluR1 sugli interneuroni (Marino *et al*, 2001). Questi dati e altri già presenti in letteratura sottolineano la particolarità di questa tossina che sembra comportarsi come agonista di tutti i sottotipi dei recettori glutammatergici (NMDA, AMPA, mGluR1, mGluR5) nei diversi tipi di neuroni del sistema nervoso contrale. Il motivo di tale comportamento non è noto. Si potrebbe ipotizzare sia legato ad una sua diversa affinità per specifiche subunità dei recettori glutammatergici. A conferma di questo abbiamo evidenze che il DHPG induce una corrente entrante sia nelle cellule dopaminergiche che in quelle GABAergiche della SNc, ma solo nelle prime essa è associata ad un aumento di calcio intracellulare, transiente e reversibile (dati non mostrati), facendo ipotizzare una diversa composizione recettoriale. Esperimenti successivi saranno condotti per indagare questa ipotesi.

In accordo con quanto dimostrato precedentemente sugli effetti del DHPG nelle cellule DAergiche (Guatteo *et al*, 1999; Tozzi *et al*, 2003), anche la BMAA attiva i recettori mGluR1 e induce un aumento del calcio intracellulare. Tale aumento è ridotto dal CPCCOEt ma non dal CNQX, indicando che esso è dipendente solo dai recettori mGluR1 e non dagli AMPA. Inoltre è noto che gli mGluR1 nelle cellule dopaminergiche sono accoppiati ai canali SOC/TRPC attraverso proteine Gq (Tozzi *et al*, 2003). Noi abbiamo osservato una riduzione sia del calcio che della corrente in presenza degli antagonisti dei canali TRP, SKF 96365 e Ruthenium Red, confermando che i SOC/TRPC mediano le correnti cationiche attivate dalla BMAA. A sostegno dell'ipotesi che i canali TRP siano coinvolti nella tossicità indotta dalla BMAA una recente scoperta dimostra che nei cervelli di pazienti dell'isola Guam morti per l'ALS-PDC era presente una mutazione nel canale TRPM2 che lo rendeva inattivo.

In un modello murino del complesso ALS-PDC è stata dimostrata una alterazione delle due varianti α e β del trasportatore gliale del glutammato GLT-1/EAAT2 ed una diminuzione del numero di recettori AMPA e NMDA (Wilson and Shaw, 2007). Questo potrebbe provocare un aumento di glutammato a livello sinaptico. A causa dell'affinità strutturale che la BMAA presenta con l'acido glutammico, ci siamo domandati se questa tossina venisse ricaptata dalle cellule dopaminergiche attraverso il trasportatore degli aminoacidi eccitatori EAAT. Abbiamo dimostrato che la BMAA non è substrato di tale trasportatore, in quanto il D,L-TBOA, bloccante dei EAATs, non induce nessuna variazione della corrente evocata dalla BMAA. Questo quindi dimostra che la BMAA non è riassorbita dalle cellule dopaminergiche e che potrebbe esercitare l'effetto tossico agendo a livello extracellulare. Pertanto, la mutazione osservata nel modello murino, potrebbe esacerbare, aumentando i livelli di glutammato sinaptico, l'azione eccitotossica della BMAA.

Proprio per dimostrare che la tossicità della BMAA è legata all'attivazione dei recettori mGluR1 abbiamo eseguito degli studi di morfologia, immunistochemica ed elettrofisiologia durante trattamenti prolungati con la tossina.

Abbiamo quindi dimostrato che esponendo le fettine di mesencefalo alla BMAA per un'ora si aveva un aumento del rilascio di Cyt C nelle cellule TH positive e, quindi, del numero di cellule che andava incontro ad apoptosi. L'aggiunta di JNJ 16259685 e CNQX ha un effetto protettivo massimale e il rilascio di Cyt C dalle cellule TH positive è paragonabile alle fettine non esposte alla tossina. Invece CPCCOEt e CNQX hanno mostrato un'azione protettiva più debole e paragonabile. Dai risultati di farmacologia ci saremmo aspettati una protezione del CPCCOEt maggiore di quella del CNQX. La ragione della scarsa efficacia protettiva del CPCCOEt può essere spiegata dalla presenza di un sottogruppo di cellule dopaminergiche nelle quali la BMAA sembra avere una azione puramente ionotropica AMPA ma della quale non sarà discusso in questa tesi. Inoltre il CPCCOEt sembra avere di per sé un'attività tossica, evidenziata dalla presenza di rigonfiamenti assionali che non sono dipendenti dal mezzo nel quale l'antagonista è sciolto. Infatti trattando le fettine per un'ora con il DMSO non si evidenzia nessuna alterazione assonale (dati non mostrati).

