



SVSCEPTVM  
PERFICE  
MVNVS

Università degli studi di Sassari

Scuola di Dottorato in Scienze Biotecnologiche e Biomolecolari

Indirizzo Biochimica e Biologia Molecolare

Ciclo XXIII

Direttore: Chiar.mo Prof. Bruno Masala

***“Analisi del ruolo fisiopatologico della  
proteina LRRK2, responsabile della  
Malattia di Parkinson familiare di tipo 8”***

Dottoranda: Dr. Giovanna Sanna

Direttore: Prof. Bruno Masala

Tutor: Prof. Claudia Crosio

Dr. Ciro Iaccarino

Anno Accademico 2010-2011

# INDICE

## ***Introduzione***

<b>1.1 La Malattia di Parkinson</b>	pag. 1
<b>1.2 Eziologia</b>	pag. 7
1.2.1 Fattori ambientali	pag. 7
1.2.2 Fattori genetici	pag. 11
<b>1.3 Le forme di Parkinson ad eredità mendeliana</b>	pag. 13
<b>1.4 Patogenesi della Malattia di Parkinson</b>	pag. 20
- Ruolo del mitocondrio nella patogenesi della malattia di Parkinson	pag. 21
<b>1.5 Funzioni fisiopatologiche della proteina LRRK2</b>	pag. 23
- Caratteristiche generali e domini strutturali di LRRK2	pag. 23
- Coinvolgimento di LRRK2 nella malattia di Parkinson	pag. 28
- Ruolo di LRRK2 nella regolazione del traffico vescicolare	pag. 31

<b><i>Scopo della Tesi</i></b>	pag. 37
--------------------------------	---------

<b><i>Materiali e Metodi</i></b>	pag. 38
----------------------------------	---------

<b><i>Risultati e discussione</i></b>	pag. 55
---------------------------------------	---------

<b>4.1 Effetti della localizzazione cellulare di LRRK2 sulla tossicità cellulare</b>	
- Costruzione di vettori d'espressione per la localizzazione di LRRK2 nella matrice e nello spazio intermembrana del mitocondrio	pag. 55
- Purificazione di mitocondri	pag. 57
- Localizzazione mitocondriale di IMS-LRRK2 ed MTX-LRRK2	pag. 59
<b>5.1 Identificazione di interattori molecolari di LRRK2</b>	pag. 61
- Vettori per l'espressione delle proteine di fusione per esperimenti di GST-pull down	pag. 61
- Espressione e purificazione delle proteine di fusione	pag. 63

- Identificazione di interattori molecolari mediante saggio GST-pull down e spettrometria di massa	pag. 67
- LIP <sub>110</sub> è un interattore molecolare di LRRK2	pag. 69
- LRRK2 e Sec8 co-localizzano <i>in vivo</i>	pag. 70
- LRRK2 fosforila Sec8 <i>in vitro</i>	pag. 71
- LRRK2 fosforila Sec8 <i>in vivo</i>	pag. 73
- Costruzione di mutanti di delezione della proteina Sec8	pag. 76
<b>Conclusioni</b>	pag. 78
<b>Bibliografia</b>	pag. 82

# INTRODUZIONE

## 1.1 La malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa cronica a carattere progressivo. I principali segni neuropatologici sono rappresentati da un'estesa e selettiva perdita di neuroni dopaminergici nella *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) e dalla presenza di inclusioni citoplasmatiche intraneuronali note come corpi di Lewy. La degenerazione di questi neuroni e delle loro terminazioni striatali causa una diminuzione dei livelli di dopamina nello *striatum* ed è responsabile dei sintomi di tipo motorio che caratterizzano la malattia: tremore, rigidità, instabilità posturale e bradicinesia. Tuttavia la progressiva degenerazione neuronale non è limitata alla Substantia Nigra ma interessa anche altre sub regioni encefaliche che comprendono i neuroni noradrenergici del *locus coeruleus* ed i neuroni serotonergici del nucleo dorsale [Dauer and Przedborski, 2003].

L'incidenza della malattia è stimata in circa 20/100000 casi all'anno nella popolazione con più di 50 anni di età, fino a 120/100000 nuovi casi l'anno tra la popolazione oltre i 70 anni [Wirdefeldt, 2011]; differenze anche marcate nell'incidenza si riscontrano tra le diverse etnie probabilmente associate all'eziologia della malattia e cioè legate all'esposizione a fattori ambientali di rischio oppure a suscettibilità genetica. L'età media di insorgenza è intorno ai 60 anni, anche se il 4% dei pazienti presenta uno sviluppo precoce della malattia (prima dei 50 anni). In realtà la comparsa dei sintomi avviene quando circa il 50-60% dei neuroni della SNpc è compromesso ed i livelli di dopamina nello striato sono diminuiti dell'80% [Dauer and Przedborski, 2003]. Pertanto è verosimile che la malattia insorga molto prima della sintomatologia e che quindi una buona percentuale di popolazione, apparentemente sana, stia sviluppando la malattia di Parkinson.

La malattia di Parkinson ha una natura molto eterogenea, vi sono forme a progressione lenta accanto ad altre con progressione rapida; forme a fenomenologia semplice accanto ad altre con fenomeni clinici complessi.

Le forme di Parkinson possono infatti essere distinte in PD idiopatico, P. Plus e parkinsonismi secondari (tabella 1) [Hughes, A.J. *et al.*, 1992; Stacy *et al.*, 1992].

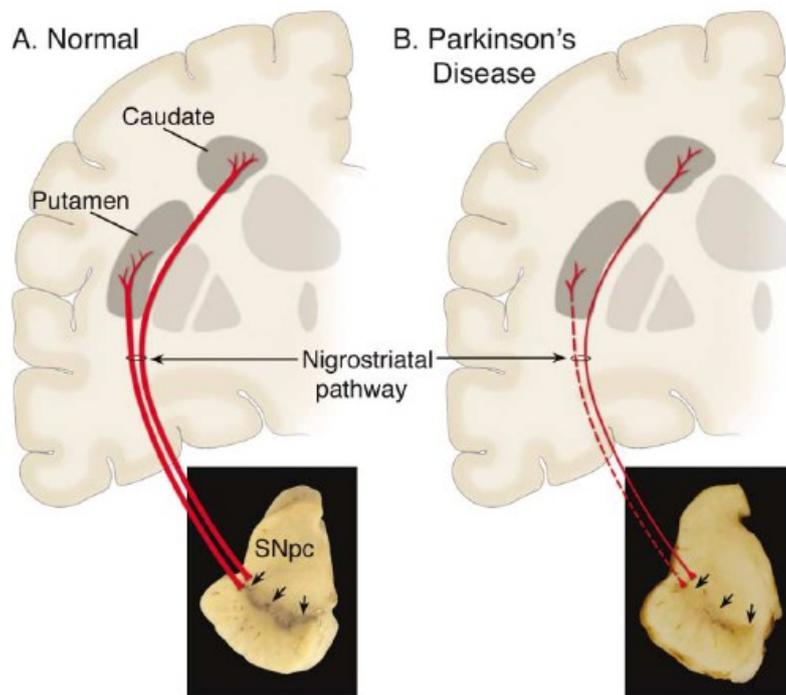
Categoria	Forma clinica
Parkinson primario	Malattia di parkinson Parkinsonismi monogenici
Parkinsonismi secondari	Accidente cerebro vascolare Traumi Cause infettive Sostanze tossiche Farmaci
Parkinsonismi plus	Paralisi sopranucleare progressiva Atrofia multisistemica Malattia da corpi di lewy diffusi

**Tabella 1.** Forme di malattia di Parkinson.

Per quanto riguarda il Parkinson idiopatico, definito anche come Parkinson primario, esso è caratterizzato prevalentemente da rigidità, tremore, lentezza dei movimenti e perdita dell'equilibrio, la malattia ha un decorso lento e non vi sono cause esterne riconducibili alla sintomatologia.

