

Studio proteomico della neurodegenerazione indotta da 6-OHDA nel circuito nigrostriatale di ratto

A. De Iuliis^a, J. Grigoletto^a, A. Recchia^b, P. Giusti^b, P. Arslan^a

^aDipartimento di scienze diagnostiche e terapie speciali, Università di Padova

^bDipartimento di farmacologia e anestesiologia "E. Meneghetti", Università di Padova

Riassunto

Premesse: L'eziologia del morbo di Parkinson, patologia correlata all'invecchiamento e caratterizzata dalla progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici della pars compacta della substantia nigra rimane, a tutt'oggi, non del tutto chiara. La normale terapia con L-DOPA, infatti, è solo sintomatica e non arresta la progressiva perdita di neuroni. E' stato suggerito che gli stessi precursori della L-DOPA favoriscono la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che provocano un'ulteriore danno neuronale.

Perdita dei neuroni dopaminergici nigrostriatali può essere indotta dalla somministrazione intracerebrale della 6-idrossidopamina (6-OHDA), neurotossina catecolaminergica, trovata, come molecola endogena, nelle urine dei pazienti parkinsoniani.

Nel modello animale di morbo di Parkinson, denominato "ratto emiparkinsoniano", l'iniezione intranigrale unilaterale di 6-OHDA determina perdita massiva delle cellule dopaminergiche nella substantia nigra ipsolaterale.

Nel tentativo di identificare alcune delle proteine coinvolte nella morte dei neuroni dopaminergici, abbiamo analizzato questo modello animale del morbo di Parkinson, utilizzando i metodi della proteomica.

Metodi: Cinque ratti emiparkinsoniani sono stati ottenuti mediante iniezione stereotassica intranigrale di 6-OHDA. Il tessuto della substantia nigra destra, lesionata da 6-OHDA, ed il tessuto dello striato ipsolaterale, insieme con i rispettivi

tessuti della metà controlaterale, non lesionati, utilizzati come controllo, sono stati dissezionati ed omogeneizzati. La separazione della miscela di proteine di ciascun tessuto, solubilizzata in un tampone a base di urea, è stata effettuata mediante elettroforesi bidimensionale. I profili proteici dei tessuti lesionati e di controllo, così ottenuti, sono stati confrontati mediante il sistema informatico di analisi di immagine PDQuest 2D-gel (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA). Gli spot proteici, che hanno mostrato significative differenze di espressione, sono stati analizzati in spettrometria di massa, denominata matrix assisted laser desorption/ionizing time of flight (MALDI-TOF).

Risultati: Il protocollo di estrazione e quello di solubilizzazione delle proteine cerebrali sono stati validati dalla soddisfacente risoluzione dei profili proteici ottenuti. Due proteine, l' α -enolasi e la β -actina, la prima nella substantia nigra e la seconda nello striato, hanno mostrato un aumento di espressione nel tessuto in neurodegenerazione, rispetto a quello di controllo.

Conclusioni: Lo studio proteomico della neurodegenerazione, indotta dalla 6-OHDA, nel circuito nigrostriatale di ratto, ha consentito l'identificazione di due proteine, l' α -enolasi e la β -actina, la cui espressione risulta aumentata nei tessuti neurodegenerati.

Studi precedenti descrivono queste due proteine come modificate per ossidazione nella malattia di Alzheimer (AD). I nostri dati preliminari rispecchiano tali risultati, configurando un possibile meccanismo comune di neurodegenerazione.

Summary

Proteomic study of 6-OHDA-induced neurodegeneration of rat nigrostriatal pathway

Background: The aetiology of Parkinson's disease (PD), an age-related disorder characterized by a progressive degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra (SN) pars compacta, remains unclear. Current treatments, such as administration of L-DOPA, are only symptomatic and do not stop or delay the progressive loss of neurons. In fact, it has been suggested that the dopamine precursor L-DOPA, increases generation of reactive oxygen species (ROS) leading to further neuronal damage.

A similar loss in nigro-striatal dopaminergic neurons is produced on intracerebral administration of the catecholaminergic neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA). In this animal model of PD, termed 'the hemi-parkinsonian rat', unilateral injection of 6-OHDA into the nigro-striatal pathway results in extensive loss of dopaminergic cells in the ipsilateral SN.

In an attempt to identify some of the proteins that are involved in dopaminergic neuronal death, we used the proteomic methods to analyze this animal model of PD.

