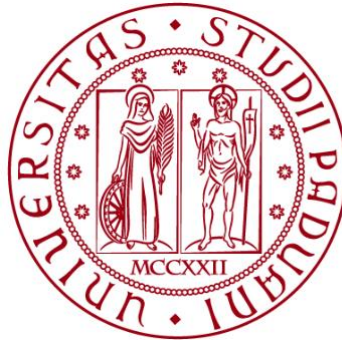


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**DROSOPHILA MELANOGASTER COME MODELLO
DI STUDIO PER L'ACCUMULO DI ALFA-SINUCLEINA
NELLA MALATTIA DI PARKINSON**

**Tutor: Prof. Marco Bisaglia
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Elena Scipioni

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Introduzione

Il seguente elaborato di tesi è focalizzato su una specifica proteina coinvolta nella patogenesi della malattia di Parkinson, la proteina alfa-sinucleina (α -syn), la quale può accumularsi a livello cellulare e assumere un ruolo patologico in seguito a mutazioni e/o fattori ambientali che ne alterano la struttura e/o la funzionalità.

L'analisi degli effetti dell'accumulo delle forme patologiche della proteina verrà studiata nell'organismo modello *Drosophila melanogaster*, anche conosciuto come moscerino della frutta, il quale offre molti vantaggi applicativi che ne facilitano lo studio. Il lavoro si propone quindi di valutare se *Drosophila melanogaster* rappresenti un buon modello di studio per esaminare le conseguenze dell'accumulo patologico dell' α -syn nella malattia di Parkinson, con l'obiettivo di studiarne i meccanismi coinvolti e sviluppare potenziali terapie efficaci.

Lo studio tratterà inizialmente le attuali conoscenze presenti in letteratura riguardanti la patogenesi della malattia di Parkinson, comprese le sue fasi; successivamente verrà analizzata nel dettaglio la proteina in questione, descrivendone la struttura, le funzionalità e i processi neurodegenerativi ad essa correlati, chiamati in generale sinucleinopatie.

Verranno poi descritte brevemente le caratteristiche di *Drosophila melanogaster*, per poi addentrarsi nel vivo di due esperimenti: il primo riguarda un deficit motorio basato sull'arrampicata, mentre il secondo riguarda un deficit non motorio basato sulla disfunzione olfattiva, sintomo prodromico della malattia.

Capitolo 1

La malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (PD) rappresenta il secondo disordine neurodegenerativo più comune a livello mondiale in termini di frequenza, dopo la malattia di Alzheimer. Nei paesi industrializzati ha un'incidenza di circa 12/100.000 persone all'anno, con 6 milioni e mezzo di pazienti affetti a livello globale, secondo gli ultimi dati risalenti al 2016, e risulta leggermente più frequente nel sesso maschile rispetto al femminile (60% vs 40%) [1; 2].

Colpisce circa l'1% della popolazione con più di 60 anni e raggiunge il 4% tra i soggetti oltre gli 85 anni: questo indica un forte fattore biologico età-dipendente tra gli agenti determinanti, eventualmente in associazione all'esposizione cumulativa a determinati fattori ambientali (ad esempio pesticidi e inquinanti dell'acqua) e comportamentali (ad esempio uso di tabacco, caffè, oppure traumi cranici) [3]. Esiste inoltre una forte componente genetica nel rischio per la malattia e mutazioni in almeno 20 geni sono riconosciute come cause di parkinsonismo familiare. Ad esempio, mutazioni nei geni codificanti per α -syn, LRRK2, VPS35, HtrA2 e EIG4G1 causano forme autosomiche dominanti di PD; invece mutazioni in parkin, DJ-1, Pink1, DNAJC6, SYNJ1 e ATP13A2 sono associate a forme autosomiche-recessive di PD [3]. Inoltre, sono stati identificati attualmente 90 loci di rischio genetico per la forma sporadica più comune della malattia, i quali sono stati riconosciuti come fattori coinvolti in percorsi metabolici comuni, tra cui la disregolazione dell'omeostasi mitocondriale, i processi alterati relativi al meccanismo di morte cellulare, segnalazione infiammatoria, traffico intracellulare e disfunzione endosomico-lisosomiale [3]. Anche se i progressi nella comprensione della patogenesi e dell'epidemiologia sono stati consistenti, le cause all'origine dell'insorgenza della malattia rimangono ancora in parte enigmatiche. Inoltre non è stata ancora trovata alcuna cura o terapia preventiva, ma ad oggi esiste soltanto una terapia farmacologica che aiuta a ristabilire i normali livelli di dopamina con l'obiettivo di ridurre la sintomatologia della malattia stessa [3].

La principale manifestazione clinica di PD consiste in disturbi motori caratterizzati da bradicinesia, tremore a riposo e rigidità, nonché cambiamenti nella postura e nell'andatura, che comportano una progressiva disabilità con compromissione delle attività quotidiane e riduzione della qualità della vita [3]. Sebbene

il PD sia definito come un disturbo del movimento, in quanto i classici sintomi motori (MS) si manifestano precocemente e sono i pilastri degli attuali criteri diagnostici, in realtà esso è anche associato ad una varietà di sintomi non motori (NMS) riscontrabili praticamente in tutti i pazienti, frequenti nelle fasi iniziali e lievi nella maggior parte dei casi, che aumentano di gravità con la durata della malattia [3]. Tra i più comuni troviamo iposmia (perdita parziale dell'olfatto), stitichezza, disfunzione sessuale e urinaria, ipotensione, depressione, perdita di memoria, dolori localizzati agli arti inferiori e disturbi del sonno. Diversi NMS associati al PD, come la perdita dell'olfatto o la costipazione, sono comunemente sperimentate dai pazienti prima dell'insorgenza dei classici sintomi motori, a volte precedendo di anni o addirittura decenni l'insorgenza dei fenotipi motori: il periodo in cui questi sintomi insorgono è stato concettualizzato come la *fase prodromica* del PD, corrispondente ad uno stadio della malattia in cui i cambiamenti neurodegenerativi coinvolgono siti extranigrali, come il tronco encefalico inferiore, il bulbo e i tratti olfattivi, e il sistema nervoso autonomo periferico [3]. È stato inoltre postulato un periodo ancora antecedente, definito *malattia di Parkinson preclinica*, in cui i futuri pazienti risultano ancora asintomatici, ma si presume che sia già presente la patologia e questa può essere riscontrata mediante specifiche analisi tramite biomarcatori [3].

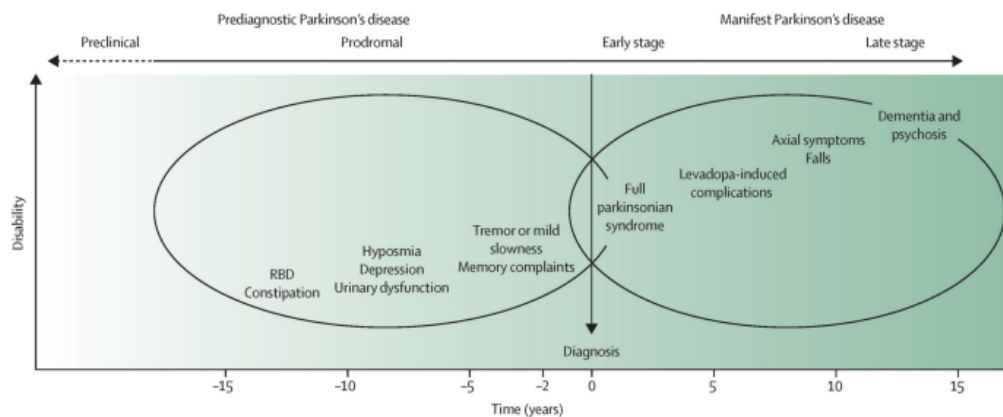


Figura 1.1: Il tempo della diagnosi è rappresentato nell'asse come tempo "0". I punti temporali sul lato sinistro della diagnosi rappresentano il numero di anni prima della diagnosi, mentre i punti temporali sul lato destro rappresentano gli anni successivi alla diagnosi. Questi periodi di tempo sono indicativi. La freccia tratteggiata indica che la durata della fase preclinica è sconosciuta, a differenza della fase prodromica, che può estendersi tra i 10 e i 15 anni [3].

I classici segni motori del PD invece, sono legati alla degenerazione nigrale e alla deplezione della dopamina striatale. Infatti, il segno neuropatologico distintivo risulta costituito da inclusioni neurali denominate *corpi di Lewy* (LB) che comportano la progressiva perdita di neuroni dopaminergici nella *substantia nigra* (SN), ovvero un nucleo dopaminergico del mesencefalo che ha un ruolo fondamentale nella modulazione del movimento. Nello specifico, questa perdita avviene nella regione definita pars compacta (SNpc), la quale contiene il precursore L-DOPA, fondamentale per la sintesi della dopamina [4].

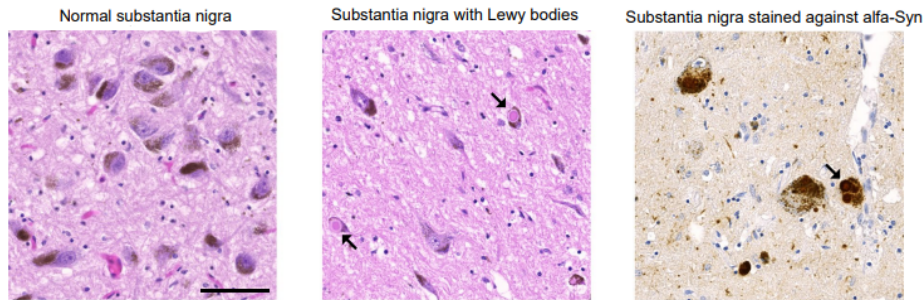


Figura 1.2: Sono mostrate le caratteristiche neuropatologiche del PD, da sinistra a destra troviamo: una normale sezione istologica della SN senza alcuna caratteristica di PD; tessuto di SN di un paziente con PD con LB (freccie) e perdita di neuroni pigmentati/dopaminergici; una colorazione immunohistochimica contro α -syn dello stesso paziente con PD che mostra LB intraneuronal e neuriti di Lewy [5].