La diagnosi della malattia di tipo idiopatico si basa sull'osservazione di criteri clinici, ma la diagnosi definitiva può essere effettuata solo *post mortem*, evidenziando la perdita dei neuroni dopaminergici e la depigmentazione della SNpc unitamente al rinvenimento dei corpi di Lewy nei neuroni superstiti; tali inclusioni, composte da diverse proteine tra cui  $\alpha$ -sinucleina, parkina, ubiquitina e neurofilamenti, non sono comunque indicatori esclusivi della malattia in quanto assenti nel 25% dei casi e riscontrati anche in altre patologie

neurodegenerative quali la Malattia di Alzheimer e la Demenza a corpi di Lewy. All'esame istologico i corpi di Lewy si presentano come strutture rotondeggianti con diametro compreso tra i 5 ed i 25  $\mu\text{m}$  con un core eosinofilo circondato da un alone chiaro. L'analisi ultrastrutturale in microscopia elettronica rivela una densa granulazione del core ed un alone periferico costituito da filamenti orientati radialmente spessi 8-10 nm [Duffy and Tennyson, 1965; Pappolla, 1986]



**Figura 1.** Rappresentazione schematica della via nigrostriatale (in rosso). Nella malattia di Parkinson (B) si ha una marcata perdita di neuroni dopaminergici e delle loro proiezioni nel *putamen* (linea tratteggiata) ed una più modesta delle proiezioni verso il *caudatum* (linea intera). Nel riquadro si evidenzia la tipica depigmentazione della SNpc in seguito alla degenerazione dei neuroni dopaminergici ricchi di neuro melanina (pigmento marrone scuro) [Dauer and Przedborski, 2003]

Un'altra forma di PD è il "Parkinson plus" nella quale rientrano alcune affezioni neurodegenerative, che presentano una stretta somiglianza clinica con il PD, ma che si caratterizzano per la presenza contemporanea anche di altri segni neurologici (cerebellari, piramidali, vegetativi, cognitivi): i più importanti tra questi sono l'atrofia multisistemica, la paralisi sopranucleare progressiva e la degenerazione cortico-basale [Stacy et al., 1992].

Infine, per quanto riguarda i parkinsonismi secondari, essi si presentano con caratteristiche simili al Parkinson e hanno causa nota, hanno un decorso variabile e una prevalenza molto bassa, possono essere indotte da avvelenamento da composti tossici (manganese, monossido di carbonio, cianuro) o da farmaci (neurolettici, antiemetici, calcio-bloccanti), oppure da traumi o lesioni cerebrali (per esempio il Parkinson “pugilistico”). Le forme indotte da farmaci non sono associate ad una perdita di cellule nervose e sono soggette a remissione alla sospensione dell'assunzione del farmaco; l'intossicazione con neurotossine provoca, al contrario, un danno irreversibile alla SN [Ahlskog, 2000]. Tutte le forme di parkinsonismi secondari si caratterizzano per un'evoluzione clinica più rapida, per una risposta ai farmaci scarsa o comunque minore rispetto alle forme di parkinson primario e per l'assenza di corpi di Lewy. Sono relativamente frequenti con un rapporto di 10:1 rispetto alla malattia di Parkinson [Quinn, 1995; Colosimo et al., 1995].

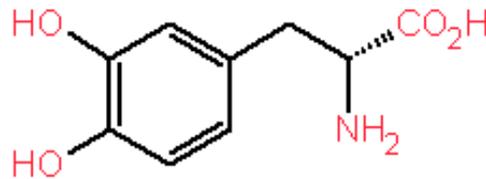
Negli anni sono stati sviluppati dei criteri diagnostici per la diagnosi clinica di malattia di Parkinson idiopatica. Una recente revisione dei criteri diagnostici di morbo di Parkinson è stata svolta da Gelb e collaboratori (2007), sottolineando come la diagnosi clinica di morbo di Parkinson sia basata sulla combinazione di alcuni segni motori cardinali e sull'esclusione di sintomi ritenuti atipici; fra i segni motori cardinali abbiamo:

1. tremore a riposo, distale
2. rigidità
3. bradicinesia
4. esordio asimmetrico
5. l'instabilità posturale

Ai segni motori cardinali viene aggiunto il criterio della responsività alla levodopa (L-dopa) che, seppur con sporadiche eccezioni, costituisce un requisito necessario per la diagnosi, ma non esclusivo, in quanto inizialmente riscontrabile anche in forme atipiche [Poewe et al., 2010].

Il trattamento della sindrome di Parkinson idiopatica è divenuto, in questi ultimi anni, sempre più complesso. Da una parte vi sono a disposizione svariate

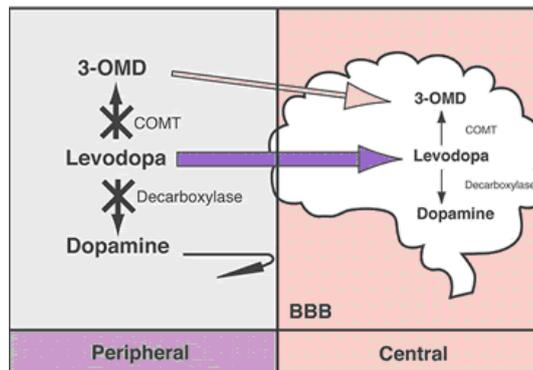
nuove tecniche di trattamento farmacologico e chirurgico, dall'altra si è potuto acquisire una esperienza di oltre trenta anni di trattamento con la levodopa.