Methods: Five hemiparkinsonian rats were obtained by intranigral stereotaxic injection of 6-OHDA. The right 6-OHDA-lesioned substantia nigra and striatum tissues along with the left, unlesioned contralateral tissues, were excised and homogenized, using urea-based buffer, to

extract the tissues protein.

The separation of the protein mixtures and the visualization of the protein patterns obtained were performed using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE).

Protein profiles of control and treated tissues were compared by the PDQuest 2D-gel analysis software (BIO-Rad Lab., Hercules, CA, USA). The protein spots showing differential expression were analysed by matrix assisted laser desorption/ionizing time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

Results: The brain protein extraction and solubilization protocol was validated obtaining a satisfactory protein profile. In comparison to the normal rats, emiparkinsonian animals exhibited a different expression in alpha-enolase and beta-actin in substantia nigra and striatum, respectively.

Conclusion: The proteomic study of rats unilateral injection of 6-OHDA into the nigro-striatal tissues allowed us to identify two proteins, alpha-enolase and beta-actin, showing increased levels in the 6-OHDA-lesioned brain tissues compared to control. Previous studies described the same proteins as oxidized and proteins in Alzheimer's disease (AD) brain. Our preliminary data could mirror those results pointing out a common mechanism of neurodegenerative diseases.

Keywords: Parkinson's disease, substantia nigra, neurodegeneration, oxidative stress, proteomics.

Introduzione

Il Morbo di Parkinson (MP) è una patologia neurodegenerativa progressiva che comporta la perdita selettiva dei neuroni dopaminergici nel circuito nigrostriatale, accompagnata anche da una non meglio caratterizzata perdita di neuroni in altre regioni del cervello¹. Evidenze, in numero sempre maggiore, suggeriscono che il morbo di Parkinson, come altre malattie neurodegenerative croniche, quali il morbo di Alzheimer (MA), è causato da una combinazione di eventi che porta ad uno squilibrio delle funzioni neuronali².

Studi post-mortem hanno indicato, in maniera inequivocabile, come il danno ossidativo³ possa essere implicato nella patogenesi della malattia, dimostrando che alterazioni mitocondriali ed il metabolismo stesso della dopamina producono specie reattive dell'ossigeno⁴⁻⁷.

Indagini epidemiologiche, inoltre, hanno mostrato che i pesticidi ed altri agenti nocivi ambientali potrebbero essere fattori cruciali nell'innesco del processo di neurodegenerazione⁸⁻¹⁰.

Recentemente lo studio di forme ereditarie del morbo di Parkinson ha fornito importanti indicazioni sul probabile meccanismo molecolare, coinvolto nella patogenesi della malattia, che confortano le osserva-

zioni epidemiologiche e sperimentali riguardo le disfunzioni mitocondriali e lo stress ossidativo.

Undici sono i geni risultati mutati nel morbo di Parkinson e, di essi, cinque sono, oggi, conosciuti in maggiore dettaglio. Tali geni codificano per la α -sinucleina, (PARK1), l'ubiquitina idrolasi-1 carbossiterminale (UHCL-1), la parkina (PARK2), DJ-1 (PARK7), e PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10-induced kinase) (PINK1, denominata anche PARK6)¹¹⁻¹⁷.

Le mutazioni o l'alterata espressione di questi geni contribuisce alla patogenesi della malattia, attraverso un comune meccanismo che si manifesta proprio nello scompimento delle funzioni mitocondriali, nello stress ossidativo e nell'errato assemblamento delle proteine.

Un meccanismo simile potrebbe dare spiegazione anche dei casi, cosiddetti sporadici, di malattia, dovuti a tossine ambientali, come i pesticidi ed i metalli pesanti. L' α -sinucleina, una proteina citosolica associata alle vescicole, una volta ossidata e modificata per nitrificazione, può formare addotti con i dopaminochinoni, che, a loro volta, ne accelerano l'aggregazione¹². L'UHCL-1 e la parkina sono componenti del sistema proteasoma-ubiquitina (UPS) che degrada proteine erroneamente ripiegate o danneggiate¹⁸. L'inattivazione della parkina

e dell'UHCL-1 comporta alterazione della funzione mitocondriale. DJ-1, localizzata probabilmente sui mitocondri, contribuisce alla risposta cellulare contro lo stress ossidativo¹⁹ al pari di PINK1, chinasi mitocondriale¹⁷.

Polimorfismi di geni mitocondriali, inoltre, modificano drammaticamente il rischio di sviluppare la malattia. Tossine ambientali, come il rotenone, alterando le funzioni mitocondriali, causano stress ossidativo e portano all'aggregazione di proteine, compresa l' α -sinucleina^{20,21}.