I LB sono composti da strutture di membrana vescicolare e organelli dismorfici in combinazione con aggregati proteici contenenti la proteina α -syn come componente principale. Alcuni studi effettuati post-mortem suggeriscono che la comparsa graduale dei LB sia correlata alla progressione della malattia e, sulla base di questo, Braak e collaboratori ([6]) hanno sviluppato uno schema di stadiazione neuropatologica per il PD: gli autori hanno proposto che l'inizio della malattia avvenga principalmente nel bulbo olfattivo e nel sistema nervoso enterico autonomo, con una diffusione caudo-rostrale (retrograda) della patologia a corpi di Lewy nel tempo, raggiungendo infine la SNpc dove si sospetta abbia inizio la scomparsa dei neuroni dopaminergici. Secondo questo modello quindi, i LB sono considerati un marcatore per la progressione della malattia, mentre la perdita neuronale rappresenta un correlato neuropatologico dei sintomi clinici del PD [5]. Visioni alternative sostengono invece che la formazione di LB sia un processo per la disintossicazione degli aggregati patologici dell' α -syn situati in un sito dannoso nel neurone, come la presinapsi. Studi che indagano l'ultrastruttura dei LB supportano l'idea che questi siano un modo per contenere gli aggregati proteici e gli organelli degradati durante il decorso della malattia [7].

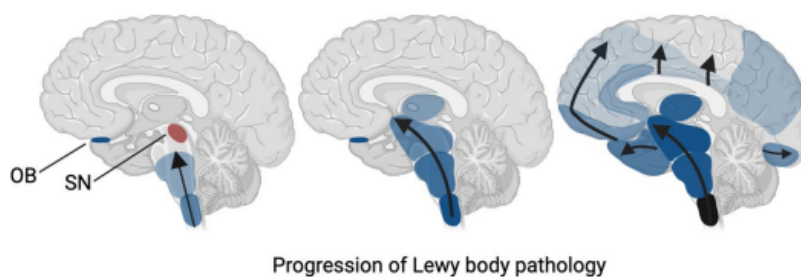


Figura 1.3: Diffusione della patologia a corpi di Lewy secondo il modello di stadiazione di Braak [5].

1.1 Le altre sinucleinopatie

Dato che i principali costituenti dei LB sono molecole di α -syn aggregate e mal ripiegate, il PD è classificato come sinucleinopatia.

Le sinucleinopatie sono malattie clinicamente e patologicamente eterogenee caratterizzate appunto da aggregati patologici di α -syn nei neuroni e nella glia, sotto forma di LB, neuriti di Lewy, inclusioni citoplasmatiche gliali e inclusioni citoplasmatiche neuronali [8]. Le sinucleinopatie possono essere suddivise in due principali patologie: la malattia a corpi di Lewy e l'atrofia multisistemica (MSA). Le comuni presentazioni cliniche della malattia a corpi di Lewy sono il PD, il PD con demenza (PDD) e la demenza a corpi di Lewy (DLB), ma si osserva anche in diversi disturbi dello sviluppo neurologico e neurometabolico, mentre la MSA ha due principali sottotipi clinici, la MSA con atassia cerebellare predominante e la MSA con parkinsonismo predominante [8].

Con malattia a corpi di Lewy ci si riferisce in generale alle malattie neurodegenerative caratterizzate dalla presenza di α -syn aggregata nel soma e nei neuriti dei neuroni (LB e neuriti di Lewy): i pazienti con PD che sviluppano demenza più tardi nel corso della malattia (all'incirca più di un anno dopo l'insorgenza del parkinsonismo) rientrano tra gli affetti da PDD; d'altra parte invece, i pazienti che sviluppano demenza, con o senza parkinsonismo, dopo un anno di sintomi cognitivi o psichiatrici, rientrano tra gli affetti da DLB. In casi sporadici, i pazienti con malattia a corpi di Lewy presentano sindromi corticali focali, come ad esempio la sindrome corticobasale, l'afasia progressiva o la sindrome di Capgras [8].

La MSA invece è un disturbo del movimento caratterizzato da una combinazione variabile di insufficienza autonoma, necessaria per la diagnosi clinica di MSA (prevede ad esempio l'incontinenza urinaria e l'ipotensione ortostatica), atassia cerebellare, sintomi non motori (come il disturbo comportamentale del sonno REM, disturbi respiratori del sonno, disfagia, disfonia grave e disartria) e parkinsonismo non responsivo alla levodopa, precursore della dopamina (questa responsività è una caratteristica di supporto del PD ed è utile per differenziare tale malattia dalle sindromi parkinsoniane atipiche) [8]. A differenza della PDD e della DLB, la demenza non rientra tra le caratteristiche tipiche della MSA, nonostante esista un sottogruppo di pazienti con MSA che sviluppa deficit cognitivi, in particolare disfunzione esecutiva [8].

Uno dei sintomi non motori più frequenti sia nella malattia a corpi di Lewy che nella MSA è il disturbo comportamentale del sonno REM (RBD), una parasonnia caratterizzata da comportamenti onirici dovuti alla mancanza di atonia muscolare durante il sonno REM, il quale infatti rientra tra le principali caratteristiche cliniche nei criteri diagnostici [8]. Inoltre, nelle sinucleinopatie, RBD spesso precede i sintomi motori o altri sintomi non motori e diversi studi di osservazione hanno dimostrato che fino all'80% dei pazienti con RBD isolato sviluppa in seguito caratteristiche cliniche riconducibili a sinucleinopatie, tra cui PD, DLB o MSA. Pertanto, RBD isolato può essere considerato una fase prodromica delle sinucleinopatie [8].

Per quanto riguarda l'eterogeneità delle malattie appena descritte, non è ancora noto come la stessa proteina possa essere associata a patologie distinte e quali

siano i fattori determinanti la specifica vulnerabilità neuroanatomica, anche se evidenze sempre più rilevanti suggeriscono che forme distinte di aggregati dell' α -syn possano essere associate a diversi disturbi. Infatti, a sostegno di ciò, diversi studi che hanno utilizzato l' α -syn estratta dalla MSA e dalla malattia a corpi di Lewy hanno mostrato attività di aggregazione distinte tra le malattie in vitro e in vivo [8]. Questi esperimenti indicano quindi che l' α -syn derivata dalle inclusioni citoplasmatiche gliali (GCI) nella MSA ha una capacità aggregante più potente in vitro e in vivo rispetto a quella derivata dai corpi di Lewy, che può essere correlata ad un decorso più aggressivo della malattia nella MSA rispetto alla malattia a corpi di Lewy [8]. Inoltre, la specifica capacità di ciascuna patologia nell'indurre l'aggregazione potrebbe riflettere le differenze conformazionali delle fibrille dell' α -syn [8].

Attualmente non esistono terapie che modificano il decorso delle sinucleinopatie, ma le informazioni ottenute dalla genetica molecolare e dai modelli che esplorano i meccanismi di conversione dell' α -syn in oligomeri patologici e fibrille insolubili offrono speranza per eventuali terapie future.

Nell'intento di sviluppare terapie capaci di arrestare la malattia, è prima di tutto essenziale chiarire come l' α -syn si converta in oligomeri patologici e fibrille. L'ipotesi che le differenze clinico-patologiche delle sinucleinopatie siano legate a diverse forme aggregate di α -syn è supportata da numerose prove sperimentali provenienti da saggi di aggregazione e da studi di biologia strutturale avanzata [8]. Si prospetta che, grazie all'utilizzo di diverse forme di α -syn come biomarcatore, l'accuratezza e la velocità diagnostica probabilmente miglioreranno, così da poter intervenire in maniera precoce e di conseguenza avere maggiori informazioni cliniche per future terapie che possano modificare la malattia [8].

α -sinucleina

2.1 Struttura

Il gene che codifica per l' α -syn, SNCA, è stato il primo gene ad essere identificato come gene causativo per il PD familiare [9]. Fino ad oggi, sei mutazioni missenso (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T e A53E) e mutazioni di duplicazione e triplicazione genica sono state associate a forme familiari della malattia, che complessivamente riguardano circa il 5-10% di tutti i casi [9]. Inoltre, gli studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) hanno sottolineato un dato ancora più importante, che riguarda l'identificazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nel gene SNCA come principali fattori di rischio per la forma sporadica del PD. Questi dati enfatizzano come l' α -syn svolga un ruolo cruciale nella patogenesi del PD [9].