**Figura 2** Levodopa (3,4-diidrossi-L-fenilalanina): struttura chimica.

La levodopa è il precursore naturale della dopamina, essa penetra nei neuroni dopaminergici dove viene convertita in dopamina; quest'ultima non può essere somministrata direttamente come farmaco in quanto non riesce a superare la barriera emato-encefalica e a raggiungere i neuroni dopaminergici. La L-dopa viene somministrata per via orale e, assorbita a livello intestinale, entra nel circolo sistemico. In periferia esiste un enzima, la dopa decarbossilasi periferica, che catalizza la trasformazione della L-dopa in dopamina rimuovendo il gruppo carbossilico dalla catena laterale della L-dopa. Poiché la dopamina a livello periferico non ha effetti terapeutici ma anzi è causa di spiacevoli effetti collaterali, si cerca di inibire la dopa decarbossilasi periferica con la somministrazione contemporanea di inibitori della decarbossilasi. Giunta nel cervello, la L-dopa viene captata dalle terminazioni dopaminergiche dove penetrata nei neuroni è trasformata in dopamina dalla dopa decarbossilasi neuronale. La dopamina così sintetizzata nel citoplasma viene catturata e concentrata all'interno delle vescicole sinaptiche attraverso un processo di trasporto attivo. L'immagazzinamento all'interno delle vescicole ha lo scopo di proteggere la molecola dalla distruzione enzimatica ad opera della monoamino ossidasi (MAO), ed è essenziale per il rilascio del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico da parte dell'impulso nervoso. All'arrivo di questo, le vescicole accumulate nella terminazione nervosa fondono la loro membrana con quella del neurone rilasciando il loro contenuto nello spazio sinaptico dove

la dopamina può agire sui neuroni post-sinaptici ed esplicare il proprio effetto terapeutico [Canali].



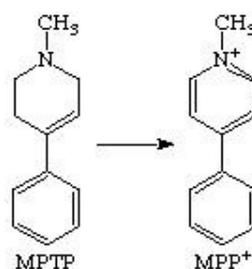
**Figura 3.** Meccanismo d'azione della levodopa

## 1.2 Eziologia

La malattia di Parkinson ha un'eziologia complessa e multifattoriale, e coinvolge sia fattori genetici che ambientali (tra questi ultimi: sostanze tossiche e/o inquinanti, stili di vita, traumi meccanici...); rimangono tuttavia ancora largamente sconosciuti i dettagli molecolari del processo degenerativo, nonché interazioni e rispettivi contributi delle varie componenti che sembrano coinvolte nell'eziopatogenesi della malattia.

### 1.2.1 Fattori ambientali

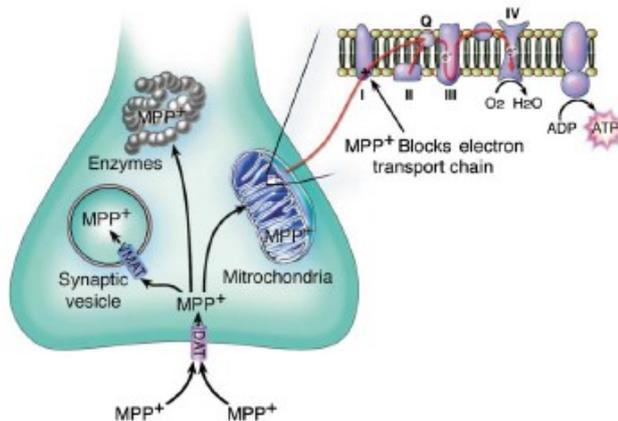
Nella maggior parte dei casi di Parkinson, il peso delle cause ambientali a tutt'oggi risulta più importante della predisposizione genetica. Si ritiene che la malattia sia il risultato dell'interazione fra numerosi fattori ambientali a cui il paziente è esposto durante la propria vita come sostanze tossiche, farmaci, stili di vita, ecc. Fra le varie sostanze correlate all'insorgenza di PD abbiamo un derivato della *Meperidina*, l' 1-metil-4-fenil-1,2,3,6,-tetraidropiridina (MPTP), una neurotossina in grado di produrre un fenotipo con sintomatologia parkinsoniana (figura 4). Gli effetti di MPTP vennero per la prima volta descritti nel 1982, in seguito all'insorgenza in alcuni eroinomani di gravi forme di PD [Langston et al., 1983].



**Figura 4.** Struttura chimica di MPTP e MPP<sup>+</sup>.

La causa scatenante il parkinsonismo è stata identificata in tracce di MPTP nell'eroina utilizzata. L'MPTP di per sé è innocuo ma attraversa la barriera ematoencefalica in pochi minuti e una volta nel cervello viene ossidato dall'enzima monoamino ossidasi B nelle cellule della glia e nei neuroni

serotonergici. Convertito in MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridina), molecola tossica, viene rilasciato attraverso un meccanismo ignoto nello spazio extracellulare da cui per la sua alta affinità con il trasportatore della dopamina (DAT) viene concentrato nei neuroni dopaminergici.



**Figura 5.** Rappresentazione schematica dei meccanismi molecolari intraneuronali attraverso cui lo ione MPP<sup>+</sup> esplica la sua azione tossica [Dauer and Przedborski, 2003]

All'interno dei neuroni l'MPP<sup>+</sup> può seguire tre distinte vie: a) legarsi ad un trasportatore di monoamine vescicolare (VMAT2) che trasloca l'MPP<sup>+</sup> all'interno delle vescicole sinaitiche; b) essere concentrato nei mitocondri mediante un processo di trasporto attivo; c) rimanere nel citosol ed interagire con enzimi citosolici. All'interno del mitocondrio l'MPP<sup>+</sup> inibisce l'attività del complesso I della catena di trasporto degli elettroni causando una serie di effetti:

- iperproduzione di ROS
- diminuzione dell'ATP nei tessuti
- apoptosi

Il tutto dunque induce la degenerazione MPTP-indotta dei neuroni dopaminergici a livello delle strutture nigrostriatali. Studi su modelli animali hanno confermato *in vivo* lo sviluppo di degenerazioni a carico del tessuto nervoso nigrostriatale in seguito alla somministrazione sistemica di MPTP