La dopamina libera nel citosol, a sua volta, può essere ossidata da chinoni altamente reattivi e questo potrebbe contribuire alla perdita selettiva dei neuroni dopaminergici, che si osserva nei reperti autopsici dei pazienti affetti dalla malattia⁵.

Le differenti cause del morbo di Parkinson potrebbero essere messe in relazione tra di loro secondo uno schema meccanicistico: le alterazioni mitocondriali ed i fenomeni di stress ossidativo possono influenzare l'espressione delle proteine ed i meccanismi implicati nelle mutazioni geniche che causano la malattia, così le mutazioni geniche, d'altra parte, possono portare allo scompenso delle funzioni mitocondriali ed allo stress ossidativo. Se le cause, dunque, appaiono essere molteplici e divergenti, la patogenesi di questa malattia sembra tuttavia convergere su elementi comuni: scompenso mitocondriale, stress ossidativo ed un non corretto rimaneggiamento delle proteine, tutti strettamente legati l'uno all'altro²².

Nondimeno, lo studio dei processi molecolari, coinvolti nelle diverse malattie neurodegenerative progressive, ha messo in luce aspetti simili tra esse.

Un reperto caratteristico del morbo di Alzheimer e del morbo di Parkinson, così come di altre malattie neurodegenerative, è l'accumulo di aggregati proteici insolubili, quali le cosiddette placche senili ed i grovigli di neurofibrille nel morbo di Alzheimer ed i corpi di Lewy in quello di Parkinson²³. Sebbene tali depositi presentino differente composizione proteica, tutti contengono ubiquitina e proteine ubiquinate. Inoltre è stata descritta l'alterazione della funzione del proteosoma sia nei cervelli alzheimeriani, sia in quelli parkinsoniani. Entrambe le malattie sono state associate alla produzione di ROS, dovuta probabilmente ad una suscettibilità genetica e/o ad una esposizione a pesticidi²⁴. Analisi post-mortem, inoltre, indicano, nei reperti cerebrali di entrambe le malattie, danni ossidativi molto elevati a proteine, lipidi e DNA³.

L'analisi proteomica delle aree cerebrali potrebbe risultare strumento efficace nell'investigazione dei disordini del sistema nervoso centrale e nella ricerca di marcatori precoci di malattia.

Allo stato attuale, sono stati indagati soprattutto l'identità ed il grado di espressione di proteine nel morbo di Alzheimer, nella sindrome di Down e nei modelli animali di tali malattie. Questi studi hanno prodotto importanti informazioni sui prodotti dei geni coinvolti

nelle malattie²⁵⁻³³.

Poco è invece conosciuto sui prodotti genici associati al morbo di Parkinson.

Nel tentativo di identificare alcune delle proteine che potrebbero essere coinvolte nei processi di morte neuronale dopaminergica, abbiamo analizzato le variazioni di espressione proteica associate alla somministrazione della neurotossina 6-OHDA in *substantia nigra* di ratto, mediante tecnologie integrate della proteomica.

Materiali e Metodi

Strumenti e reagenti

Tutti i reagenti usati in questo studio sono stati acquistati dalle ditte Sigma (St.Louis, MO, USA) e Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

6-idrossidopamina bromuro (6-OHDA-HBR) è stata solubilizzata in soluzione salina contenente lo 0,1% di acido ascorbico.

La R(-)apomorfina HCl è stata fornita dall'ICN Biochemical Inc.(Costa Mesa,CA,USA) ed utilizzata in soluzione salina.

I tessuti cerebrali sono stati separati mediante centrifuga B4i/BR4i (Jouan, Saint Herblain, France), a 4 °C.

Le letture spettrofotometriche sono state condotte in uno spettrofotometro Beckman DU-640. Per l'elettroforesi bidimensionale sono state utilizzati: Protean Ief Cell, per la prima dimensione e Mini Protean 3 Cell, per la seconda dimensione (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Animali

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando ratti maschi adulti Sprague-Dawley (peso ca. 280 grammi), forniti dalla ditta Harlan, Italy (San Pietro al Natisone, Udine, Italy).

Gli esperimenti sono stati condotti dalle ore 10,00 alle ore 17,00, in ottemperanza alla direttiva comunitaria del 24.11.1986 (86/609/IIC), riguardante gli animali da esperimento.