Inoltre, trattamenti prolungati (12, 20 o 30 minuti) con la tossina inducono variazioni irreversibili nelle proprietà di membrana delle cellule registrate. Il potenziale di membrana è l'unico parametro che non subisce variazioni significative. Questo

sottolinea che la cellula, dopo venti minuti dal lavaggio della sostanza, è ancora vitale e in grado di riportare il potenziale a valori basali, anche dopo intensa depolarizzazione. Tuttavia, il fatto che si abbia una diminuzione irreversibile della capacità di produrre potenziali d'azione dopo stimolo depolarizzante, nonché della resistenza di membrana sottolinea come, nonostante l'apparente vitalità della cellula, molti meccanismi intracellulari siano danneggiati irreversibilmente.

La concentrazione di calcio intracellulare dopo 20 minuti di lavaggio della BMAA è significativamente alta già ai tempi di perfusione più bassi (12 minuti). E' noto che l'aumento del calcio citosolico è l'agente scatenante di una serie di eventi che, coinvolgendo il mitocondrio, portano al rilascio del Cyt C e, quindi, ad apoptosi (Hajnoczky *et al*, 2006; Green and Kroemer, 2004). Questo processo, tuttavia, è lento perché richiede la rottura della parete mitocondriale (Hajnoczky *et al*, 2006). Infatti, per poter indurre un danno cellulare misurabile, abbiamo dovuto trattare le fettine per un'ora con la BMAA e poi lasciarle lavare per quattro ore nella soluzione di perfusione per permettere lo svilupparsi del danno mitocondriale e, quindi, del rilascio di Cyt C. Prima delle quattro ore non si riusciva ad apprezzare un rilascio massivo dell'agente apoptotico.

Sebbene recenti studi hanno dimostrato degli effetti tossici della BMAA a concentrazioni più basse (Lobner *et al*, 2007), la concentrazione usata in questa tesi è abbastanza alta (300 μ M e 3 mM). La ragione risiede nel fatto che il nostro obiettivo era quello di esasperare il fenomeno tossico per caratterizzare l'effetto protettivo degli antagonisti recettoriali.

CONCLUSIONI

Il lavoro di questa tesi mi ha permesso di analizzare i meccanismi coinvolti nella tossicità indotta dalla BMAA nelle cellule dopaminergiche della SNc, come probabile causa dei sintomi parkinsoniani che caratterizzano la sindrome dell'ALS-PDC. Sembra sempre più accreditato il coinvolgimento dell'eccitotossicità da glutammato nel morbo di Parkinson a causa dell'iperattività del STN e, quindi, dell'aumento di rilascio di glutammato nei neuroni dopaminergici dai terminali subtalamici che contribuisce alla degenerazione progressiva del sistema nigrostriatale (Smith *et al*, 1992 e 1996; Iribe *et al*, 1999; Blandini *et al*, 2000; Frank *et al*, 2007).

Inoltre, poiché l'attivazione prolungata degli mGluR1 promuove numerosi processi che inducono a morte cellulare per eccitotossicità (Salinska *et al*, 2005), e la loro inibizione protegge dagli effetti tossici della 6-OHDA (Vernon *et al*, 2007), è sempre più evidente la possibilità che questi recettori possano essere alla base della neurodegenerazione.

Attraverso questa tesi si è data una chiara e plausibile dimostrazione di come la BMAA possa essere tossica verso le cellule dopaminergiche della SNc. Questo può essere vero ancor di più *in vivo* dove può accumularsi nell'organismo inducendo una progressiva e costante attivazione della trasmissione glutamatergica.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar-Bryan L, Clement J IV, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A and Bryan J (1998) Towards understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol Rev* 78:227-245.

Aguirre JA, Andbjer B, Gonzalez-Baron S, Hansson A, Stromberg I, Agnati LF and Fuxe K (2001) Group I mGluR antagonist AIDA protects nigral DA cells from MPTP-induced injury. *Neuroreport* 12:2615-2617.

Alam M, Schmidt WJ (2002) Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain res* 136:317-324.

Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B (1997) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 69:1196-1203.

Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989, 12: 366-375.

Alexander GE and Crutcher ME (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.

Alexander GE, DeLong MR and Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9:357-381.

Allen CN, Spencer PS and Carpenter DO (1993) Beta-N-methylamino-L-alanine in the presence of bicarbonate is an agonist at non-N-methyl-D-aspartate-type receptors. *Neuroscience* 54(3):567-74.