[Langston et al., 1983; Dauer and Przedborski, 2003]. Tali osservazioni oltre a permettere la comprensione dei meccanismi patogenetici di questa neurotossina hanno permesso la generazione di modelli animali di malattia di Parkinson attraverso cui comprenderne i meccanismi molecolari di morte neuronale e testare nuove strategie terapeutiche. A tal fine sono stati ampiamente utilizzati alcuni organismi vertebrati quali il ratto, *D. Melanogaster*, *C. Elegans* ed il pesce *Danio rerio* [McKinley, 2005], oltre ad un'ampia gamma di sistemi cellulari. In seguito, altri composti con attività di neurotossine mitocondriali come l'MPTP nonché altri composti citotossici e inibitori dei proteasomi, sono stati studiati e si sono rivelati capaci di indurre la degenerazione dei neuroni dopaminergici. Sono quindi stati svolti tutta una serie di studi epidemiologici, sull'uomo, che hanno fatto emergere possibili correlazioni tra fattori ambientali, alimentari e l'insorgenza della malattia. È stato per esempio osservato che il Parkinson ha un'incidenza minore nei fumatori e nei consumatori di alcol, caffeina e farmaci antinfiammatori non-steroidi [Obeso et al., 2010], il che lascia supporre che queste sostanze possano assolvere una funzione protettiva delle cellule dei gangli della base [Wirdefeldt et al., 2011]. Si è inoltre potuto dimostrare che i traumi meccanici subiti dai pugili, a seguito dei violenti colpi al capo cui sono soggetti, sembrano essere connessi con lo sviluppo di una sindrome parkinson-simile di carattere progressivo. Altri due fattori che influenzano il rischio sono il sesso e l'età. I maschi, infatti, sono maggiormente affetti rispetto alle femmine (secondo un rapporto di 1,5:1). Nell'adulto sano la perdita di cellule e del pigmento neuromelanina nella SN è maggiore intorno al sessantesimo anno di età, che coincide con l'età media di insorgenza della patologia. Poiché il pigmento protegge i neuroni dopaminergici dagli effetti dell'MPTP, delle tossine e dei radicali liberi, una sua diminuzione può predisporre il cervello delle persone anziane al Parkinson [Priyadarshi et al., 2001]. Anche l'eventuale esposizione a metalli pesanti (rame, ferro, manganese) è stata studiata in relazione al PD. Una serie di studi epidemiologici hanno infatti analizzato, con risultati più o meno concordi, la relazione tra insorgenza del morbo di Parkinson ed esposizione a metalli; per esempio, per quanto riguarda il ferro, alcuni studi dimostrano che il suo livello è maggiore nelle persone affette da PD, sebbene non si sia ancora compreso se ciò costituisca una causa o un effetto della

patologia [Allam, *et al.*, 2005; Fasano et al., 2006]. E' stata infine ipotizzata anche un'**eziologia infettiva**: infatti, manifestazioni cliniche simili alla malattia di Parkinson sono stati riscontrati in pazienti che erano stati affetti da un'encefalite virale (*encefalite lethargica*) diffusasi come pandemia intorno al 1920, in questi pazienti però la malattia si presentava rispetto al Parkinson con un decorso più lento, una perdita neuronale maggiore e assenza di corpi di Lewy [Gamboa et al., 1974; Ravenholt and Foege, 1982; Poskanzer and Schwab, 1963].

## 1.2.2 Fattori genetici

Per lungo tempo la malattia di Parkinson è stata considerata una malattia sporadica; fino a quando gli studi di Leroux nel 1880, che per primo scoprì casi ricorrenti di Parkinson all'interno di una famiglia, condussero all'ipotesi che fattori ereditabili potessero aumentare la suscettibilità alla patologia. Diversi studi intorno agli anni '40 del secolo scorso ipotizzarono che una percentuale rilevante dei casi di Parkinson fossero coerenti con un'eredità autosomica dominante anche se studi sul tasso di concordanza tra gemelli sembravano dimostrare l'assenza di una componente genetica [Wirdefeldt et al., 2011]. La ricorrenza di casi di malattia fra parenti fu attribuita ad una comune esposizione allo stesso ambiente. Poiché, però, la malattia di Parkinson ha penetranza, età di insorgenza, sintomi e manifestazioni patologiche terminali molto variabili, gli studi sui gemelli vengono considerati ora meno attendibili per escludere un'eziologia genetica. Nell'ultimo decennio analisi di associazione ad ampio raggio hanno permesso di identificare mutazioni multiple in diversi geni, all'interno di famiglie con parkinsonismi ad eredità mendeliana. Queste scoperte sono state possibili grazie allo studio di rare forme di Parkinson familiare, nella maggior parte dei casi con caratteri clinici e neuropatologici in qualche modo differenti dal Parkinson idiopatico. Paradossalmente, individui con una storia familiare di parkinsonismi atipici, per i quali una volta non era neanche possibile una diagnosi definita di malattia di Parkinson, possono ora essere identificati tramite test genetici. Più recentemente, attraverso analisi di associazione genomiche sono stati identificati alcuni loci di suscettibilità che devono però essere ancora confermati [Hardy et al., 2009; Klein and Lohmann-Hedrich, 2007; Cookson and Bandmann, 2010; Lesage and Brice, 2009].

Una percentuale di contributo genetico può esserci in tutte le forme di malattia di Parkinson, ma quelle aventi un'origine esclusivamente genetica (carattere monogenico a trasmissione mendeliana), così come quelle dovute a cause solo ambientali, riguardano una piccola percentuale di casi. Al momento, le forme individuate di malattia di Parkinson con una trasmissione di tipo mendeliano sono sedici. Alcune sono di tipo autosomico dominante (AD) ed altre di tipo autosomico recessivo (AR). In 10 casi sono stati identificati anche i prodotti

genici, mentre per altri loci cromosomici causativi (*PARK 3*) o predipsonenti (*PARK 10*, *PARK 12*, *PARK 16*) non è stata ancora definita la localizzazione e/o la sequenza dei geni responsabili ed in qualche caso rimane sconosciuto anche il prodotto proteico (Tabella 2) [Seol, 2010].

	<b>Locus</b>	<b>Trasmissione</b>	<b>Gene</b>	<b>Funzione</b>
<b><i>PARK1</i></b>	4q21	AD	<b><math>\alpha</math>-sinucleina</b>	???
<b><i>PARK2</i></b>	6q25.2-q27	AR	<b>parkina</b>	Ubiquitina Ligasi E3
<b><i>PARK3</i></b>	2p13	AD	?	???
<b><i>PARK4</i></b>	4q21	AD	<b><math>\alpha</math>-sinucleina</b>	
<b><i>PARK5</i></b>	4p14	AD	<b>UCHL1</b>	Ricicla l'ubiquitina polimerica in monomeri
<b><i>PARK6</i></b>	1p35-36	AR	<b>PINK1</b>	Proteina chinasi
<b><i>PARK7</i></b>	1p36	AR	<b>DJ-1</b>	Membro fam. chaperoni molecolari ThiJ-Pfpl
<b><i>PARK8</i></b>	12p12	AD	<b>LRRK2</b>	Proteina chinasi
<b><i>PARK9</i></b>	1p36	AR	<b>ATP13A</b>	ATPasi lisosomiale
<b><i>PARK10</i></b>	1p	AD	?	?
<b><i>PARK11</i></b>	2p37	AD	<b>GIGYF2</b>	?
<b><i>PARK12</i></b>	Xq21-q25	X-linked	?	?
<b><i>PARK13</i></b>	2p13	?	<b>Omi/HTrA2</b>	Serin proteasi mitocondriale
<b><i>PARK14</i></b>	22q13	AR	<b>PLA2G6</b>	Fosfolipasi
<b><i>PARK15</i></b>	22q11	AR	<b>FBX07</b>	Ubiquitina Ligasi E3
<b><i>PARK16</i></b>	1q32	?	?	?