Lesione da 6-OHDA

È stato utilizzato un gruppo di 5 animali, i quali, preventivamente anestetizzati con iniezione intramuscolare di una soluzione di Ketamina (87 mg/kg) e xilazina (13 mg/kg), sono stati fissati in un apparecchio per stereotassi Kopf con la barra indicatrice fissata a +5mm, sopra la linea interaurale. Le lesioni sono state effettuate dopo apertura dello scalpo e l'incisione di un foro craniale, mediante iniezione unilaterale di 6-OHDA (8 μ g in 3 ml), utilizzando le seguenti coordinate: AP: -5.7 mm, ML: 2.0 mm, DV: 8.7 mm dal bregma³⁴.

La neurotossina è stata somministrata nella *substantia nigra* di destra, impiegando una microsiringa Hamilton collegata ad una mini-pompa (Harvard Compact Infusion Pump, Holliston; MA, USA) alla velocità di 0.5 ml/min. L'ago è stato lasciato in posizione per 5 minuti prima della retrazione lenta, per permettere la

diffusione della tossina nel tessuto e prevenirne il reflusso. Al termine dell'operazione il foro craniale è stato chiuso con cemento da dentista e le ferite suturate con graffette di acciaio. Infine è stata effettuata la terapia post-operatoria, mediante somministrazione di una soluzione glucosata (6 ml, s.c.3), un cortisonico (beta-metasone, 0.2 ml, i.m.), un analgesico (indometacina, 0.2, i.m.) ed un antibiotico (cefepime, 0.2 ml, s.c.).

Test comportamentale

Due settimane dopo l'iniezione intranigrale di 6-OHDA gli animali sono stati sottoposti al "rotational behavior testing"³⁴. I ratti sono stati sottoposti ad iniezione s.c. di R-(-)apomorfina cloridrato, messi in una gabbia cilindrica (diametro 240 mm, altezza 300 mm) ed è stato registrato il numero di rotazioni da essi effettuate (ipsilaterali e controlaterali) per mezzo di un rotometro automatico (Rota-Count 8, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA), nell'intervallo di un'ora. Gli animali, positivi al test, sono stati poi sacrificati per decapitazione. Le aree cerebrali d'interesse sono state rimosse seguendo le coordinate di G.Paxinos e C. Watson³⁵.

Preparazione dei campioni

Le sezioni di substantia nigra e quelle di striato, con un peso, rispettivamente, di circa 10 mg e di circa 40 mg ognuna, sono state omogenate in tampone, composto da 0.32 mol/litro di saccarosio, 5 mmol/litro di acido 2-idrossi-1,1-bis-idrossimetilaminoetansolfonico (TES) e 0.5 mmol/litro di acido etilendiamminotetracetico (EDTA), (3 ml per ogni grammo di tessuto), a pH 7.4. La miscela proteica del surnatante dell'omogenato di ciascun tipo di tessuto, ottenuto dopo due successive centrifugazioni, (600 x g, 10 min, 4 °C e 7000 x g, 12 min, 4°C), è stata poi solubilizzata in un tampone composto da 9M urea e 4% CHAPS, mediante passaggio in colonnina cromatografica Micro Bio-Spin (Bio-Rad Lab, Hercules, CA, USA).

E' stata quindi effettuata riduzione delle proteine, mediante addizione di 3mM tributilfosfina (TBP), ed una successiva alchilazione è stata ottenuta con iodoacetamide (IAA) al 2,5% (w/v).

Le miscele proteiche sono state, infine, ulteriormente solubilizzate, scambiando il tampone a base di urea con un tampone composto da 7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, con passaggio in colonnina cromatografica, come descritto sopra.

Quantificazione delle proteine

La determinazione delle proteine è stata effettuata mediante il metodo di Lowry, modificato secondo Peterson. (Sigma-Aldrich, MO).

Separazione in doppia dimensione

100 mg di proteine, addizionate di anfoline allo 0,8% e blu di bromofenolo, necessario come tracciante, sono stati applicati su matrici di acrilamide (IPG strip), di 7 cm di lunghezza, con gradiente lineare di pH inizial-

mente compreso tra 3 e 10, poi tra 4 e 7 per la substantia nigra, e 4 e 7 e 5 ed 8 per lo striato.

L'isoelettrofocalizzazione è stata condotta a 250 V per 20 minuti, con un incremento graduale del voltaggio a 1000 V per 2 ore, 1500 V per 1 ora, 2500 volt per 90 minuti, fino ad arrivare 25000volt/hours in circa 24 ore.