Andén NE, Hfuxe K, Hamberger B, Hokfelt T (1966). A quantitative study on the nigro-neostriatal dopamine neuron system in the rat. *Acta Physiol Scand* 67(3): 306-12.

Antonsson B, Montessuit S, lauper S, Eskes R and martinou LC (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 345 Pt2:271-278.

Armentero MT, Fancellu R, Nappi G, Bramanti P and Blandini F (2006) Prolonged blockade of NMDA or mGluR5 glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration while inducing selective metabolic changes in the basal ganglia circuitry in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 22:1-9.

Banack SA and Cox PA (2003) Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* 61(3):387-389.

Banack SA, Johnson HE, Cheng R and Cox PA (2007) Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Mar Drugs* 5:180-196.

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280:18558-18561.

Beal MF (2003) Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:120-131.

Beninato M & Spencer RF (1987). A cholinergic projection to the rat substantia nigra from the pedunculopontine tegmental nucleus. *Brain Res* 412(1): 169-74.

Bernardi P and Petronilli V (1996) The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* 28(2):131-138.

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

Bjorklund A, Ehinger B, Falck B (1968). A possibility for differentiating dopamine from noradrenaline in tissue sections by microspectrofluorometry. *Acta Physiol Scand* 72(1): 253-4.

Blandini F, Nappi G, Tassorelli C and Martignoni E (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 62: 63-88.

Blandini F (2001) The role of subthalamic nucleus in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Funct Neurol* 16 (4 Suppl): 99-106.

Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH (2003) Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Bio* 5:1051-1061.

Bolam JP & Smith Y (1990). The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res* 529(1-2): 57-78.

Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4): 527-42.

Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4): 527-42.

Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E and Birnbaumer L (1997) Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* 272:29672-29680.

Bradley SR, Marino MJ, Wittmann M, Rouse ST, Awad H, Levey AI, Conn PJ (2000). Activation of group II metabotropic glutamate receptors inhibits synaptic excitation of the substantia Nigra pars reticulata. *J Neurosci* 20(9):3085-94.

Brown P and Williams D (2005) Basal ganglia local field potential activity: character and functional significance in the human. *Clin Neurophysiol* 116:2510-2519.

Brown P, Oliviero A, Mazzone P, Insola A, Tonali P, Di Lazzaro V. Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *J Neurosci* 2001, 21:1033-1038.

Buenz EJ and Howe CL (2007) Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. *Neurotoxicology* 28:702-704.

Bunney BS & Aghajanian GK (1976). Dopaminergic influence in the basal ganglia: evidence for striatonigral feedback regulation. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 55: 249-67.

Calabresi P, Mercuri NB, Bernardi G (1992). Activation of quisqualate metabotropic receptors reduces glutamate and GABA-mediated synaptic potentials in the rat striatum. *Neurosci Lett* 139(1): 41-4.

Calne DB, Langston JW (1983) Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet* 2:1457-1459.

Carlsson A & Waldeck B (1958). A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol Scand* 44(3-4): 293-8.

Chang YC, Chiu SJ and Kao KP (1993) beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) decrease brain glutamate receptor number and induces behavioural changes in rats. *Chin J Physiol* 36(2):79-84.

Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23(9):1261-1276.

Choi DW (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18(2):58-60.

Conn PJ & Pin JP (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-37.

Conn PJ, Battaglia G, Marino MJ, Nicoletti F (2005). Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nat Rev Neurosci* 6(10): 787-98.

Copani A, Canonico PL, Catania MV, Aronica E, Bruno V, Ratti E, van Amsterdam FT, Gaviraghi G, Nicoletti F (1991) *Brain Res* 558(1):79-86.

Cossette M, Levesque M, Parent A (1999) Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neurosci Res* 34:51-54.

Coyle JT and Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.

Cox PA, Banack SA, Murch SJ (2003) Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neuroprotective disease among the Chamorro people of Guam. *PNAS USA* 100(23):13380-13383.

Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bigigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA and Bergman B (2005) Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *PNAS* 102(14):5074-5079.

Csordas G, Thomas AP, Hajnoczky G (1999) Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J* 18:96-108.

Dammann O, Leviton A (1998) Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. *Semin Pediatr Neurol* 5:190-201.

Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham C, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nature Neurosci* 9:251-259.

DeLong MR and Wichmann T (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64(1):20-24

Deutch AY (2006) Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 70:67-70 (Suppl).

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

Di Monte DA (2003) The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol* 2:531-538.

Dominic IJ and Martinou JC (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis: a painful separation. *Devel cell* 15:341-343.

Duncan MW, Kopin IJ, Garruto RM, Lavine L, Markey SP (1998) 2-amino-3-(methylamino)-propionic acid in cycad-derived foods is an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism. *Lancet* 2 (8611):631-632.