**Tabella 2.** Geni coinvolti nelle forme monogeniche di PD. AD = autosomico dominante, AR = autosomico recessivo

### **1.3 Le forme di Parkinson ad eredità mendeliana e i geni ad esse correlati**

Nonostante le forme genetiche della malattia di Parkinson rappresentino solo una piccola percentuale dei casi, studi condotti in sistemi modello per lo studio dei geni responsabili del Parkinson di tipo familiare hanno enormemente contribuito alla comprensione dell'eziopatologia della malattia. In questo paragrafo verranno illustrate le principali caratteristiche dei geni associati alla malattia più studiati (PARK1/4, PARK2, PARK5, PARK6, PARK7) si rimanda invece al paragrafo 1.5 per una più approfondita presentazione del locus PARK8, oggetto di questa tesi.

#### **Alpha-sinucleina (PARK1 e PARK4)**

Sebbene i corpi di Lewy rappresentino uno dei principali segni neuropatologici della malattia di Parkinson, e siano stati osservati per la prima volta già nel 1912, soltanto nel 1997 l'alfa-sinucleina è stata identificata come la più abbondante componente di queste inclusioni proteiche (Spillantini et al., 1998). L'associazione gene-malattia deriva da studi effettuati su cinque generazioni dei componenti della famiglia italo-americana Contursi nella quale circa 60 membri affetti da PD presentavano una mutazione missenso sul gene SNAC codificante per l'alfa-sinucleina. Il gene codificante per l'alfa-sinucleina è localizzato sul cromosoma 4 (q21;q 23) e viene trascritto in un mRNA di 816 nucleotidi. L'  $\alpha$ -sinucleina è un'abbondante proteina di 140 amminoacidi altamente solubile nel citoplasma neuronale nella quale si distinguono alcune regioni caratteristiche: una porzione N-terminale contenente ripetizioni di alfa eliche antipatiche probabilmente implicate nella interazione con lipidi di membrana; un dominio centrale idrofobico e una porzione C-terminale ricchissima di cariche negative, acida. L'  $\alpha$ -sinucleina è espressa principalmente nei neuroni del sistema nervoso centrale (SNC) ed in particolare nei terminali presinaptici neuronali ma è stata riscontrata anche in altri tessuti come per esempio le cellule ematopoietiche [Lee and Trojanowski, 2006]. Il suo

ruolo fisiologico è ancora scarsamente compreso ma alcuni studi suggeriscono un suo coinvolgimento nella modulazione della trasmissione sinaptica [Waxman et al., 2009], nella plasticità neuronale e nella regolazione del rilascio di neurotrasmettitori [Thomas and Beal, 2011]. Altri studi dimostrano una partecipazione della sinucleina nelle dinamiche della membrana cellulare: pare che la proteina leghi i lipidi di membrana e che da tale legame scaturisca un cambiamento conformazionale della stessa sinucleina che stabilizza la sua porzione N-terminale in una struttura secondaria stabile ad alfa eliche [Dauer and Przedborski, 2003]. Comunque modelli murini knockout del gene SNCA vivono senza manifestare alcun tipo di anormalità e mostrano una morfologia cerebrale intatta.

Oltre alle tre mutazioni puntiformi missenso Ala<sup>53</sup>→ Thr , Ala<sup>30</sup>→Pro e Glu<sup>46</sup>→Lys anche duplicazioni e triplicazioni del gene SNCA sono associate alla forma mendeliana ad eredità dominante della malattia di Parkinson. Sia le mutazioni patogeniche che l'elevata concentrazione citoplasmatica sembrano indurre una propensione della proteina a sviluppare strutture  $\beta$ -sheet che più facilmente tendono a polimerizzare e dare origine ad aggregati come le fibrille. Queste fibrille, insolubili, sono le componenti dei corpi di Lewy a cui alcuni studiosi attribuiscono un ruolo protettivo in quanto sequestrano gli oligomeri e le fibrille che sono sicuramente tossiche per la cellula neuronale [Thomas, 2011].

Nonostante i numerosi studi rimane elusivo il meccanismo con cui gli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina portino alla morte neuronale. Una ipotesi è che gli oligomeri alterino la stabilità e la permeabilità della membrana cellulare causando la formazione di pori che portano ad un incremento del calcio intracellulare fino a livelli tossici. Un'altra ipotesi è che noti i legami della  $\alpha$ -sinucleina con le membrane cellulari compresa quella mitocondriale, la sua iperespressione possa generare disfunzioni mitocondriali (attraverso l'inibizione del complesso I) da cui accumulo di specie reattive dell'ossigeno ed infine neuro degenerazione [Waxman and Giasson, 2009; Cookson, 2009].

## **Parkina (PARK2)**

Immediatamente dopo la scoperta dell' $\alpha$ -sinucleina è stata identificata un'altra proteina implicata nell'insorgenza di forme di PD questa volta con modalità di trasmissione di tipo autosomico recessiva: la parkina. Questo gene è stato associato con forme di PD ad esordio precoce (tra i venti ed i quaranta anni), progressione lenta della malattia, responsivi al trattamento con L-DOPA e generale assenza di corpi di Lewy [Thomas and Beal, 2007; Farrer, 2001] .

Il gene *PARK2* è localizzato sul cromosoma 6q25.2-q27 [Matsumine et al., 1997], il suo trascritto si compone di circa 1400 nt e codifica per una proteina di 465 amminoacidi. La parkina si localizza nel citoplasma e possiede un segmento N-terminale simile a quello dell'ubiquitina (che lega una subunità del proteasoma) e due motivi RING finger, tipici delle E3 ubiquitina-ligasi, enzimi che legano covalentemente molecole di ubiquitina a residui di lisina di specifiche proteine bersaglio, le quali devono essere degradate attraverso il proteasoma [Sullivan et al., 2004; Farrer, 2006]. Ciò ha fatto ipotizzare che anche la parkina partecipi al processo di degradazione proteica che fa capo al sistema ubiquitina-proteasoma [Shimura et al., 2000]. La presenza di proteine in eccesso prodotte a livello neuronale, che porterebbero alla morte i neuroni stessi, potrebbe essere causata da un'alterazione della funzionalità del gene della parkina (mutazione con perdita di funzione), anche perché la maggior parte delle mutazioni sembrano inficiare proprio la funzione E3-ligasica [Lim and Tan, 2007; Mizuno et al., 2008].