L' α -syn è una proteina di 140 amminoacidi che in soluzione acquosa non acquisisce una struttura definita, da cui il termine "proteina nativamente destrutturata". Tuttavia, tale proteina tende a formare sia strutture α -elicoidali, quando si lega a lipidi caricati negativamente come i fosfolipidi presenti nelle membrane cellulari, sia strutture ricche di foglietti β come quelle che si trovano nei LB [10]. La proteina è composta da tre domini distinti:

- un dominio strutturale amminico (N-terminale, residui 1-60), contenente motivi leganti i lipidi, che possono formare eliche anfifiliche che conferiscono la tendenza a formare strutture α -elicoidali sul legame della membrana [10];
- una regione idrofobica centrale (61-95 residui) contenente un dominio altamente amiloidogenico, noto come dominio della componente non amiloide- β (NAC), e che è coinvolta nella formazione dei foglietti β , fondamentali per l'aggregazione dell' α -syn [10];
- un terminale carbossilico (C-terminale, 96-140 residui) che è fortemente carico negativamente ed è incline ad essere destrutturato. L'assenza di quest'ultima regione si traduce in un aumento del potenziale di aggregazione ([8]);

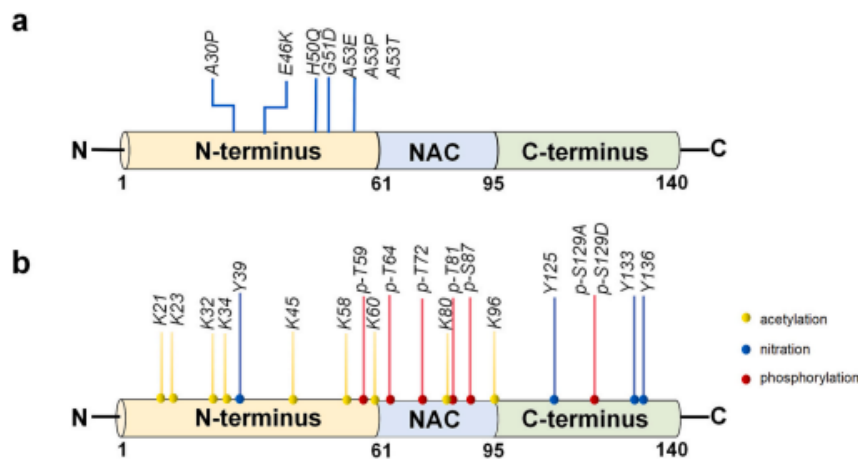


Figura 2.1: (a) siti di mutazione multipli (A30P, E46K, H50Q, A53E, A53P, A53T) concentrati al dominio N-terminale; (b) I siti di modificazione post-traduzionale di α -syn, compresa l'acetilazione (in giallo), la nitratazione (in blu) e la fosforilazione (in rosso) [11].

L' α -syn fa parte della famiglia delle proteine della sinucleina, che comprende anche la β -sinucleina e la γ -sinucleina. Ciò che distingue strutturalmente l' α -syn dalle altre forme è la regione NAC, al centro della proteina. Tutti e tre i membri della famiglia sono in prevalenza proteine neuronali che in condizioni fisiologiche si localizzano preferenzialmente ai terminali presinaptici [10].

L' α -syn è abbondantemente presente nel sistema nervoso, rappresentando circa l'1% delle proteine citosoliche totali ed ha una conformazione dinamica che influenza i contatti idrofobici ed elettrostatici della catena oligomerica e le interazioni a lungo raggio tra la regione NAC e il dominio C-terminale, così come tra l'N-terminale e il C-terminale, che ne impediscono l'aggregazione [11]. In condizioni fisiologiche, l' α -syn esiste in un equilibrio dinamico tra una conformazione disordinata e una conformazione multimerica α -elicoidale, associata alla membrana, che si esprime abbondantemente in tutto il cervello, localizzandosi comunemente al terminale presinaptico, dunque non all'interno delle vescicole sinaptiche ma nelle immediate vicinanze, oltre ad essere molto abbondante, per ragioni poco chiare, negli eritrociti e nelle piastrine [10; 11]. Negli ultimi anni inoltre, evidenze sperimentali hanno dimostrato che l' α -syn è contenuta anche nei mitocondri, nel reticolo endoplasmatico (ER) e nei nuclei dei neuroni, sebbene esista in un livello significativamente inferiore in questi organelli rispetto ai terminali presinaptici [10].

2.2 Funzioni

La funzione fisiologica dell' α -syn rimane per certi aspetti enigmatica, nonostante circa 30 anni di ricerca. Valutare la normale funzione dell' α -syn risulta alquanto impegnativo, per diversi motivi:

- l' α -syn è una proteina intrinsecamente non strutturata che assume uno stato elicoidale sulle membrane [12];

- la sovraespressione di α -syn innesca effetti tossici nell'uomo e nei modelli animali, che sono molto peggiori degli effetti che sarebbero invece causati dalla sua perdita e questo complica i risultati in tali modelli [12];
- la potenziale compensazione della funzione dell' α -syn da parte delle sue isoforme, citate precedentemente, complica ulteriormente i risultati nei modelli animali con knockout e richiede l'eliminazione simultanea di tutte le isoforme o la manipolazione acuta [12].

Sebbene le funzioni dell' α -syn non siano completamente chiare, si ritiene che svolga un ruolo nella regolazione del rilascio dei neurotrasmettitori, dell'attività sinaptica, della plasticità sinaptica e del metabolismo della dopamina [12]. Essa sembra essere infatti un fattore importante per il rilascio di neurotrasmettitori nella sinapsi e per regolare la mobilità e il traffico delle vescicole sinaptiche; inoltre si ritiene che l' α -syn regoli la fase di attracco delle vescicole sinaptiche alla membrana plasmatica e partecipi alla loro formazione [12]. Questo ruolo dell' α -syn nel traffico delle vescicole risulterebbe coerente con la sua associazione con elementi del citoscheletro: in particolare, è stato riportato che l' α -syn si leghi alle subunità della tubulina, influenzando così l'organizzazione e la dinamica dei microtubuli. Inoltre, l' α -syn sembra regolare la dinamica dei microfilamenti a livello della zona attiva durante il movimento delle vescicole sinaptiche [11].

A livelli normali, l' α -syn mantiene i livelli fisiologici di dopamina regolando il rilascio periodico di vescicole sinaptiche: questo sostiene l'attività e la riserva del pool di vescicole e di conseguenza il rilascio di dopamina preserva l'omeostasi sinaptica [12].

Inoltre, le terminazioni nervose presinaptiche rilasciano neurotrasmettitori ripetutamente, spesso ad alta frequenza e con un relativo isolamento dai corpi cellulari neuronali: questo rilascio ripetuto richiede cicli di assemblaggio e disassemblaggio del complesso SNARE ed è stato dimostrato che l' α -syn si lega alle proteine SNARE, le quali mediano la fusione di membrana nella trasmissione sinaptica e nella crescita cellulare, e l' α -syn poi promuove l'assemblaggio delle proteine SNARE in complessi SNARE durante la fusione [12].

L'effetto dell' α -syn sulla neurotrasmissione e sulla plasticità sinaptica è stato studiato sia in condizioni di knockout che in condizioni di sovraespressione, dove è stato riportato che l' α -syn può promuovere o inibire il rilascio di neurotrasmettitori, oppure non sortire alcun effetto: mentre alcuni studi hanno riportato una mancanza di effetto dell' α -syn sul rilascio di neurotrasmettitori, altri hanno rilevato un miglioramento della trasmissione sinaptica o una diminuzione del rilascio [12]. Resta ancora da determinare se i risultati incoerenti ottenuti per gli effetti dell' α -syn sulla neurotrasmissione e sulla plasticità sinaptica possano essere attribuiti ai modelli sperimentali utilizzati e alle regioni cerebrali studiate. Tuttavia, ciò che sembra essere chiaro è che l' α -syn non sia necessaria per la neurotrasmissione basale, ma svolga un ruolo importante nel mantenimento dei neuroni durante l'intensa attività neuronale e nel corso della loro lunga vita [12]. Nel complesso, l'effetto dell' α -syn sul rilascio di neurotrasmettitori non sembra essere mediato dall'azione diretta sul meccanismo di rilascio, ma dall'influenza dell'organizzazione spaziale di distinti pool di vescicole sinaptiche all'interno

del terminale presinaptico, probabilmente attraverso la multimerizzazione dell' α -syn, la quale è innescata dal legame di membrana e rafforza l'assemblaggio del complesso SNARE [12]. Questa attività dell' α -syn contribuirebbe al funzionamento a lungo termine del sistema nervoso, indicando che alterazioni della sua funzione fisiologica potrebbero promuovere lo sviluppo della neuropatologia nel PD e nei disturbi correlati [12].

In sintesi, quindi, si ritiene che l' α -syn contribuisca ai processi fisiologici di trasporto sinaptico, mantenendo la normale funzione e integrità delle sinapsi; infatti, nell'invecchiamento del sistema nervoso, la disfunzione dell' α -syn diventa un fattore predisponente per la disfunzione sinaptica e lo sviluppo di neuropatologie. Infine, nei neuroni dopaminergici, sembra mediare la sintesi, l'immagazzinamento e il rilascio di dopamina [12]. Questo variegato insieme di funzioni molecolari e biologiche dell' α -syn, una proteina relativamente piccola, risiede nella sua struttura e, più precisamente, nella sua mancanza di una struttura unica e rigida [13].

2.3 Neurodegenerazione

L' α -syn è una delle proteine più abbondanti nel cervello, per cui i neuroni risultano estremamente sensibili al cambiamento dei livelli della sua espressione, tanto che anche solo una minima quantità di aggregazione anomala potrebbe portare alla comparsa di sintomi clinici [11]. L'aggregazione proteica permette all' α -syn di passare dal suo ruolo fisiologico ad un guadagno di funzione tossico patologico [11].