Esterhuizen M and Downing TG (2008) β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicology and environmental safety* 71:309-313.

Fiorillo CD and Williams JT (1998) Glutamate mediate an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature* 394 (6688): 78-82.

Floor E, Wetzel MG (1998) increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J neurochem* 70:268-275.

Frank MJ, Samanta J, Moustafa AA, Sherman SJ (2007) Hold your horses: impulsivity, deep brain stimulation, and medication in Parkinsonism. *Science* 318:1309-1312.

Fredriksson A, Fredriksson M, Eriksson P (1993) Neonatal exposure to paraquat or MPTP induces permanent changes in striatum dopamine and behaviour in adult mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 122:258-64.

Galvan A, Kuwajima M, Smith Y (2006). Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? *Neuroscience* 143(2): 351-75.

Galvani P, Fumagalli P, Santagostino A (1995) Vulnerability of mitochondrial complex I in PC12 cells exposed to manganese. *Eur J Pharmacol* 293:377-83.

Garruto RM, Yanagihara R, Gajdusek Dc (1988) Cycads and amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia. *Lancet* 2 (8619):1079.

Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS (2003) Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide relevance to the etiology of Parkinson's disease. *FASEB J* 17:1957-1959.

Geracitano R, Tozzi A, Berretta N, Florenzano F, Guatteo E, Viscomi MT, Chiolo B, Molinari M, Bernardi G and Mercuri NB (2005) Protective role of hydrogen peroxide in oxygen-deprived dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *J Physiol* 568:97-110.

Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC (2005) Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 24:1546-1556.

Gernert M, Fedrowitz M, Wlaz P, Löscher W. Subregional changes in discharge rate, pattern, and drug sensitivity of putative GABAergic nigral neurons in the kindling model of epilepsy. *Eur J Neurosci* 2004, 20(9):2377-86.

Grace and Onn (1989) Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* 9(10):3463-81.

Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13:244-254.

Green DR (1998) Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94(6):695-698.

Green DR and Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.

Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB (2003) The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord* 9 (Suppl 2):S59-S64.

Grenhoff J, North RA, Johnson SW (1995). Alpha 1-adrenergic effects on dopamine neurons recorded intracellularly in the rat midbrain slice. *Eur J Neurosci* 7(8): 1707-13.

Grenhoff J, Ugedo L, Svensson TH (1988). Firing patterns of midbrain dopamine neurons: differences between A9 and A10 cells. *Acta Physiol Scand* 134(1): 127-32.

Grillner P and Mercuri NB (2002) Intrinsic membrane properties and synaptic inputs regulating the firing activity of the dopamine neurons. *Behav Brain Res* 130:149-169.

Guatteo E, Mercuri NB, Bernardi G and Knopfel T (1999) Group I metabotropic glutamate receptors mediate an inward current in rat substantia nigra dopamine neurons that is independent from calcium mobilization. *J Neurophysiol* 82: 1974-1981.

Guilarte TR, Chen MK, McGlothan JL, Verina T, Wong Df, Zhou Y (2006) Nigrostriatal dopamine system dysfunction and subtle motor deficits in manganese-exposed non-human primates. *Exp Neurol* 202:381-90.

Gunter TE, Buntinas L, Sparagna GC and Gunter KK (1998) The Ca²⁺ transport mechanisms of mitochondria and Ca²⁺ uptake from physiological-type Ca²⁺ transients. *Biochim Biophys Acta* 1366:5-15.

Gunter TE, Gunter KK, Sheu S-S and Gavin CE (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* 267:C313-339.

Hackenbrock CR (1966) Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I . Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30:269-297.

Hajnoczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Roy SS and Yi M (2006) Mitochondrial calcium signalling and cell seath: Approches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 40: 553-560.

Hassani OK, Feger J, Yelnik J, Francois C (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 749: 88-94.

Hermosura MC, Cui AM, Go RCV, Davenport B, Shetler CM, Heizer JW, Schmitz C, Mocz G, Garruto RM, Perraud A-L (2008) Altered functional properties of a TRPM2 variant in guamanian ALS and PD. PNAS 105(46):18029-18034.

Hirano A, Kurland LT, Krooth RS, Lessel S (1961) Parkinsonism-dementia complex, an endemic disease on the island of Guam. I. clin Features Brain 84:642-661.

Hollenbeck PJ and Saxton WM (2005) The axonal transport of mitochondria. J Cell Sci 118:5411-5419.