La parkina sembra inoltre rivestire un essenziale ruolo nel processo di formazione dei corpi di Lewy, poiché sembra in grado di sequestrare gli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina [Shimura et al., 2001]. Le mutazioni che aboliscono l'attività della parkina (a differenza di quelle che ne riducono solo il funzionamento) sembrerebbero infatti essere associate all'assenza di inclusioni intracellulari. Ciò contribuisce ad assegnare ad un malfunzionamento del proteasoma un ruolo centrale nella patogenesi del Parkinson [Zhang et al., 2000]. Gli eventi molecolari indotti dalla presenza di parkina mutata che portano alla degenerazione neuronale sembrano dunque essere, nell'ordine: accumulo dei substrati specifici ed altre proteine, inibizione del proteasoma, morte cellulare. In realtà, modelli sperimentali animali hanno permesso di rivelare un

possibile ulteriore ruolo della parkina nel mantenimento delle funzioni mitocondriali e nella prevenzione dello stress ossidativo attraverso meccanismi e vie comuni anche ad un'altra proteina, PINK1, associata anch'essa a forme genetiche di malattia di Parkinson [Clark et al., 2006; Park et al., 2006]. In particolare, questa proteina sarebbe coinvolta nel mantenimento dell'integrità della membrana mitocondriale e potrebbe coadiuvare la rimozione di proteine ossidativamente danneggiate. Inoltre, la presenza di molecole che provocano stress ossidativo (tra cui la stessa dopamina) è in grado di alterare la solubilità della parkina provocandone l'aggregazione [Mizuno et al., 2008].

### **Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1, UCHL-1 (PARK5)**

Un'altra molecola di cui è stato individuato un probabile ruolo nel PD è l'ubiquitina idrolasi-L1 carbossi terminale (UCHL-1); questa molecola è stata individuata per la prima volta in due fratelli tedeschi affetti da PD ed è codificata da un gene sito sul cromosoma 14 (q14;q15.1). UCHL-1 è un enzima molto abbondante nel cervello la sua funzione pare essere correlata con il riciclo dell'ubiquitina polimerica e con la sua conversione in monomeri. Mutazioni del gene PARK5 si correlano a una riduzione dell'attività enzimatica della proteina con conseguenze alterazione del sistema ubiquitina proteasoma. Ancora una volta alterazioni a livello del proteasoma pare siano implicate nelle modificazioni molecolari correlate con il PD; è importante però sottolineare che il ruolo di UCHL-1 nell'insorgenza del PD non è stato ancora del tutto confermato [Gandhi and Wood, 2005]

### **PTEN-induced kinase 1, PINK-1 (PARK6)**

Il locus PARK6 è stato associato ad un'altra forma di PD a carattere autosomico recessivo con esordio giovanile. Questo gene si localizza sul cromosoma 1 (p35;p36) e codifica per una proteina di 581 amminoacidi denominata PINK1 [Valente et al., 2001; Valente et al., 2004]. La porzione N-terminale di questa proteina presenta un segnale di localizzazione mitocondriale mentre nella regione C-terminale si trova un dominio serin/treonin chinasi [Silvestri et al., 2005; Ghandi et al., 2006].

La proteina PINK1 è espressa ubiquitariamente nel cervello e negli organi sistemici e la sua funzione non è stata ancora del tutto chiarita, ma sembrerebbe coinvolta nella risposta del mitocondrio agli stress ossidativi cellulari. Risposta che potrebbe essere mediata dalla regolazione dei flussi del calcio che influenzano numerosi processi mitocondriali quali la mobilità, la formazione di ROS e l'efficienza respiratoria mitocondriali [Li et al., 2009]. Recenti studi hanno permesso l'identificazione di alcuni substrati della proteina PINK1, alcuni dei quali già indipendentemente associati alla malattia di Parkinson, che hanno consentito importanti progressi nella comprensione del suo ruolo fisio-patologico e dei meccanismi patogenetici del PD. PINK1 interagisce e colocalizza nel mitocondrio con la proteina TRAP1, uno chaperone mitocondriale noto anche come heat shock protein 75 (Hsp 75), e fosforila TRAP1 *in vivo* e *in vitro* [Pridgeon J. Et al., 2007]. Gli studi sulla natura di questa interazione dimostrano che PINK1 protegge la cellula dagli stimoli apoptotici indotti da stress ossidativo: la proteina TRAP1 endogena viene costitutivamente fosforilata a bassi livelli, mentre in risposta a stress ossidativo indotto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> il suo grado di fosforilazione aumenta notevolmente; sia la fosforilazione costitutiva che quella indotta sono significativamente incrementate dall'iperespressione di PINK1 e sono invece ridotte dal suo silenziamento. Inoltre l'iperespressione di PINK1 in cellule PC12 stressate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> riduce sensibilmente il rilascio del citocromo c. Alla luce di questi risultati gli autori propongono una via anti-apoptotica mitocondriale PINK1-TRAP1 che viene distrutta in presenza delle mutazioni della proteina PINK1 associate alla malattia di Parkinson [Pridgeon J. et al., 2007]. PINK1 sembrerebbe inoltre coinvolta in un'altra via importante nella protezione della cellula dagli insulti dello stress ossidativo, ancora una volta in concerto con un'altra proteina già associata alla malattia di Parkinson: htrA2, una serin proteasi localizzata nel mitocondrio. PINK1 fosforila HtrA2 modulandone l'attività proteolitica che contribuisce ad aumentare la resistenza cellulare agli stress [Plun-Favreau et al., 2007]. Più recentemente Wang e collaboratori hanno delineato una nuova via attraverso cui PINK1 immobilizzando i mitocondri danneggiati circoscrive i conseguenti danni cellulari causati dal rilascio di ROS ad una piccola regione della cellula confinando gli organuli difettosi in una sorta di quarantena prima della loro definitiva rimozione mediante autofagosoma. Le cellule mantengono il

loro equilibrio energetico prevenendo i danni da stress ossidativo attraverso una fine regolazione dei movimenti, della distribuzione e clearance dei mitocondri. PINK1 interviene nel controllo di questo equilibrio intervenendo sulla motilità dei mitocondri. Nello specifico è stato dimostrato che PINK1 interagisce, fosforilandola, con la proteina Miro, componente di un complesso che ancora la kinesina alla superficie mitocondriale regolando il trasporto dell'organulo lungo l'assone [Wang et al, 2011]. La fosforilazione di Miro innesca la sua degradazione secondo una via Parkina-dipendente. La rimozione di Miro comporta la perdita dell'ancoraggio alla kinesina lasciando il mitocondrio immobilizzato fino alla sua completa degradazione. L'attivazione di questa via PINK1-Parkina è fondamentale per garantire la rimozione dei mitocondri danneggiati prima che il danno si estenda nell'ambiente cellulare [Geisler et al., 2010; Narendra et al., 2010]. Di conseguenza i neuroni difettivi per PINK1 e/o parkina presentano un'inefficiente clearance mitocondriale che li rende più sensibili alla degenerazione [Ghandi et al., 2009; Surmeier et al., 2010].