La separazione in seconda dimensione è stata effettuata in gel di poliaccrilamide in percentuale del 12,5%, in presenza sodio dodecil solfato (SDS-PAGE), applicando una corrente iniziale di 5 mA per 1 ora, di 10 mA per 1 ora e 20 mA fino alla fuoriuscita del fronte di migrazione.

I gel sono stati infine colorati con una soluzione a base di nitrato d'argento (Silver staining).

Analisi d'immagine

I profili proteici apparsi nei gel sono stati analizzati mediante software d'analisi d'immagine PDQuest (Bio-Rad).

Identificazione degli spot proteici

L'identificazione della sequenza aminoacidica delle proteine, individuate dal software come differenziate espresse, è stata effettuata mediante spettrometria di massa MALDI -TOF, presso il servizio di sequenza del C.N.R., dell'Università degli Studi di Torino.

Risultati

Il nostro modello animale di morbo di Parkinson, denominato "modello emiparkinsoniano" è ottenuto mediante iniezione stereotassica della neurotossina 6-OHDA in substantia nigra destra, mantenendo intatta la substantia nigra di sinistra che viene utilizzata come controllo³⁶. La 6-OHDA utilizza lo stesso sistema di trasporto utilizzato dalla noradrenalina e dalla dopamina e induce specifica degenerazione dei neuroni catecolaminergici, probabilmente per inibizione del complesso mitocondriale 1 e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)³⁷.

L'innervazione dopaminergica tra il neostriato di destra e quello di sinistra risulta così scompensata e si osserva un'asimmetria nella postura dell'animale, che si manifesta in un comportamento rotatorio controlaterale, indotto da apomorfina, quando sottoposto nel cosiddetto "rotational behaviour testing".

Due settimane dopo l'iniezione intranigrale di 6-OHDA, i cinque ratti utilizzati hanno mostrato 220 rotazioni controlaterali, registrate, mediante rotometro automatico, in un intervallo di tempo pari ad un'ora.

Il proteoma delle aree cerebrali interessate dalla neurodegenerazione, e dei rispettivi controlli, è stato analizzato mediante elettroforesi bidimensionale.

Inizialmente le proteine, presenti nell'omogenato di ciascun tipo di tessuto, sono state separate utilizzando il più ampio gradiente di pH, compreso tra 3 e 10, allo scopo di verificare la messa a punto del protocollo di estrazione e di solubilizzazione delle miscele proteiche.

(dati non mostrati). Successivamente le stesse miscele sono state sottoposte ad isoelettrofocalizzazione in un gradiente di pH più ristretto, per una maggiore risoluzione delle mappe proteiche, così da discriminare eventuali spot aggiuntivi che potessero rappresentare modificazioni post-traduzionali di proteine già rilevate.

La migliore risoluzione per la mappa proteica del tessuto di substantia nigra è stata ottenuta nell'intervallo di pH compreso tra 4 e 7 come mostra la Figura 1 (A, A'), mentre il profilo proteico dello striato è stato discriminato in misura soddisfacente in un intervallo di pH compreso tra 5 e 8 (Fig. 1 B, B').

L'analisi dei gel è stata condotta mediante il software d'analisi d'immagine PDQuest (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA), che ha permesso di confrontare spot proteici corrispondenti, nei tessuti in neurodegenerazione rispetto ai controlli, valutandone quantitativamente l'intensità di espressione.

Come mostra la Figura 1, nel profilo proteico del tessuto di substantia nigra, trattata con 6-OHDA, non appaiono tre degli spot presenti, invece, nella mappa del controllo e tre spot mostrano intensità significativamente minore rispetto agli spot corrispondenti del tessuto normale. Tre spot, invece, si rivelano up-regolati rispetto al controllo. (Fig. 1 A, A')

Nel profilo proteico del tessuto striato ipsolaterale tre spot mostrano un aumento di intensità, confrontati con i corrispettivi spot del controllo (Fig. 1 B, B').

I due spot che appaiono intensamente espressi nel profilo proteico del tessuto di substantia nigra trattata con 6-OHDA rispetto al controllo, sono stati identificati, mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, come α -enolasi (Fig. 1 A') ed i tre spot, selezionati nel profilo proteico del tessuto striato in neurodegenerazione, corrispondono alla β -actina (Fig. 1 B').

Discussione

Il risultato più importante del nostro studio proteomico preliminare è l'identificazione dell'aumentata espressione delle due proteine, α -enolasi e β -actina, nei profili proteici di substantia nigra trattata con 6-OHDA e dello striato ipsolaterale, rispettivamente.