Honma T, Miyagawa M, Suda M, Wang RS, Kobayashi K, Sekiguchi S (2006) Effects of perinatal exposure to bisphenol A on brain neurotransmitters in female rat offspring. Ind Health 44:510-24.

Hunot S, Hirsch EC (2003) Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. Ann Neurol 53 (Suppl 3):S49-S58.

Ichas F and Mazat J-P (1998) From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. Biochim Biophys Acta 1366(1-2):33-50.

Ichas F, Jouaville LS and Mazat JP (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. Cell 89(7):1145-1153.

Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS and Mazat JP (1994) Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. FEBS Lett 348(2):211-215.

Iribe Y, Moore K, pang KC and Tepper JM (1999) Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro. J Neurophysiol 82:925-933.

Ishido M, Yonemoto J, Morita M (2007) Mesencephalic neurodegeneration in the orally administrated bisphenol A-caused hyperactive rats. *Toxicol Lett* 173:66-72.

Jellinger K (1987) The pathology of parkinsonism. In: Marsden CD, Fahn S (Eds), *Movement Disorders 2*. Butterworths, London 124-165.

Jones DC and Miller GW (2008) The effect of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem pharmacol* 76:569-581.

Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM (1994) *Principi di neuroscienze*. Seconda edizione. Casa Editrice Ambrosini

Kelly RM and Strick PL (2004) Macro-architecture of basal ganglia loops with the cerebral cortex: use of rabies virus to reveal multisynaptic circuits. *Prog Brain Res* 143: 449-459.

Khaled AR, Kim K, Hofmeister R, Muegge K and Durum SK (1999) Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14476-14481.

Koller WC (1986) Paraquat and Parkinson's disease. *Neurology* 36:1147.

Lacey MG, Mercuri NB and North RA (1987) Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol* 392:397-416.

Lacey MG, Mercuri NB and North RA (1988) On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *J Physiol* 401:437-53.

Lacey MG, Mercuri NB and North RA (1989) Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9:1233-1241.

Lavreysen H, Wouters R, Bischoff F, Nobrega Pereira S, Langlois X, Blokland S, Somers M and Dillen L, Lesage AS (2004) JNJ 16259685, a highly potent, selective and systemically active mGlu1 receptor antagonist. *Neuropharmacology* 47(7): 961-72.

Le Couteur DG, Muller M, Yang MC, Mellick GD, Mclean Aj (2002) Age-environmental and gene-environmental interactions in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Rev Environ Health* 17:51-64.

Lee MS, Rinne JO, Marsden CD (2000) The pedunculopontine nucleus: its role in the genesis of movement disorders. *Yonsei Med J* 41:167-184.

Lewy FH (1912) Paralysis agitans. *Pathologische Anatomie*. In: Lawandowski M (ed) *Handbuch der Neurologie*. Springer, Berlin Heidelberg New York 920:933.

Lindvall O, Bjorklund A, Skagerberg G (1984). Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* 306(1-2): 19-30.

Ling ZD, Chang Q, Lipton JW, Tong CW, Landers TM and Carvey PM (2004a) Combined toxicity of prenatal bacterial endotoxin exposure and postnatal 6-hydroxydopamine in the adult rat midbrain. *Neuroscience* 124(3):619-28.

Ling Z, Chang QA, Chong WT, Leurgans SE, Lipton JW and Carvey PM (2004b) Rotenone potentiates dopamine neuron loss in animals exposed to lipopolysaccharide prenatally. *Exp Neurol* 190:373-383.

Ling Z, Zhu Y, Tong CW, Snyder JA, Lipton JW, Carvey PM (2006) Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats exposed to LPS prenatally. *Exp Neurol* 199:499-512.

Liss B, Bruns R and Roeper (1999) Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J* 18(4):833-846.

Liu MY and Colombini M (1992) Regulation of mitochondrial respiration by controlling the permeability of the outer membrane through the mitochondrial channel, VDAC. *Biochim Biophys Acta* 1098:255-260.

Lobner D, Piana PMT, Salous AK and Peoples RW (2007) β -N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis* 25:360-366.

Lynch D, Wanglund C, Spathis R, Chan CW, Reiff DM, Lum JK, Garruto RM (2008) The contribution of mitochondrial dysfunction to a gene-environmental model of guamanian ALS and PD. *Mitochondrion* 8:109-116.

Mannella CA (2006) The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* 1762:140-147.

Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice-paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 277:1641-1644.

Manzoni OJ, Prezeau L and Bockaert J (1991) beta-N-methylamino-L-alanine is a low-affinity agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport* 2(10):609-11.

Maries E, Doss B, Collier TJ, Kordower JH, Steece-Collier K (2003) The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci* 4:727-738.