Lo sviluppo di diverse sinucleinopatie può avere origine dall'errata regolazione dell' α -syn, accompagnata o risultante dal suo errato ripiegamento [13]. Infatti, mutazioni e/o cambiamenti nell'ambiente possono ridurre la capacità dell' α -syn di riconoscere i propri partner di legame, portando così alla formazione di aggregati non funzionali e tossici [13]. È importante quindi capire come si formano questi aggregati e quali fattori possono promuovere o inibire la loro formazione. Le mutazioni puntiformi possono portare ad alterazioni anomale dell' α -syn; ad esempio, le mutazioni missenso nel gene SNCA possono portare alla perdita di funzionalità dell' α -syn [11]. Inoltre, le mutazioni in E46K, H50Q e A53T rilevano un drastico aumento della cinetica di aggregazione, mentre le mutazioni A30P, G51D e A53E compromettono la capacità dell' α -syn di interagire con le membrane lipidiche, provocando direttamente la perdita di funzione dell' α -syn [11]. Oltre a mutazioni nella sequenza, l'aggregazione dell' α -syn è influenzata anche da varie modificazioni post-traduzionali come la fosforilazione, l'acetilazione, la nitrificazione e l'ossidazione, che sono state riconosciute nel cervello post-mortem dei pazienti umani affetti da PD e successivamente osservate anche in modelli sperimentali [11]. In particolare, le modificazioni post-traduzionali del dominio C-terminale possono aumentare la propensione all'aggregazione dell' α -syn ed influenzare la capacità di partecipare ai normali processi fisiologici in cui è coinvolta [11]. Infine, la disfunzione patologica può derivare anche da fattori ambientali, come ad esempio neurotossine, pesticidi ed erbicidi (tra cui rotenone e paraquat), ma nella maggior parte dei casi i potenziali effetti dei fattori ambientali sono modulati in base alla suscettibilità genetica soggettiva dell'individuo [13].

Nel processo patologico di formazione delle fibrille si sviluppano varie forme intermedie dell' α -syn: si tratta di forme oligomeriche inizialmente solubili che assumono caratteristiche sferiche, ad anello e simili a stringhe quando vengono osservate al microscopio elettronico [13]. Tali strutture intermedie, collettivamente chiamate protofibrille, diventano gradualmente insolubili e si fondono in fibrille insolubili più ordinate ed infine trasformate in fibrille amiloidi mature e grandi inclusioni, ovvero i LB, che rappresentano nuclei attivi sottoposti ad allungamento e proliferazione e che accelerano la formazione delle fibrille in modo esponenziale [13]. La fase limitante dell'intero processo di aggregazione, si ritiene essere la formazione spontanea di questi piccoli intermedi oligomerici metastabili, i quali rappresentano quindi la vera forma patologica, piuttosto che i LB, i quali invece potrebbero rappresentare una forma di riorganizzazione strutturale delle fibrille e il loro sequestro all'interno di tali corpi sarebbe quindi un meccanismo di disintossicazione per ridurre le interazioni aberranti delle fibrille con proteine o organelli citosolici [13].

Questi oligomeri, aventi un'ampia gamma di foglietti β , possono localizzarsi a livello di diversi organelli intracellulari. Ad esempio, si possono localizzare nei mitocondri influenzandone significativamente la funzione fisiologica [13]. Sembrano inoltre alterare la degradazione proteica e la trasmissione sinaptica nelle cellule neuronali, inducendo così cambiamenti degenerativi. Ad esempio, l' α -syn oligomerica inibisce l'attracco delle vescicole del reticolo endoplasmatico (ER) al Golgi, il che si traduce in stress del ER [13]. Inoltre, potendo l' α -syn influenzare la dinamica dei microtubuli e dei microfilamenti, la sua forma patologica può interrompere la plasticità del citoscheletro, coinvolto nel flusso delle vescicole sinaptiche, inducendone la degenerazione. Infine, se in condizioni fisiologiche l' α -syn monomerica migliora l'efficienza dell'ATP sintasi, la sua forma oligomerica invece induce l'ossidazione selettiva della subunità beta dell'ATP sintasi e la perossidazione lipidica mitocondriale; questi eventi di ossidazione aumentano la probabilità di apertura del poro di transizione di permeabilità, innescando morte cellulare [14].

Riassumendo, le conseguenze citopatologiche dei processi appena descritti, derivanti dall'accumulo dell' α -syn nei neuroni, sono associate allo stress ossidativo, alla disfunzione mitocondriale e del trasporto vescicolare, al traffico alterato di vescicole sinaptiche tra l'ER e il Golgi, nonché alla perdita dell'integrità della membrana, che sono rilevanti per lo sviluppo del PD. Ulteriori conseguenze includono l'alterazione del sistema del proteasoma dell'ubiquitina e la compromissione del sistema immunitario, con reazione infiammatoria, senescenza cellulare e cambiamenti genetici [11].

Sebbene il processo patologico non sia completamente compreso, si ritiene che il legame dell' α -syn alle membrane lipidiche sia un mediatore chiave dell'oligomerizzazione e dell'aggregazione dell' α -syn [8]. Le membrane lipidiche possono promuovere l'aggregazione dell' α -syn e le specie oligomeriche provocano la permeabilizzazione della membrana, che ne può interrompere l'integrità. Questa perdita di integrità della membrana nucleare può anche innescare l'aggregazione dell' α -syn attraverso l'interazione tra essa e fattori proaggreganti nucleari, come gli istoni [8].

Come accennato nel Capitolo 1, il segno patologico caratteristico del PD è la

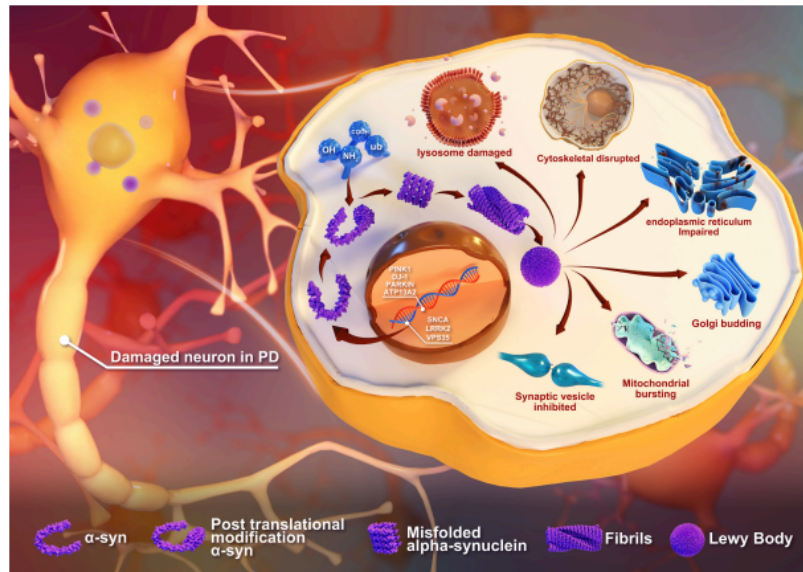


Figura 2.2: La fisiopatologia della α -syn nella malattia di Parkinson [11].

perdita di neuroni dopaminergici nella SN e la conseguente carenza di segnalazione della dopamina. Nonostante gli enormi passi avanti nella comprensione della funzione e della disfunzione dell' α -syn, l'aumento della vulnerabilità dei neuroni dopaminergici rimane poco chiaro a livello meccanicistico. L' α -syn si lega e regola l'attività del trasportatore della dopamina (DAT), anche se la sua modalità d'azione rimane controversa [12]. L' α -syn inibisce la sintesi della dopamina inibendo l'espressione e l'attività della tirosina idrossilasi (TH, precursore delle catecolammine, tra cui la dopamina), probabilmente riducendone lo stato di fosforilazione e stabilizzando la sua forma inattiva defosforilata. In accordo con questo, gli aumenti dell'espressione dell' α -syn nella SN, legati all'invecchiamento, sono correlati negativamente all'espressione della TH [12].

L'accumulo o la mutazione anomala dell' α -syn riduce quindi il rilascio di dopamina influenzando l'esocitosi dei neuroni o diminuendo la disponibilità di vescicole nel pool di recupero attraverso la compromissione dell'endocitosi delle vescicole. Inoltre, è stato riportato che l' α -syn raggruppa vescicole sinaptiche nei neuroni: questa attività di raggruppamento dell' α -syn limita la motilità delle vescicole sinaptiche e quindi probabilmente influisce sulla cinetica del rilascio di neurotrasmettitori [15].

Infine, è stato dimostrato che dopo il danno ai neuroni nella SN nei pazienti con PD, i neuroni patologici vengono rilasciati in essa, permettendo all' α -syn di attivare la microglia, che successivamente produce mediatori pro-infiammatori [13]. Successivamente, lo stress ossidativo, le neurotossine e le interazioni con gli agonisti del recettore della dopamina aumentano ulteriormente il processo patologico di aggregazione e accumulo dell' α -syn [13].

Capitolo 3

Drosophila melanogaster come modello di studio per la malattia

3.1 Introduzione a *Drosophila melanogaster*

Gli studi più rilevanti riguardo il PD sono stati condotti utilizzando organismi modello come topi, moscerini della frutta e vermi. Tra questi, *Drosophila melanogaster* è emersa come un eccellente organismo modello per studiare in vivo sia fattori ambientali che genetici, fornendo preziose informazioni sui meccanismi patogenetici e facilitando così lo sviluppo di potenziali strategie terapeutiche.

Drosophila melanogaster, comunemente nota come moscerino della frutta, è infatti un potente organismo utilizzato per comprendere la patogenesi di diverse malattie neurodegenerative umane [16].

I moscerini della frutta sono molto apprezzati in laboratorio perché sono animali poco esigenti e che richiedono una manutenzione poco costosa; inoltre, possono essere facilmente maneggiati, allevati in gran numero e manipolati geneticamente [17]. Il loro rapido ciclo di sviluppo e la breve durata di vita consentono l'analisi di un elevato numero di moscerini geneticamente modificati, permettendo di studiare gli effetti dei fenotipi di malattie associate all'invecchiamento. Al giorno d'oggi, infatti, grazie alla sua facile mutagenizzazione, *Drosophila* ha permesso di modellare diverse malattie umane, le quali coprono una vasta gamma di alterazioni fisiologiche, tra cui disfunzioni metaboliche e neurodegenerazione [17].