L' α -enolasi è una delle subunità che compongono l'enzima enolasi, il quale converte il 2-fosfoglicerato in fosfoenolpiruvato, nel processo della glicolisi.

L'enzima attivo è un dimero, formato da subunità differenti: α , β , e γ . Le isoforme $\alpha\gamma$ e $\gamma\gamma$ sono i dimeri prevalenti nel cervello e rappresentano la cosiddetta enolasi neurone-specifica, mentre altre isoforme sono presenti nel cuore e nel muscolo scheletrico. La subunità γ è localizzata strettamente nei neuroni mentre le subunità α e β si trovano nelle cellule gliali³⁸.

Uno studio proteomico dei livelli di proteine nelle diverse aree cerebrali ha dimostrato che i livelli delle subunità α e β risultano aumentate nei cervelli alzheimeriani, quando confrontate con le corrispondenti aree in cervelli di controllo³⁹.

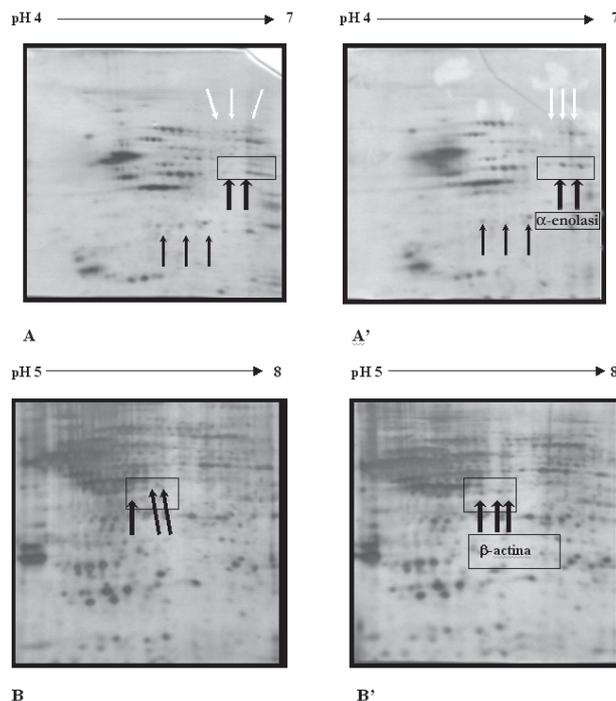


Figura 1. A, A': Confronto tra i profili proteici ottenuti da sezioni di tessuto di substantia nigra, risolti in gradiente di pH 4-7. L'immagine mostra la posizione degli spot proteici, differentemente espressi nei due profili (A : controllo. A' : trattato con 6-OHDA). Nel tessuto di controllo sono evidenti tre spot, indicati con le frecce di colore bianco, che non compaiono nel tessuto trattato. Gli spot messi in evidenza dalle frecce in grassetto nel controllo non risultano della stessa intensità nel tessuto trattato. Gli spot indicati dal riquadro risultano, invece, pienamente risolti nel tessuto in neurodegenerazione e non nel controllo. Tali spot sono stati identificati al MALDI- TOF come α -enolasi.

B, B': Confronto tra i profili proteici ottenuti da sezioni di tessuto di striato, risolti in gradienti di pH 5-8. L'immagine mostra la posizione degli spot proteici, differentemente espressi nei due profili (B : controllo, B' : lesionato da 6-OHDA). Tali spot, racchiusi dal riquadro, appaiono espressi più marcatamente nel tessuto in neurodegenerazione, rispetto al controllo. Essi sono stati identificati al MALDI- TOF come β -actina.

La stessa proteina è risultata ossidata e modificata per nitratura in cervelli di pazienti affetti da malattia di Alzheimer^{40,41}.

Nel sistema nervoso centrale la β -actina è largamente distribuita nei neuroni, negli astrociti e nei vasi sanguigni, concentrata prevalentemente lungo la porzione periferica del pericarion neuronale e le sue proiezioni. Tale localizzazione situa l'actina in una posizione "strategica", che la espone a segnali d'innescio e le permette di produrre tensioni meccaniche capaci di modellare la superficie del pericarion⁴².

Recentemente è stato dimostrato che i livelli di gruppi carbonili nella β -actina sono significativamente più alti in estratti cerebrali di soggetti affetti da morbo di Alzheimer, rispetto ai controlli⁴³.

I nostri risultati preliminari sembrano rispecchiare alcuni aspetti descritti nella malattia di Alzheimer.