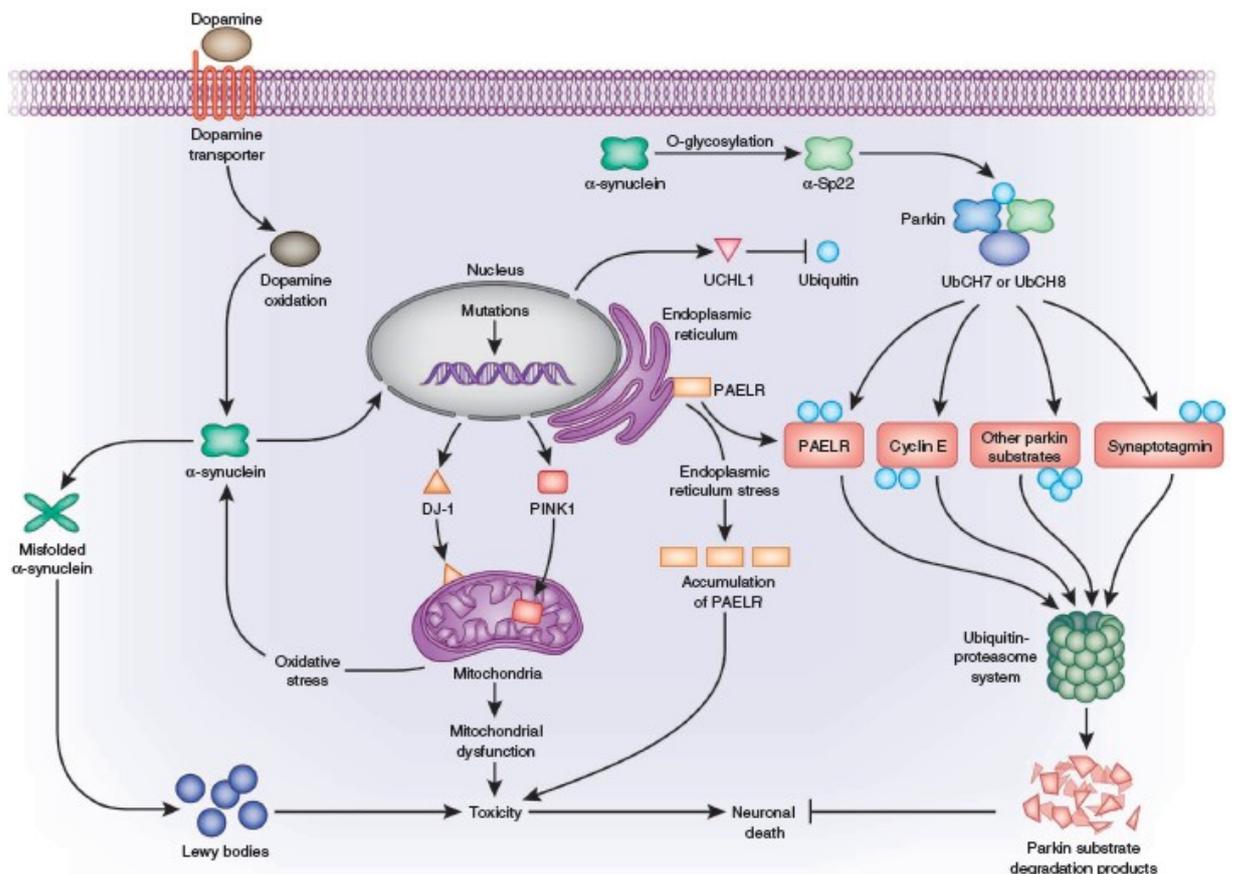
### **DJ-1 (PARK7)**

La malattia di tipo 7 è un altro esempio di rara forma di parkinsonismo autosomico recessivo con esordio giovanile. Le manifestazioni cliniche associate al gene PARK7 sono molto simili a quelle legate al PARK2 tranne un'atipica componente psichiatrica. Questo gene si localizza sul cromosoma 1 (p36) e codifica per una proteina di 189 amminoacidi identificata come DJ-1 da Bonifati nel 2003. La proteina DJ-1 è largamente espressa nei tessuti periferici e nel cervello, inclusi lo striato e la substantia nigra ma è nel cervelletto, nell'ippocampo e nel bulbo olfattorio che la sua espressione è maggiore. Si presenta come un omodimero e nella forma WT si localizza nel citosol, nel nucleo e nei mitocondri ma in condizioni di stress ossidativo viene preferenzialmente traslocato nella matrice e nello spazio intermembrana del mitocondrio dove esplica la sua azione protettiva nei confronti delle ROS. La proteina DJ-1 è sensibile ai livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in presenza dei quali subisce uno shift del suo punto isoelettrico verso valori più acidi: il gruppo sulfidrilico del residuo aminoacidico Cys106 (residuo altamente conservato negli eucarioti) reagisce con l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e viene convertito in Cys-SO<sub>2</sub>H [Hulleman et al., 2007]. La

sostituzione di questo residuo con un'alanina distrugge l'effetto protettivo di DJ-1 in presenza di stress ossidativo. Questi dati suggeriscono per la proteina un ruolo importante nel coordinamento delle risposte cellulari allo stress ossidativo ma intorno alle sue funzioni fisiologiche c'è poca chiarezza: DJ-1 è stato inizialmente descritto come oncogene, regolatore della trascrizione, coinvolto nel controllo della fertilità e come chaperone molecolare sembra essere in grado di limitare l'aggregazione dell'alfa-sinucleina nei neuroni [Cookson, 2010]. L'iperespressione della proteina in colture cellulari ha un effetto protettivo, dovuto non solo alla sua azione antiossidante ma probabilmente anche ad un ruolo nella regolazione dell'apoptosi. E' stata descritta anche una possibile interazione di DJ-1 con PINK1 [Tange et al., 2006] e con la parkina [Moore et al., 2005]. Nell'insieme questi dati rafforzano il ruolo delle disfunzioni mitocondriali nella patogenesi della malattia di Parkinson e pongono le basi per ulteriori studi sull'interazione tra i diversi geni associati con la malattia.

## 1.4 Patogenesi della malattia di Parkinson

Numerosi studi sperimentali condotti *in vitro*, su modelli animali e su tessuti umani *post mortem*, sono stati condotti per cercare di comprendere il meccanismo molecolare responsabile della morte dei neuroni dopaminergici e quindi dell'insorgenza del morbo di Parkinson. Un possibile meccanismo unitario pone in relazione il ruolo delle disfunzioni mitocondriali, del sistema ubiquitina proteasoma (UPS), dello stress ossidativo e dei fenomeni apoptotici nell'insorgenza del danno ai neuroni dopaminergici e quindi nella loro morte [Shapira, 2008].



**Figura 6.** Rappresentazione schematica dei meccanismi eziopatogenici coinvolti nella malattia di Parkinson. La morte dei neuroni dopaminergici nella SN potrebbe avere diverse cause: accumulo di aggregati proteici ( $\alpha$ -sinucleina), stress ossidativo, disfunzioni del sistema lisosomale e/o proteosomale, alterata attività mitocondriale [Obeso et al., 2010].

### 1.4.1 Ruolo del mitocondrio nella patogenesi della Malattia di Parkinson

I mitocondri sono degli organelli intracellulari deputati alla produzione di energia e a tutta una serie di altre funzioni tra cui la regolazione dello stress ossidativo e la detossificazione da radicali liberi. Disfunzioni del mitocondrio sono implicate in diverse malattie neurodegenerative quali l'Alzheimer e la malattia di Huntington [Thomas and Beal, 2007].