La *Drosophila* ha un sistema nervoso ben definito che consiste in circa 100.000 neuroni e comprende un sottoinsieme di circa 200 neuroni dopaminergici (DA) [18]. Nonostante l'anatomia del cervello del moscerino e la distribuzione dei neuroni DA nel sistema nervoso centrale di *Drosophila* differiscano da quella del cervello dei vertebrati, è stato riscontrato che in entrambi sono conservate molte caratteristiche biologiche, cellulari e molecolari fondamentali dello sviluppo e della funzione neuronale ([19]); inoltre, studi genomici comparativi stimano che fino al 75% dei geni umani implicati in varie malattie siano conservati in *Drosophila* [20]. Il genoma di *Drosophila* è di dimensioni più piccole e ha un

numero minore di geni rispetto al genoma umano, il che facilita gli studi genetici; di conseguenza, molte famiglie di geni umani che sono composte da paraloghi con ridondanza di funzioni sovrapposte, corrispondono ad un singolo gene o ad una famiglia di geni più piccola in *Drosophila* [17].

Mentre la maggior parte dei geni umani implicati nel PD ha delle controparti in *Drosophila*, non sembra esserci un ortologo del gene SNCA nel moscerino e dunque per la valutazione della relazione causale tra di esso e le anomalie del PD si deve procedere con l'espressione transgenica dell' α -syn nei modelli di *Drosophila* [19]. Il fatto che le mutazioni patogenetiche e la moltiplicazione di SNCA causino il PD con un pattern di ereditarietà dominante nei pazienti implica un meccanismo tossico di guadagno di funzione; pertanto, sono stati stabiliti moscerini transgenici che esprimono l' α -syn wild-type (WT) o mutante per chiarire gli effetti delle mutazioni familiari dell' α -syn legate al PD, le sue modificazioni post-traduzionali e i meccanismi molecolari implicati nella neurodegenerazione [9].

Già all'inizio del presente secolo sono stati sviluppati modelli di moscerini transgenici per il PD che esprimono l' α -syn umana, capaci di ricapitolare diverse caratteristiche della patologia, tra cui la disfunzione locomotoria, la formazione di corpi di inclusione simili ai LB, la progressiva perdita di neuroni DA e l'accorciamento della durata della vita, anche se l'aspettativa di vita dei pazienti con un'età media di insorgenza (60 anni) è ora quasi paragonabile a quella della popolazione generale, grazie ai sostanziali progressi nelle cure mediche [21].

L'analisi comportamentale motoria più comune utilizzata per i moscerini che esprimono l' α -syn è il test di arrampicata, il cosiddetto *climbing assay*, che verrà analizzato nel paragrafo seguente, il quale utilizza una risposta di fuga innata, ovvero il comportamento di geotassi negativa dei moscerini per valutare la loro funzione locomotoria: quando delicatamente sbattuti sul fondo di una provetta, i moscerini risalgono verso l'alto potendone valutare il numero e/o la velocità dei moscerini rampicanti [9].

Inoltre, sono stati valutati nei moscerini modello di PD anche deficit non motori, di cui verrà analizzato un ulteriore esperimento nei paragrafi a seguire, tra cui il comportamento anomalo del sonno, i deficit olfattivi, l'ansia e la disfunzione cognitiva.

3.2 Esperimento di deficit motorio

Feany e Bender ([21]) nel 2000 furono i primi a sviluppare modelli di *Drosophila* transgeniche esprimenti l' α -syn umana per modellare il PD ed in particolare andarono ad applicare il test di arrampicata per valutare i deficit di locomozione conseguenti all'espressione di forme mutanti per l' α -syn. Questo esperimento fu la base di partenza per i successivi esperimenti di tale genere, tanto che ancora oggi viene continuamente citato in letteratura. Tuttavia, negli anni a venire non mancarono le critiche e le modifiche apportate a questo tipo di esperimento.

Come primo passo, i due autori hanno prodotto linee transgeniche contenenti l' α -syn umana WT e linee separate esprimenti due proteine mutanti associate al PD familiare, α -syn A30P e A53T; essi hanno utilizzato un sistema di espressione binario basato sull'attivazione trascrizionale da parte del fattore di trascrizione

del lievito GAL4 che, interagendo con un'opportuna sequenza a monte del gene codificante l' α -syn WT e mutante nei moscerini, ne permette l'espressione [21]. In particolare, in specifiche linee di moscerini sono stati collocati a valle del sito di legame per GAL4 dei costrutti di DNA per l'espressione dell' α -syn umana WT e mutante. Gli animali transgenici, portatori di questi costrutti in grado di reagire con la proteina GAL4, sono poi stati incrociati con una serie di linee esprimenti la proteina GAL4 in modo tessuto-specifico attraverso promotori endogeni (driver) [21].

I ricercatori notarono che il sistema nervoso era correttamente formato nei moscerini con l' α -syn transgenica e che il cervello non mostrava cambiamenti degenerativi diffusi; anche il volume complessivo del cervello era conservato in molti pazienti con PD, ma notarono una preferenziale e marcata degenerazione in gruppi specifici di neuroni, ossia i neuroni DA [21].

Successivamente dunque, essi hanno esaminato questo gruppo di neuroni in *Drosophila* esprimenti l' α -syn transgenica, utilizzando più marcatori indipendenti: in primo luogo, essi hanno colorato l'intero cervello di individui adulti con un anticorpo contro la TH, che identifica specificamente i neuroni DA [21]. Mediante l'immunocolorazione i ricercatori si sono soffermati su due importanti gruppi di neuroni DA, i cluster dorsomediali (DMC), i quali si trovano nella regione dorso-posteriore del protocervello superiore [18]. Queste cellule sono presenti nei controlli a partire da un giorno, non si perdono con l'età ed infatti possono essere identificate nei moscerini di 60 giorni. Gli autori hanno poi constatato che la durata della vita dei moscerini di controllo e transgenici era di circa 60 giorni nelle condizioni di crescita a 25°C. Tuttavia, i moscerini che esprimevano l' α -syn a livello pan-neurale mostravano una marcata perdita dei neuroni DA dorsomediali, strettamente correlata all'avanzare dell'età [21]. Infatti, andando a considerare individui giovani esprimenti l' α -syn WT o mutanti patogenici, il cluster dorsomediale era costituito da quattro o cinque neuroni, mentre nei moscerini di 30-60 giorni d'età il cluster era assente o costituito da una singola cellula positiva alla TH, indicando un effetto tossico esercitato dalla proteina su questa popolazione neuronale [21].

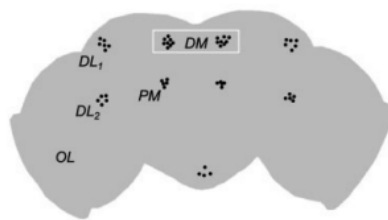


Figura 3.1: Diagramma della distribuzione delle cellule DA nel cervello adulto di *Drosophila* in prossimità dei cluster dorsomediali (DMC) (basato su Budnik e White, 1988). L'area delimitata dal rettangolo rappresenta i DMC. DM, dorso-mediale; DL, dorsolaterale; PM, cluster posteriomediale; OL, a lobi ottici [22].

Per confermare ulteriormente la degenerazione dei neuroni DA in moscerini transgenici per l' α -syn, i ricercatori hanno quindi utilizzato una linea contenente il promotore del gene della DOPA decarbossilasi (Ddc-GAL4), un altro marcatore

dei neuroni DA, che ne permette l'identificazione mediante opportuni anticorpi: i moscerini transgenici esprimenti l' α -syn A30P in tale linea hanno mostrato una robusta immunocolorazione per l' α -syn già ad un giorno di età [21]. Tuttavia, dopo 30 giorni, non veniva rilevata alcuna immunocolorazione per l' α -syn associata ai corpi cellulari e tale risultato risulta quindi coerente con la degenerazione dei neuroni DA [21].

Dunque, sebbene l'espressione pan-neurale dell' α -syn nel cervello non produca alcuna perdita di volume dimostrabile nella corteccia cellulare esterna, tramite i risultati essi hanno potuto dimostrare che la neurodegenerazione indotta dall' α -syn mostra una specificità per i neuroni DA [21].

Inoltre, la microscopia elettronica ha mostrato la presenza di inclusioni di α -syn patologiche, filiformi e granulose, che sono comparse a 20-30 giorni di età (il tempo di comparsa dipende dal livello di espressione della proteina), quando l'espressione dell' α -syn è pan-neurale: la morfologia generale delle inclusioni, la natura filamentosa e granulare degli aggregati e le dimensioni e la disposizione dei filamenti ricordavano a tutti gli effetti i LB umani, mentre non era presente alcuna immunoreattività in campioni trattati in modo identico provenienti da controlli della stessa età [21].

Dopo aver osservato la degenerazione neuronale e la diffusa formazione di inclusioni presenti nei modelli transgenici, gli autori hanno poi cercato manifestazioni comportamentali di disfunzione del sistema nervoso: il comportamento locomotorio risultava approssimativamente conservato nei giovani, mentre invece si è osservato che i moscerini transgenici con α -syn pan-neurale sviluppavano disfunzione locomotoria in età adulta [21].

A tal proposito, 40 moscerini sono stati messi in una provetta di plastica e delicatamente picchiettati sul fondo della fiala; il numero di moscerini capaci di salire nella parte superiore della fiala è stato contato dopo 18 secondi e sono state eseguite 20 prove per ogni intervallo temporale [21]. I dati mostrati rappresentano i risultati di un gruppo di moscerini testati in serie per 55 giorni e nel complesso l'esperimento è stato ripetuto tre volte, con linee transgeniche derivate indipendentemente, ottenendo risultati simili da ogni esperimento [21].