Marino MJ, Wittmann M, Bradley SR, Hubert GW, Smith Y, Conn PJ (2001) Activation of group I metabotropic glutamate receptors produces a direct excitation and disinhibition of GABAergic projection neurons in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 21(18): 7001-7012.

Marino MJ, Valenti O, Conn PJ (2003). Glutamate receptors and Parkinson's disease: opportunities for intervention. *Drugs Aging* 20(5): 377-97.

McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56(1):149-162.

Mena-Segovia J, Bolam JP, Magill PJ (2004) Peduncolopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci* 27:585-588.

Mendez JA, Bourque MJ, Dal Bo G, Bourdeau ML, Danik M, Williams S, Lacaille JC, Trudeau LE. Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J Neurosci* 2008, 28(25):6309-18.

Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stefani A and Bernardi G (1995) Properties of the hyperpolarization-activated cation current I_h in rat midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 7: 462-469.

Mercuri NB, Stratta F, Calabresi P, Bonci A, Bernardi G (1993). Activation of metabotropic glutamate receptors induces an inward current in rat dopamine mesencephalic neurons. *Neuroscience* 56(2): 399-407.

Mereu G, Costa E, Armstrong DM and Vicini S (1991) Glutamate receptor subtypes mediate excitatory synaptic currents of dopamine neurons in midbrain slices. *J neurosci* 11(5):1359-66.

Metcalf JS, Banack SA, Lindsay J, Morrison LF, Cox PA and Codd GA (2008) Co-occurrence of β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environmental Microbiology* 10(3):702-708.

Mignotte B and Vayssiere JL (1998) Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 252:1-15.

Muir KW (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 6:53-60.

Mulder DW, Kurland LT, Iriarte LLG (1954) Neurological disease on the island of Guam. *US Armed Forces Med J* 5:1724-1739.

Murch SJ, Cox PA, Banack SA (2004) A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(33):12228-31.

Myers TG AND Nelson SD (1990) Neuroactive carbamate adducts of β -N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. *J Biol Chem* 265: 10193-10195.

Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A (2000) Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural* 143-151.

Neely MD, Schmidt DE, Deutch AY (2007). Cortical regulation of dopamine depletion-induced dendritic spine loss in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 149:457-464.

Neher E & Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260(5554): 799-802.

Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36(26):2503-2508.

Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G and Knopfel T (1996) Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* 19: 267-271.

Nicotera P and Orrenius S (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23(2-3):173-180.

Nunn PB, Seelig M, Zagoren JC, Spencer PS (1987) Stereospecific acute neuronotoxicity of "uncommon" plant amino acids linked to human motor-system disease. *Brain research* 410(2):375-379.

Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T, Korsmeyer SJ (2005) Proapoptotic Bax and Bak regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 105-110.

Ossowska K, Wardas J, Kuter K, Nowak P, Dabrowska J, Bortel A (2005) Influence of paraquat on dopaminergic transporter in the rat brain. *Pharmacol rep* 57:330-5.

Pacher P and Hajnoczky (2001) Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves. *EMBO J* 20:4107-4121.

Pai KS, Shankar SK and Ravindranath V (1993) Billion-fold difference in the toxic potencies of two excitatory plant amino acids, L-BOAA and L-BMAA: biochemical and morphological studies using mouse brain slices. *Neurosci res* 17(3):241-8.

Paige DM, Augustyn M, Adih WK, Witter F, Chang J (1998) Bacterial vaginosis and preterm birth: a comprehensive review of the literature. *J Nurse-Midwifery* 43:83-89.

Parent A and Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. Part II: The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Rev* 20:128-154.

Parker WD, Boyson SJ, Parks JK (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26:719-723.

Perry TL, Bergeron C, Biro AJ, Hansen S (1989) Beta-N-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *J Neurol Science* 94(1-3):173-180.

Pisani A, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G (1997). Activation of group III metabotropic glutamate receptors depresses glutamatergic transmission at corticostriatal synapse. *Neuropharmacology* 36(6): 845-51.

Pizzo P and Pizzan T (2007) Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signalling dynamics. *Trends Cell Biol* 17(10):511-517.

Poirier J, Dea D, Baccichet A, Thiffault C (1994) Superoxide dismutase expression in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 738:116-120.

Polsky FI, Nunn PB, Bell EA (1972) Distribution and toxicity of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Federation Proceedings* 31(5):1473-1475.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.

Rao SD, Banack SA, Cox PA and Weiss JH (2006) BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainite receptor activation. *Exp Neurol* 201:244-252.

Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD and Pangalos MN (2002) mRNA distribution analysis of human TRPC family in CSN and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 109:95-104.

Rintoul GL, Filiano AJ, Brocard JB, Kress GJ, Reynolds IJ (2003) Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons. *J Neurosci* 23(21), 7881-7888.

Rizzuto R, Brini M, Murgia M and Pozzan T (1993) Microdomains with high Ca^{2+} close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262:744-747.

Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Forgarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science* 280:1763-1766.

Rodriguez MC, Obeso A, Olanow W (1998) Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol* 44 (suppl 1), S175-S188.

Ross SM, Seeling M and Spencer PS (1987) Specific antagonism of excitotoxic action of "uncommon" amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res* 425(1):120-7.

Ross SM, Spencer PS (1987) Specific antagonism of behavioral action of "uncommon" amino acids linked to motor-system disease. *Synapse* 1(3):248-253.

Sakka N, Sawada H, Izumi Y, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Shimohama S, Akaike A (2003) Dopamine is involved in selectivity of dopaminergic neuronal death by rotenone. *Neuroreport* 14:2425-2428.

Salinska E, Danysz W and Lazarewicz JW (2005) The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 43:322-339.

Scarnati F, Proia A, Campana E and Pacitti C (1986) A microiontophoretic study on the nature of putative synaptic neurotransmitter in the pedunculopontine-substantia nigra pars compacta excitatory pathway of the rat. *Exp Brain Res* 62:470-478.

Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823-827.

Schuler F, Casida JE (2001) Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labelling. *Biochim Biophys Acta* 1506:79-87.

Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science* 300:135-139.

Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Paggano F, Bernardi P (2001) Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor- α apoptotic signalling. *J Biol Chem* 276:12035-12040.

Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT (2003) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23:10756-10764.

Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, Sakaitani M, Shigeri Y, Yumoto N and Nakajima T. (1998) DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol* 53 (2):195-201.

Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H (2005) Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain res* 976:243-52.

Shimizu S, Ide T, Yanagida T and Tsujimoto Y (2000) Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c by the mitochondrial channel VDCA. *Nature* 399:483-487.

Sian J, Fexter DT, Lees AJ, Daniel S, Jenner P, Marsden CD (1994) Alteration in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36:348-355.

Simmen T, Aslan JE, Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Wan L, Xiang Y, Feliciangeli SF, Hung CH, Crump CM, Thomas G (2005) PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J* 24:717-729.

Smaili SS, Hsu Y-T, Youle RJ and Russel JT (2000) Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J Bio and Biom* 32:35-46.

Smith ID, Grace AA (1992) Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity. *Synapse* 12: 287-303.

Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86: 353-387.

Smith Y, Charara A, Parent A (1996) Synaptic innervation of midbrain dopaminergic neurons by glutamate-enriched terminals in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 364: 231-253.

Sonsalla PK, Albers DS and Zeevalk GD (1998) Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurones in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids* 14:69-74.

Sparagna GC, Gunter KK, Sheu S-S and Gunter TE (1995) Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem* 270(46):27510-27515.

Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S (1965) Blokade of endogenous norepinephrine synthesis by alpha-methyl-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydrolase. *J Pharmacol Exp Ther* 147:86-95.

Spencer PS, Hugon J, Ludolph A, Nunn PB, Ross SM, Roy DN, Schaumburg HH (1987a) Discovery and partial characterization of primate motor-system toxins. *Ciba Foundation Symposium* 126:221-238.

Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN and Robertson RC (1987b) Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237(4814):517-22.

Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Roy DN (1986) Motorneurone disease on Guam: possible role of a food neurotoxin. *Lancet* 1 (8487):965.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) α -synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6469-6473.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840.

Stanford IM & Lacey MG (1996). Electrophysiological investigation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 74(2): 499-509.

Starkov AA, Chinopoulos C, Fiskum G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium* 36:257-264.

Staton PC and Bristow DR (1997) The dietary excitotoxins beta-N-methylamino-L-alanine and beta-N-oxalylamino-L-alanine induce necrotic- and apoptotic-like death of rat cerebellar granule cells. *J Neurochem* 69(4):1508-18.

Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J neurosci Res* 55:659-665.

Stredrick DL, Stokes AH, Worst TJ, Freeman WM, Johnson EA, Lash LH (2004) manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells. *Neurotoxicology* 25:543-53.

Sulzer D and Rayport S (2000) Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids* 19(1):45-52.

Szabadkai G et al (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* 175:901-911.

Szalai G, Krishnamurthy R, Hajnoczky G (1999) Apoptosis driven by IP3-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J* 18:6349-6361.

Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi M, Kawanishi S (2003) Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci* 73:3277-3288.