Gli aumentati livelli di α -enolasi e β -actina, da noi osservati nei tessuti in neurodegenerazione, potrebbe-

ro essere dovuti ad una modificazione ossidativa delle proteine. Il passo successivo per confermare questa ipotesi potrebbe essere proprio l'analisi dei gruppi carbonili, che rivelano danno ossidativo alle proteine.

La presenza di modificazione carboniliche è stata utilizzata come indicatore di modificazioni proteiche, in studi che hanno sottolineato come il contenuto in gruppi carbonili delle proteine aumenti all'aumentare dell'età, in diverse specie animali^{44,45} e nella substantia nigra umana di soggetti normali ed affetti da morbo di Parkinson^{46,47}.

Nel morbo di Parkinson, così come nella malattia di Alzheimer, il danno da stress ossidativo potrebbe consistere anche in una modificazione di specifiche proteine intracellulari, strutturali ed enzimi chiave, che potrebbe precedere e poi portare alla degenerazione delle neurofibrille neuronali.

E' conoscenza consolidata che l'ossidazione di proteine determina perdita della funzionalità delle stesse e, di conseguenza, anche il grado di rimozione delle proteine ossidate, da parte delle proteinasi, potrebbe diminuire, a causa della modificazione ossidativa degli aminoacidi.

Se l' α -enolasi è ossidata in maniera specifica, come è stato accertato nei cervelli di pazienti affetti da morbo di Alzheimer, il nostro studio potrebbe fornire evidenza dell'anormale attività di tale enzima e questo potrebbe contribuire a spiegare lo sbilanciato metabolismo glucidico nel morbo di Parkinson⁴⁸.

Numerosi dati di letteratura confortano l'ipotesi che il danno cellulare, indotto da elementi ossidanti, è strettamente mediato dal citoscheletro. L'aumentata espressione della β -actina, da noi osservata nello striato in neurodegenerazione, potrebbe essere dovuta proprio ad una modificazione ossidativa.

L'effetto di proteine del citoscheletro, ossidate e nitate, sulla perdita di conformazione del citoscheletro stesso^{49,50}, e sulla risposta di attivazione cellulare che porta all'apoptosi, è stato osservato nella malattia di Alzheimer⁴¹.

La conferma dei dati da noi ottenuti potrà fornire evidenze aggiuntive che molti sono gli aspetti che accomunano le malattie neurodegenerative.

Un numero sempre maggiore di studi indica che l'accumulo di proteine aberranti od erroneamente ripiegate, il cattivo funzionamento del complesso ubiquitina-proteosoma, la formazione di protofibrille, i danni da esotossicità, lo stress ossidativo, il danno mitocondriale, l'alterata omeostasi dei metalli e l'arresto del trasporto dendritico ed assonale rappresentano eventi unificanti in molte malattie neurodegenerative a progressione lenta.

Lo studio proteomico dei tessuti cerebrali, analizzando l'identità ed i livelli di espressione delle proteine, così come le variazioni di tali livelli e le possibili modificazioni post-traduzionali, che le stesse subiscono in un processo di neurodegenerazione, può rivelare quali di esse potrebbero divenire marcatori diagnostici o

bersagli potenziali di farmaci, e individuare, allo stesso tempo, una base comune per il trattamento farmacologico delle malattie neurodegenerative.

Bibliografia

1. Olanov CW and Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 1999; 2:123-44.
2. Bossy-Wetzell E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 2004; 10 Suppl :S2-9.
3. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 :26-36.
4. De Iuliis A, Burlina A, Boschetto R, Zambenedetti P, Arslan P, Galzigna L. Increased dopamine peroxidation in post-mortem parkinsonian brain. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1573 :63-7.
5. Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3 :932-42.
6. Gille G, Hung ST, Reichmann H, Rausch WD. Oxidative stress to dopaminergic neurons as models of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1018 :533-40.
7. Fiskum G, Starkov A, Polster BM, Chinopoulos C. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991 :111-9.
8. Vanacore N, Nappo A, Gentile M, Brustolin A, Palange S, Liberati A, et al. Evaluation of risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide. *Neurol Sci* 2002; 23 Suppl 2:S119-20.
9. Gorell JM, Rybicki BA, Cole Johnson C, Peterson EL. Occupational metal exposures and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology* 1999; 18 :303-8.
10. Paolini M, Sapone A, Gonzalez FJ. Parkinson's disease, pesticides and individual vulnerability. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25 :124-9.
11. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276 :2045-7.
12. Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD, Giusti P. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J*. 2004; 18:617-26.
13. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 39-42.
14. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392 :605-8.
15. von Coelln R, Dawson VL, and Dawson T. Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 175-84.
16. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299 :256-9.
17. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304 :1158-60.

18. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trocchbacher A, Schneider R, et al. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 2001; 293: 263-9.
19. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfenic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101 :9103-8.
20. Alam M, Schmidt WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* 2002; 136:317-24.
21. Perier C, Bove J, Vila M, Przedborski S. The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2003; 26: 345-6.
22. Greenamyre J T and Hastings T G Parkinson's- Divergent causes, Convergent mechanism. *Science* 2004; 304: 1120-2.
23. Nissbaum RL and Ellis C Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; 348:1356-64.
24. Layfield R, Cavey JR, Lowe J. Role of ubiquitin-mediated proteolysis in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev* 2003; 2(4):343-56.
25. Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36 :381-6.
26. Husi H, Grant SG. Proteomics of the nervous system. *Trends Neurosci* 2001; 24 :259-66.
27. Fountoulakis M. Application of proteomics technologies in the investigation of the brain. *Mass Spectrometry Reviews* 2004; 23 :231-58.
28. Cheon MS, Kim SH, Fountoulakis M, Lubec G. Heart type fatty acid binding protein (H-FABP) is decreased in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 2003; 67:225-34.
29. Fountoulakis M, Gulesserian T, Lubec G. Overexpression of C1-tetrahydrofolate synthase in fetal Down syndrome brain. *J Neural Transm Suppl.* 2003; 67: 85-93.
30. Bajo M, Fruehauf J, Kim SH, Fountoulakis M, Lubec G. Proteomic evaluation of intermediary metabolism enzyme proteins in fetal Down's syndrome cerebral cortex. *Proteomics.* 2002; 11:1539-46.
31. Butterfield DA, Boyd-Kimball D. Proteomics analysis in Alzheimer's disease: new insights into mechanisms of neurodegeneration. *Int Rev Neurobiol* 2004; 61:159-88.
32. Choi J, Forster MJ, McDonald SR, Weintraub ST, Carroll CA, Gracy RW. Proteomic identification of specific oxidized proteins in ApoE-knockout mice: relevance to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36 :1155-62.
33. Butterfield DA. Proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 2004;1000:1-7.
34. Ungerstedt U, Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol Scand* 1971; 367: 69-93.
35. Paxinos G and Watson C. The ratbrain in stereotaxic coordinates. Sydney: 2nd Edition Academic Press; 1986.
36. Hirsch EC, Hoglinger G, Rousselet E, Breidert T, Parain K, Feger J, et al. Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *J Neural Transm Suppl* 2003 65:89-100.
37. Glinka Y, Gassen M, Youdim MB. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 1997; 50 :55-66.
38. Keller A, Berod A, Dussaillant M, Lamande, Gros F and Lucas M. Coexpression of alpha and gamma enolase genes in neurons of adult rat brain, *J Neurosci Res* 1994; 38: 493-504.
39. Schonberger SJ, Edgar PF, Kydd R, Faull RL and Cooper GJ. Proteomic analysis of the brain in Alzheimer disease: molecular phenotype of a complex disease process. *Proteomics* 2000; 1:1519-28.
40. Castegna A, Aksenov M, Thongbookerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem.* 2002; 82:1524-32.
41. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR and Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease *J Neurochem* 2003; 85 :1394-401.
42. Pannese E, Procacci P, Ledda M. Ultrastructural localization of actin in the cell body of rat spinal ganglion neurons. *Anat Embryol* 1996; 194: 527-31.
43. Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW and MarkesberyWR. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2001; 103, 373-83.
44. Levine RL and Stadtman ER. Oxidative modification of protein during aging. *Exp.Gerontol* 2001; 36:1495-502.
45. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257: 1220-4.
46. Sohal RS, Windruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
47. Floor E and Wetze MG. 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* 1998; 70: 268-75.
48. Berding G, Odin P, Brooks DJ, Nikkiah G, Matthies C, Peschel T, et al. Resting regional cerebral glucose metabolism in advanced Parkinson's disease studied in the off and on conditions with [(18)F]FDG-PET. *Mov Disord* 2001; 16 :1014-22.
49. Milzani A, Dalledonne I, Vailati G, Colombo R. Prolonged oxidative stress on actin. *Arch Biochem Biophys* 1997; 339: 267-74.
50. Milzani A, Dalledonne I, Vailati G, Colombo R. Paraquat induces actin assembly in depolymerising conditions *FA-SEB J* 1997; 11: 261-70.