I moscerini WT normalmente presentano una geotassi negativa in risposta ad uno stimolo "stressante": ciò significa che quando vengono picchiettati sul fondo di una provetta, i moscerini salgono rapidamente verso la parte superiore della fiala e la maggior parte di loro rimane lì [21]. I ricercatori hanno osservato che le mosche transgeniche per l' α -syn inizialmente salivano come i controlli, ma all'avanzare dell'età le prestazioni diminuivano più rapidamente rispetto a questi ultimi [21]. Il crescente e sostenuto declino della capacità di arrampicata nei moscerini transgenici dimostra quindi un deficit funzionale prodotto dall'espressione dell' α -syn nel sistema nervoso e il decorso temporale di tale disfunzione locomotoria risulta parallelo alla degenerazione dei neuroni DA e alla comparsa di inclusioni dell' α -syn [21].

Inoltre, un effetto maggiore è stato osservato nei moscerini esprimenti l' α -syn A30P, che perdono la loro capacità di arrampicarsi prima rispetto a quelli che esprimono l' α -syn WT o A53T [21].

Gli autori hanno poi esaminato gli effetti indotti dall'espressione dell' α -syn in più linee transgeniche indipendenti: sia per l' α -syn WT che per le forme mutan-

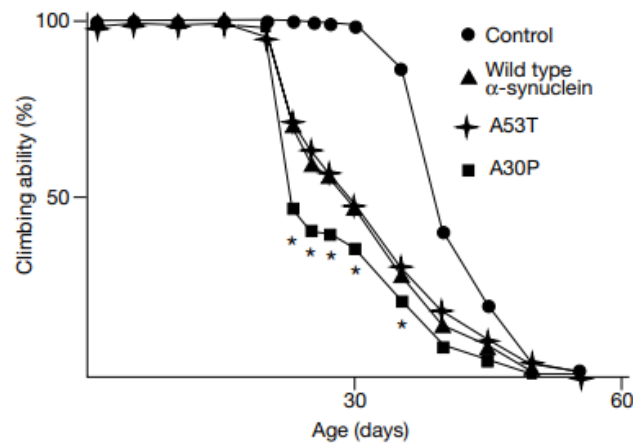


Figura 3.2: Perdita prematura della capacità di arrampicata nelle α -syn transgeniche. I moscerini che esprimono l' α -syn WT, A30P e A53T sono significativamente diversi dai controlli dal 23° al 45° giorno. Gli asterischi rappresentano punteggi per i transgenici A30P che sono significativamente diversi dai punteggi transgenici WT e A53T [21].

ti, sono state analizzate dalle 2 alle 5 linee transgeniche con un'espressione di α -syn variabile, mediante western blotting, immunofluorescenza su dischi immagginali dell'occhio e colorazione immunohistochimica su sezioni di moscerini adulti, e poi tra queste sono state comparate tra loro le linee con simili livelli di α -syn [21]. Essi hanno notato che i danni indotti dalla presenza dell' α -syn si possono estendere anche ad altre popolazioni neuronali, non essendo quindi limitati esclusivamente ai neuroni DA: mentre l'espressione selettiva dell' α -syn WT o mutante nell'occhio non ha prodotto alcun effetto durante lo sviluppo, l'espressione della proteina nell'occhio adulto dei transgenici ha prodotto una degenerazione retinica modesta entro dieci giorni e marcata a 30 giorni [21]. La degenerazione retinica nelle α -syn transgeniche mostra che in *Drosophila* i cambiamenti degenerativi correlati all' α -syn mostrano una specificità relativa piuttosto che assoluta per i neuroni DA, così come osservabile nelle persone [21].

La modesta differenza tra la tossicità dell' α -syn WT e A30P nel test locomotorio e gli effetti simili osservabili in tutte e tre le varianti dell' α -syn sulla perdita dei neuroni DA e la degenerazione retinica, risultano coerenti con il fatto che la maggior parte dei pazienti con PD presenta all'interno dei LB la forma WT della proteina, che viene incorporata nei LB [21].

In conclusione, il decorso temporale parallelo della degenerazione delle cellule dopaminergiche, della formazione di inclusioni e della disfunzione locomotoria ha quindi indicato che le tre anomalie possono essere causalmente correlate [21]. Tuttavia, è importante sottolineare che i risultati di questa analisi non furono esenti a critiche in altri studi. Ad esempio, in due studi successivi ([23; 24]) gli autori non sono stati in grado di riprodurre il difetto di geotassi negativa riportato da Feany e Bender anche quando venivano utilizzati gli stessi moscerini, ma soprattutto è stata riportata solo una perdita del 50% dei neuroni DA nei DMC, in contrasto con la perdita del 100% riportata da Feany e Bender. Il numero di neuroni DA in ciascuno di questi studi è stato valutato utilizzando

l'immunoistochimica con un anticorpo anti-TH su sezioni sequenziali di paraffina di cervelli di moscerini. Complessivamente questi dati suggeriscono dunque che l'espressione di α -syn nel cervello di *Drosophila* provoca una perdita variabile (50-100%) di neuroni DA nei DMC che solitamente contengono 14-16 neuroni [22].

In un ulteriore studio ([22]), gli autori hanno utilizzato una tecnica diversa, ovvero l'immunoistochimica a montaggio completo del cervello, per dimostrare che la conta delle cellule DMC risultava normale in seguito all'espressione dell' α -syn: essi hanno espresso l' α -syn nei neuroni DA di *Drosophila* utilizzando lo stesso driver Ddc-GAL4 impiegato in studi precedenti. Gli esperimenti di immunoistochimica sono stati quindi eseguiti su cervelli interi di *Drosophila* utilizzando anticorpi contro TH e l' α -syn; successivamente sono state visualizzate e contate le cellule TH-positive utilizzando la microscopia confocale [22]. Contrariamente ai lavori pubblicati in precedenza, essi non hanno osservato alcuna perdita di cellule DA nei DMC nel cervello di moscerini adulti di 30 giorni che esprimono l' α -syn rispetto ai controlli. Per escludere che questi risultati dipendessero da diversi livelli di espressione di α -syn nei ceppi utilizzati, hanno ripetuto gli stessi esperimenti con le linee dell' α -syn precedentemente pubblicate [22]. Anche con queste linee, non hanno rilevato alcuna perdita significativa di cellule DA. Questi risultati mostrano quindi che la perdita di neuroni DA nei DMC nei moscerini che esprimono l' α -syn non è completamente penetrante in tutte le condizioni sperimentali e sottolinea l'importanza di un'analisi sperimentale accurata per studiare i fenomeni di degenerazione in modelli transgenici di PD [22]. Inoltre, quest'ultimo studio non ha nemmeno rilevato che il targeting dell' α -syn nell'occhio, nonostante l'utilizzo di una varietà di driver specifici, induca anomalie rilevabili. Infine, ha anche confermato l'ipotesi dello studio prima citato ([23]), secondo cui l'espressione pan-neuronale dell' α -syn non provoca un difetto di geotassi negativa. Studi precedenti sui topi avevano evidenziato che un fenotipo motorio dovuto all'espressione dell' α -syn dipendeva dai diversi livelli di espressione del transgene e dal tipo di promotore utilizzato ([22]); i risultati a seguito dell'espressione dell' α -syn nei neuroni DA di *Drosophila* sono coerenti con i risultati di esperimenti sui topi, in cui l'uso di un promotore TH per indirizzare l' α -syn ai neuroni DA non si traduce in un fenotipo motorio [22]. In conclusione, quest'ultimo lavoro mostra che i risultati dell'espressione dell' α -syn in diversi tessuti di *Drosophila* devono essere interpretati con cautela e che è fortemente raccomandata un'analisi multipla per analizzare la perdita di cellule dopaminergiche nelle DMC [22].

Critiche più recenti sono state fatte anche sulla modalità stessa dell'esperimento di deficit motorio, proponendo un paradigma di comportamento alternativo per la valutazione delle funzioni motorie oltre al saggio di arrampicata. In particolare, in uno studio del 2014 ([25]) è stata caratterizzata la camminata del moscerino A30P. L'arrampicata indotta da stress è infatti una modalità di movimento diversa dalla camminata, che sarebbe invece una misura più rilevante per il PD [25]. Tramite l'utilizzo di una telecamera ad alta velocità e un sistema di tracciamento automatico del comportamento, è stato visto che i moscerini A30P vecchi, a differenza di individui giovani, mostravano anomalie di deambulazione comparabili alla bradicinesia, ovvero una diminuzione della distanza totale in

movimento, della distanza per movimento, della velocità e della velocità angolare rispetto ai moscerini vecchi della linea di controllo [25].

Inoltre, i risultati hanno confermato che l'invecchiamento e l' α -syn A30P hanno esacerbato sinergicamente la normale deambulazione, portando ad un modello di camminata distinto nei moscerini A30P vecchi, rispetto ai giovani [25]. Infine, è stato osservato anche che i moscerini A30P vecchi mostravano un aumento del centrofobismo, evitando le posizioni centrali e suggerendo una possibile ansia elevata. È importante sottolineare che problemi psichiatrici sono comuni nei pazienti con PD e tra questi l'ansia colpisce tra il 40-69% dei pazienti [25].