Talpadé DJ, Greene JG, Higgins DS Jr, Greenamyre JT (2000) In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *J Neurochem* 75:2611-2621.

Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N, Shigemoto R (2001). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience* 106(3): 481-503.

Thorsen P, Jensen LP, Jeune B, Ebbesen N, Arpi M, Bremmelgaard A, Møller BR (1998) Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may

constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 178:580-587.

Testa CM, Standaert DG, Young AB and Penney JB Jr (1994) Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the rat basal ganglia of the rat. *J Neurosci* 14 (5Pt2) 3005-3018.

Testa CM, Friberg IK, Weiss SW and Standaert DG (1998) Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1a and mGluR2/3 in the rat basal ganglia. *J Comp Neurol* 390:5-19.

Tozzi A, Bengtson CP, Longone P, Carignani C, Fusco FR, Bernardi G and Mercuri NB. (2003) Involvement of transient receptor potential-like channels in responses to mGluR-1 activation in midbrain dopamine neurons. *Eur J Neurosci* 18:2133-2145.

Turski L, Bressler K, Rettine KJ, Loschmann PA and Wachtel H (1991) Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 349:414-418.

Valenti O, Marino MJ, Wittmann M, Lis E, DiLella AG, Kinney GG & Conn PJ (2003). Group III metabotropic glutamate receptor-mediated modulation of the striatopallidal synapse. *J Neurosci* 23: 7218-26.

Van Bockstaele EJ, Biswas A, Pickel VM (1993). Topography of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus that send axon collaterals to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res* 624(1-2): 188-98.

VanderHeiden MG, Chandel NS, Schumacker PT and Thompson CB (1999) Bcl-x_L prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* 3:159-167.

Vega A and Bell EA (1967) *Phytochemistry* 6:759-762.

Vernon AC, Palmer S, Datla KP, Zbarsky V, Croucher MJ and Dexter DT (2005) Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor ligands in a 6-hydroxydopamine rodent model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 22:1799-1806.

Vernon AC, Zbarsky V, Datla KP, Croucher MJ and Dexter DT (2007) Subtype selective antagonism of substantia nigra pars compacta Group I metabotropic glutamate receptors protects the nigrostriatal system against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo. *J Neurochem* 103(3):1075-91.

Warner TT and Schapira AHV (2003) Genetic and environmental factors in the cause of parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 (Suppl 3):s16-s25.

Whiting MG (1988) Toxicity of cycads: implication for neurodegenerative disease and cancer. *Transcripts of Four Cycad Conference. The fifth cycad conference:1962. Third World Medical research Foundation, New York :1-17.*

Wigmore MA and Lacey MG (1998) Metabotropic glutamate receptors depress glutamate-mediated synaptic input to rat midbrain dopamine neurons in vitro. *J Neurochem* 92:948-961.

Wilson JMB and Shaw CA (2007) Late appearance of glutamate transporter defects in a murine model of ALS-parkinsonism dementia complex. *Neurochem Int* 50(7-8):1067-77.

Winn P (2006) How best to consider the structure and function of the pedunculo-pontine tegmental nucleus: evidence from animal studies. *J Neurol Sci* 248:234-250.

Wittmann M, Marino MJ, Bradley SR, Conn PJ (2001). Activation of group III mGluRs inhibits GABAergic and glutamatergic transmission. *J Neurophysiol* 85(5): 1960-8.

Yamaguchi T, Sheen W and Morales M. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 2007, 25:106-118.

Yuan J and Yankner BS (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407 :802-809.

Yumino K, Kawakami I, Tamura M, Hayashi T, Nakamura M (2002) Paraquat- and diquat- induced oxygen radical generation and lipid peroxidation in rat brain microsomes. *J Biochem (Tokyo)* 131:565-570.

Yung KKL, Smith AD, Levey AI, Bolam JP (1996) Synaptic connections between spiny neurons of the direct and indirect pathways in the neostriatum of the rat: evidence from dopamine receptor and neuropeptide immunostaining. *Eur J Neurosci* 8:861-869.

Zeevalk GD and Nicklas WJ (1989) Acute excitotoxicity in chick retina caused by the unusual amino acids BOAA and BMAA: effect of MK-801 and kynureate. *Neurosci Lett* 102(2-3):284-90.

Zoratti M and Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241:139-176.

Zhu Y, Carvey PM, Ling Z (2007) Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide. *Neurochem Int* 50(4):671-680.

Zimmerman H (1945) progress report of work in the laboratory of pathology during May 1945. Guam. USA Naval Medical Research Unit Number 2, 1 June. Washington, DC.