3.3 Esperimento di deficit non motorio

I disturbi olfattivi nel PD sono stati documentati per la prima volta nel 1975 ([26]) e sono stati considerati il primo sintomo nella fase premotoria del PD (corrispondente al primo stadio Braak). I disturbi olfattivi possono precedere di anni la comparsa dei sintomi motori, in particolare nei pazienti che in famiglia presentano un passato genetico della malattia. Infatti, i LB compaiono inizialmente nel bulbo olfattivo, prima di diffondersi ai nuclei del tronco encefalico, nell'amigdala e quindi raggiungere la SN e altre regioni del mesencefalo (stadio clinico della malattia), influenzando le funzioni motorie [27].

Le compromissioni olfattive nei pazienti con PD sono rilevanti, arrivando a colpire l'80-90% dei pazienti con PD sia idiopatico che familiare. All'interno di questa statistica sono compresi deficit in tutti e tre i domini funzionali: soglia dell'odore (acuità), identificazione e discriminazione [27]. Considerando che l'intervento terapeutico può risultare tanto più efficace quanto prima viene somministrato durante il decorso della malattia, la diagnosi precoce e la diagnosi differenziale del PD da altri disturbi motori sono importanti e possono essere facilitate dalla valutazione delle funzioni olfattive prima che la neurodegenerazione diventi significativa [28].

Lo studio PRIPS (Prospective Validation of Risk Factors for the Development of Parkinson Syndromes) ha rilevato che i casi di iposmia, ovvero disfunzione olfattiva, avevano un rischio quadruplo di conversione in PD clinico (cPD) rispetto ai casi normosmici [29]. Un alterato senso dell'olfatto può quindi essere considerato come un evento clinico precoce durante la progressione della malattia. Sebbene sia un buon indicatore, l'iposmia da sola è probabilmente un predittore non ottimale per lo sviluppo del cPD, in quanto la perdita dell'olfatto è abbastanza comune negli anziani e solo una minoranza svilupperà PD [29].

Nel seguente studio ([30]) è stata inizialmente esaminata la funzione motoria in un modello dell' α -syn A30P prestabilito con PD, attraverso un test di arrampicata, il quale ha evidenziato la compromissione motoria.

Successivamente gli autori hanno voluto indagare se tali moscerini sviluppassero disturbi olfattivi; è stata quindi esaminata la relazione cronologica tra l'insorgenza di disturbi olfattivi e motori. Le funzioni olfattive hanno preso in considerazione tre parametri principali:

1. acuità dell'odore
2. discriminazione dell'odore

3. identificazione dell'odore

I saggi di acuità dell'odore (OA) e di discriminazione dell'odore (OD) sono stati eseguiti utilizzando un labirinto a T, consentendo ai moscerini di fare una scelta spontanea tra un odore rispetto all'aria nel test OA o tra un mix di odori di primo piano e di fondo rispetto a un solo odore di fondo nel test OD [30].

Nel test dell'OA, è stata misurata la capacità dei moscerini di rilevare concentrazioni sottosoglia di benzaldeide (BA): diverse concentrazioni di BA sono state abbinate ad olio minerale inodore (aria) [30]. Normalmente, i moscerini possono rilevare la presenza di BA ad una concentrazione molto bassa e mostrare preferenza verso o opposta ad BA, a seconda della concentrazione di BA [30]. Il test ha dimostrato che i moscerini A30P di appena tre giorni di età mostravano una compromissione olfattiva nel rilevare lo 0,05% di BA e tale compromissione progrediva fino all'incapacità di percepire lo 0,1% di BA a partire dal quinto giorno [30]. Dunque, i moscerini con deficit di OA mostrano una soglia più elevata di rilevamento della presenza di odore di BA e una risposta olfattiva modificata alla concentrazione di BA [30].

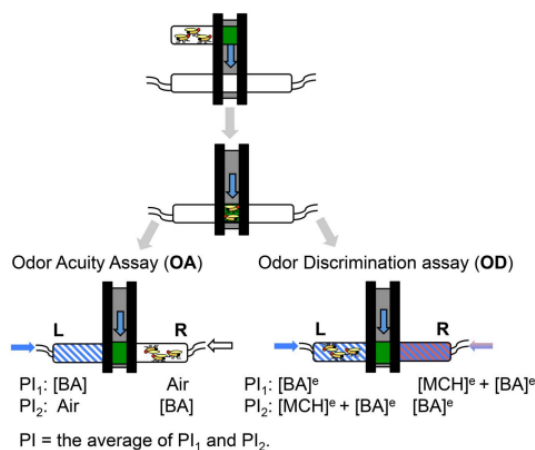


Figura 3.3: L'acuità dell'odore delle mosche (OA) e la discriminazione degli odori (OD) sono state testate utilizzando il labirinto a T [30].

Nel test OD, è stata misurata la capacità dei moscerini di discriminare tra l'1,5% di BA ed un odore di fondo del 15% di 4-metilcicloesano (MCH) [30]. Le concentrazioni di entrambi gli odori utilizzati nel saggio OD erano a concentrazioni bioequivalenti, il che significa che ponendo l'1,5% di BA e il 15% di MCH all'estremità opposta di un labirinto a T, le mosche avrebbero mostrato la stessa preferenza per l'1,5% BA e il 15% MCH, distribuendosi in uguale percentuale alle due estremità del labirinto a T [30]. La funzione di discriminazione degli odori sembra inizialmente migliorare con l'età negli animali di controllo, mentre inizia a mostrare compromissione già al quinto giorno nei moscerini A30P. Infatti, i moscerini con un deficit di OD mostrano difficoltà nel rilevare BA sullo sfondo con MCH, con conseguente punteggio più basso, rivelando un'incapacità nella discriminazione della presenza di BA in un forte sfondo odorante di MCH, rispetto ai normali moscerini [30].

Sia i disturbi dell'OA che dell'OD nei moscerini A30P si sono manifestati il quinto giorno, ovvero quando i moscerini conservavano ancora la normale funzione motoria, suggerendo che i deficit olfattivi precedono il declino della funzione motoria [30].

La dipendenza dall'età risulta essere una caratteristica fondamentale delle malattie degenerative. Per determinare l'effetto dell'invecchiamento nei deficit di OA e OD, gli autori hanno calcolato le differenze dei punteggi tra i moscerini A30P e quelli di controllo tra 5 e 10 giorni [30]. I rapporti OA e OD sono diminuiti significativamente il giorno 10, rispetto al giorno 5: l'OA è diminuito del 16% e l'OD è diminuito del 23%, suggerendo che l'invecchiamento ha peggiorato entrambi i deficit olfattivi [30].

Inoltre, attraverso un test con 5 diverse sostanze (BA, salicilato di metile, 1-propanolo, acetato di etile, acetato di butile) è stato dimostrato che i moscerini A30P di quindici giorni mostravano un deficit di discriminazione per l'odore non specifico, come nei pazienti umani con PD, suggerendo che probabilmente il deficit nella discriminazione dell'odore non è mediato da una compromissione di un particolare tipo di neurone del recettore olfattivo (ORN) [30].

Per comprendere se i deficit di OA e OD nei moscerini A30P fossero dovuti a compromissioni funzionali dei neuroni DA nella trasmissione olfattiva e/o compromissioni funzionali degli ORN è stata limitata l'espressione di A30P prima ai neuroni DA e poi ai neuroni del recettore olfattivo, utilizzando rispettivamente i driver TH-GAL4 e Or83b-gal4 ([30]): i risultati ottenuti suggeriscono che i deficit olfattivi nei moscerini A30P non erano dovuti alla disfunzione degli ORN, ma ai neuroni DA locali che modulavano gli ORN nel lobo antennale, analogo del bulbo olfattivo nei mammiferi, poiché la limitazione dell'espressione della proteina A30P ai neuroni DA ha causato disturbi nell'acuità dell'odore [30]. L'acuità dell'odore era risultata compromessa anche in ratti transgenici, che esprimevano sia l' α -syn A30P che A53T sotto il promotore TH, prima della comparsa dei sintomi motori, confermando un coinvolgimento diretto dei neuroni DA, come indicato anche dallo studio analizzato [30].

L'organizzazione olfattiva è conservata tra mammiferi e insetti: gli assoni degli ORN (sensoriali) sono cablati e convergenti in base al tipo di recettore olfattivo espresso [30]. Gli assoni di proiezione sono organizzati in neuropili sferici distintivi, o glomeruli, rispettivamente nel lobo antennale in *Drosophila* o nel bulbo olfattivo nei mammiferi [30].

A sostegno dei risultati appena descritti, è stato inoltre scoperto che i neuroni DA innervano il centro dei neuropili e gli intraglomeruli nello strato gliale, modulando indirettamente le uscite dei neuroni sensoriali olfattivi nei moscerini [30].

I moscerini A30P sembrano essere quindi un ottimo modello per studiare la dinamica dei deficit olfattivi correlati al PD. Rispetto ai modelli di topi e ratti, i moscerini hanno una durata di vita molto più breve e una progressione della malattia più rapida [30]. I deficit olfattivi possono essere rilevati già negli adulti di cinque giorni, prima che il deficit motorio diventi evidente nei moscerini di 15 giorni [30]. I moscerini inoltre permettono di testare una serie di concentrazioni di odori in diversi gruppi di varie età e forniscono la potenza statistica necessaria per poter trarre conclusioni valide [30].

Conclusioni

I lavori presentati nell'elaborato mostrano come *Drosophila melanogaster* possa essere un buon modello di studio per l'accumulo dell' α -syn nel PD, in quanto negli esperimenti trattati vengono ricapitolate le principali caratteristiche patologiche e cliniche del PD. Questo potrebbe permettere di utilizzare l'organismo in esame come modello per lo studio preliminare di nuove terapie neuroprotettive per il prossimo futuro.

I principali ostacoli a questo proposito sono la comprensione limitata degli eventi molecolari chiave che provocano la neurodegenerazione e la molteplicità di fattori coinvolti, che ne complicano ulteriormente lo studio. Tuttavia, molti tra questi fattori sono in qualche modo correlati all'elaborazione, al funzionamento o all'aggregazione anomala dell' α -syn, suggerendo che questa proteina sia di centrale importanza e che protocolli terapeutici efficaci potrebbero essere sviluppati sulla base dell'analisi dettagliata della sua funzione, disfunzione ed aggregazione. Un passo fondamentale verso una migliore comprensione della patologia potrebbe essere l'identificazione di molecole che inibiscono la deposizione della proteina o invertono la formazione di fibrille/oligomeri, permettendo una valutazione dei loro rispettivi ruoli nell'avvio dei processi neurodegenerativi e nella progressione della malattia.

Nel primo esperimento trattato, è stato osservato un progressivo ed accelerato declino della capacità di arrampicata nei moscerini transgenici, dimostrando quindi un deficit funzionale prodotto dall'espressione dell' α -syn nel sistema nervoso. Il decorso temporale della disfunzione locomotoria risulta parallelo alla degenerazione dei neuroni DA e alla comparsa di inclusioni dell' α -syn.

Nel secondo esperimento analizzato, i deficit olfattivi nei moscerini A30P supportano il coinvolgimento diretto della compromissione sensoriale, sottolineando l'importanza dei sintomi non motori, i quali rappresentano la fase prodromica del PD; tali sintomi potrebbero dunque essere utilizzati per lo screening della malattia prima che siano presenti anomalie motorie.

Un recente studio pubblicato su *Nature Communications* ha rivelato un progresso significativo nella diagnosi precoce del PD grazie all'intelligenza artificiale (AI). Utilizzando un esame del sangue, l'AI è in grado di prevedere la comparsa del PD fino a 7 anni prima dei sintomi clinici con un'accuratezza del 100% [31]. Il team di ricercatori dell'University College London (UCL) e del Centro medico universitario di Goettingen ha sviluppato un modello di AI che analizza un pannello di otto biomarcatori del sangue, le cui concentrazioni risultano alterate nei pazienti affetti da Parkinson. Questo approccio consente una diagnosi precoce

estremamente accurata, permettendo di intervenire prima che i sintomi diventino evidenti. Durante un periodo di 10 anni, l'AI ha previsto correttamente che 16 pazienti avrebbero sviluppato il Parkinson, 7 anni prima che i sintomi si manifestassero. Questo risultato sottolinea l'elevato potenziale della tecnologia nel riconoscere e prevedere la malattia, la quale potrà essere gestita già a stadi precoci da possibili future terapie [31].

Bibliografia

- [1] Società Italiana di Neurologia. Malattia di parkinson e parkinsonismi. <https://www.neuro.it/web/eventi/NEURO/patologia.cfm?p=parkinson>, 2016-2024.
- [2] GBD 2016 Parkinson’s Disease Collaborators. Global, regional, and national burden of parkinson’s disease, 1990–2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. [https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422\(18\)30295-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422(18)30295-3/fulltext), 2018.
- [3] Eduardo Tolosa, Alicia Garrido, Sonja W. Scholz, and Werner Poewe. Challenges in the diagnosis of parkinson’s disease. *Lancet Neurology*, 20(5):385–397, 2021.
- [4] James Sonne, Vamsi Reddy, and Morris R. Beato. *Neuroanatomy, Substantia Nigra*. StatPearls Publishing, 2024.
- [5] Thomas Koeglsperger, Svenja-Lotta Rumpf, Patricia Schließer, Felix L. Struebing, Matthias Brendel, Johannes Levin, Claudia Trenkwaldler, Günter U. Höglinger, and Jochen Herms. Neuropathology of incidental lewy body and prodromal parkinson’s disease. *Molecular Neurodegeneration*, 18(32), 2023.
- [6] Heiko Braak, Kelly Del Tredici, Udo Rüb, Rob A. I. de Vos, Ernst N. H. Jansen Steur, and Eva Braak. Staging of brain pathology related to sporadic parkinson’s disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2):197–211, 2003.
- [7] Walter J. Schulz-Schaeffer. Neurodegeneration in parkinson disease: moving lewy bodies out of focus. *Neurology*, 79(24):2298–9, 2012.
- [8] Shunsuke Koga, Hiroaki Sekiya, Naveen Kondru, Owen A. Ross, and Dennis W. Dickson. Neuropathology and molecular diagnosis of synucleinopathies. *Molecular Neurodegeneration*, 16(83), 2021.
- [9] Mari Suzuki, Kazunori Sango, and Yoshitaka Nagai. Roles of α -synuclein and disease-associated factors in drosophila models of parkinson’s disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 2022.
- [10] Leonidas Stefanis. α -synuclein in parkinson’s disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), 2012.

- [11] Haoran Peng, Siyuan Chen, Shaopu Wu, Xiaoxue Shi, Jianjun Ma, Hongqi Yang, and Xue Li. Alpha-synuclein in skin as a high-quality biomarker for parkinson's disease. *Journal of Neurological Science*, 451, 2023.
- [12] Jacqueline Burré. The synaptic function of α -synuclein. *Journal of Parkinson's Disease*, 5(4):699–713, 2015.
- [13] Vladimir N. Uversky. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 103(1):17–37, 2007.
- [14] Marthe H. R. Ludtmann, Plamena R. Angelova, Mathew H. Horrocks, Minnie L. Choi, Margarida Rodrigues, Artyom Y. Baev, Alexey V. Berezhnov, Zhi Yao, Daniel Little, Blerida Banushi, Afnan Saleh Al-Menhali, Rohan T. Ranasinghe, Daniel R. Whiten, Ratsuda Yapom, Karamjit Singh Dolt, Michael J. Devine, Paul Gissen, Tilo Kunath, Morana Jaganjac, Evgeny V. Pavlov, David Klenerman, Andrey Y. Abramov, and Sonia Gandhi. α -synuclein oligomers interact with atp synthase and open the permeability transition pore in parkinson's disease. *Nature Communications*, 9(1), 2018.
- [15] Lina Wang, Utpal Das, David A. Scott, Yong Tang, Pamela J. McLean, and Subhojit Roy. α -synuclein multimers cluster synaptic-vesicles and attenuate recycling. *Current Biology*, 24(19):2319–2326, 2014.
- [16] Binod Aryal and Youngseok Lee. Disease model organism for parkinson disease: *Drosophila melanogaster*. *BMB Reports*, 52(4):250–258, 2019.
- [17] Pablo Calap-Quintana, Javier González-Fernández, Noelia Sebastián-Ortega, José Vicente Llorens, and María Dolores Moltó. *Drosophila melanogaster* models of metal-related human diseases and metal toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 2017.
- [18] Katherine E. White, Dickon M. Humphrey, and Frank Hirth. The dopaminergic system in the aging brain of *drosophila*. *Frontiers in Neuroscience*, 4:205, 2010.
- [19] Alexander J. Whitworth, Paul D. Wes, and Leo J. Pallanck. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for parkinson's disease. *Science Direct*, 11(3-4):119–126, 2006.
- [20] L. T. Reiter, L. Potocki, S. Chien, M. Gribskov, and E. Bier. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 11(6):1114–1125, 2001.
- [21] M. B. Feany and W. W. Bender. A *drosophila* model of parkinson's disease. *Nature*, 404(6776):394–398, 2000.
- [22] Yakov Pesah, Heather Burgess, Brooke Middlebrooks, Kari Ronningen, Jude Prosser, Vijaya Tirunagaru, John Zysk, and Graeme Mardon. Whole-mount analysis reveals normal numbers of dopaminergic neurons following misexpression of α -synuclein in *drosophila*. *Genesis*, 41(4):1540–159, 2005.

- [23] Pavan K. Auluck, H. Y. Edwin Chan, John Q. Trojanowski, Virginia M. Y. Lee, and Nancy M. Bonini. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a drosophila model for parkinson's disease. *Science*, 295(5556):865–868, 2002.
- [24] Yufeng Yang, Isao Nishimura, Yuzuru Imai, Ryosuke Takahashi, and Bingwei Lu. Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by pael-r in drosophila. *Neuron*, 37(6):911–924, 2003.
- [25] A. Y. Chen, P. Wilburn, X. Hao, and T. Tully. Walking deficits and centrophobism in an α -synuclein fly model of parkinson's disease. *Genes, Brain and Behavior*, 13(8):812–820, 2014.
- [26] K. A. Ansari and A. Johnson. Olfactory function in patients with parkinson's disease. *Journal of Chronic Diseases*, 28(9):493–497, 1975.
- [27] G. Webster Ross, Helen Petrovitch, Robert D. Abbott, Caroline M. Tanner, Jordan Popper, Kamal Masaki, Lenore Launer, and Lon R. White. Association of olfactory dysfunction with risk for future parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 63(2):167–173, 2008.
- [28] Christopher Hawkes. Olfaction in neurodegenerative disorder. *Movement Disorders*, 18(4):364–372, 2003.
- [29] Paula Marrero-González, Alex Iranzo, David Bedoya, Mònica Serradell, Aida Niñerola-Baizán, Andrés Perissinotti, Carles Gaig, Isabel Vilaseca, Isam Alobid, Joan Santamaría, and Joaquim Mullol. Prodromal parkinson disease in patients with idiopathic hyposmia. *Journal of Neurology*, 267(12):3673–3682, 2020.
- [30] Alex Y. Chen, Shouzhen Xia, Paul Wilburn, and Tim Tully. Olfactory deficits in an alpha-synuclein fly model of parkinson's disease. *PLoS One*, 9(5), 2014.
- [31] Federica Vitale. Ai rileva il parkinson sette anni prima dei sintomi con precisione del 100%. *FocusTech*, 2024.