La prima prova di un coinvolgimento dell'organulo nell'insorgenza del PD si ebbe nel 1982 tramite il caso dei "tossicodipendenti congelati": in seguito all'assunzione di una dose di eroina impura con tracce di MPTP alcuni individui svilupparono una sindrome parkinsoniana. L' 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+) determina iperproduzione di radicali liberi, produzione di ossido nitrico, danno al "complesso I" mitocondriale con conseguente apoptosi [Langston et al., 1983]. L'analisi *post mortem* di pazienti affetti da malattia di Parkinson ha permesso inoltre di evidenziare a livello dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra* alti livelli di mutazioni a carico del DNA mitocondriale (mtDNA) che potrebbero scaturire da un' eccessiva esposizione ai radicali liberi [Bender et al., 2006; Shapira, 2011]. La conseguenza principale delle disfunzioni mitocondriali è la riduzione della sintesi di ATP che si ripercuote su tutta una serie di processi a valle tra i quali per esempio la funzionalità del sistema di degradazione proteica UPS, e comporta inoltre un aumento dei radicali liberi e dello stress ossidativo cellulare che concorrono all'induzione di processi apoptotici MT-dipendente [Andersen, 2004]. Evidenze dell'aumento dei processi ossidativi sono state rilevate mediante analisi post-mortem in cervelli di pazienti affetti da PD nei quali si rinvennero un aumento di marker lipidici perossidati e delle proteine nitate. Sempre in analisi post mortem, di soggetti affetti da Parkinson idiopatico, è stata rilevata una riduzione di circa il 30 % del complesso I mitocondriale [Orth et al., 2003].

L'identificazione di specifiche mutazioni geniche che causano PD hanno rafforzato la rilevanza dello stress ossidativo e delle disfunzioni mitocondriali sia nelle forme sporadiche che in quelle familiari della malattia. Le proteine associate con forme familiari di parkinson, PINK, DJ-1,  $\alpha$ -sinucleina, LRRK2, parkina, sono correlate con le funzioni mitocondriali e tutte interferiscono

direttamente o indirettamente con lo stress ossidativo e con il danno da radicali liberi [Shapira, 2008].

Ad esempio, l'iperespressione di alfa-sinucleina mutata rende i neuroni più vulnerabili al danno ossidativo indotto da dopamina e tossine mitocondriali, mentre, viceversa, i topi KO per l'alfa-sinucleina hanno mostrato una marcata resistenza all'MPTP e ad altri composti dannosi per i mitocondri. Un deficit di alfa-sinucleina sarebbe quindi correlato ad una riduzione dello stress ossidativo, anche perché la proteina è in grado di modulare il rilascio della dopamina dalle vescicole sinaptiche, con conseguente autossidazione e produzione di radicali liberi. Inoltre, la generazione di specie reattive sembra incrementare l'aggregazione dell'alfa-sinucleina e quindi la sua possibile tossicità, in una sorta di circolo vizioso [ Shapira, 2008 ].

Come precedentemente esposto, anche la parkina sembra rivestire un ruolo nel mantenimento delle funzioni mitocondriali (in particolare dell'integrità di membrana) e nella prevenzione dello stress ossidativo, tramite la rimozione di proteine ossidativamente danneggiate, altresì la parkina è in grado di impedire il rilascio di citocromo c e l'attivazione di caspasi che hanno la funzione di avviare processi apoptotici mitocondrio dipendente [Silvestri et al., 2005]. La parkina è inoltre capace di indurre la biogenesi del MT attivando il fattore di biogenesi mitocondriale A (TFAM) che riduce le disfunzioni del mitocondrio stesso [Shapira, 2008].

Anche PINK1, localizzata sia nel citoplasma che all'interno del mitocondrio, proteggerebbe dalle disfunzioni mitocondriali e dall'apoptosi indotta da stress ossidativo, ad esempio cellule SHSY5Y che iperesprimono forme mutate della proteina PINK1 perdono il loro ruolo protettivo nei confronti della tossicità indotta dalla molecola MTPT [Shapira, 2008] ; DJ-1, infine, agirebbe come proteina anti-ossidante o come sensore dello stress ossidativo. Topi knockout per DJ-1 presentano un aumentata sensibilità all'MPTP [Ghandi and Wood, 2005].

Infine la proteina LRRK2 si localizza prevalentemente nel citosol ma circa il 10% della proteina totale si trova adeso alla membrana mitocondriale esterna [West et al., 2005; Biskup et al., 2006; Gloeckner et al., 2006]. In sistemi cellulari le forme mutate di LRRK2 mostrano un incremento dell'attività chinastica [ West et

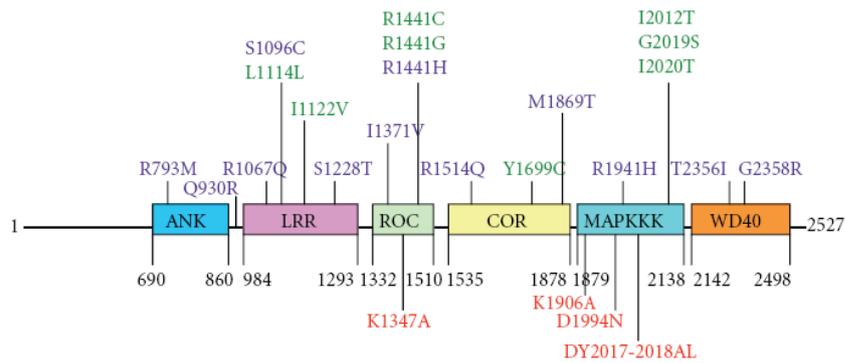
al., 2005] e inducono morte cellulare mediante un meccanismo mitocondrio dipendente che comporta il rilascio di citocromo c [Iaccarino et al., 2007]

## **1.5 Funzioni fisio-patologiche della proteina LRRK2**

### **1.5.1 Caratteristiche generali e domini strutturali di LRRK2**

Il locus PARK8 è stato associato alla malattia di Parkinson per la prima volta nel 2002 da Funayama e colleghi in una numerosa famiglia giapponese che presentava parkinsonismi con eredità autosomica dominante senza la comparsa di corpi di Lewy. Due anni dopo due gruppi di studio indipendenti hanno identificato nel locus Park8 il gene LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2) [Zimprich et al., 2004] [Paisan-Ruiz C et al., 2004].. In seguito sono state riconosciute numerose sostituzioni amminoacidiche associate con fenotipi patologici [Kachergus et al., 2005]. Il gene codificante per LRRK2 si trova sul cromosoma 12 in posizione q12 si compone di 51 esoni e codifica per una proteina di 2527 amminoacidi contenente 6 domini funzionali conservati [ Li and Beal, 2005]:

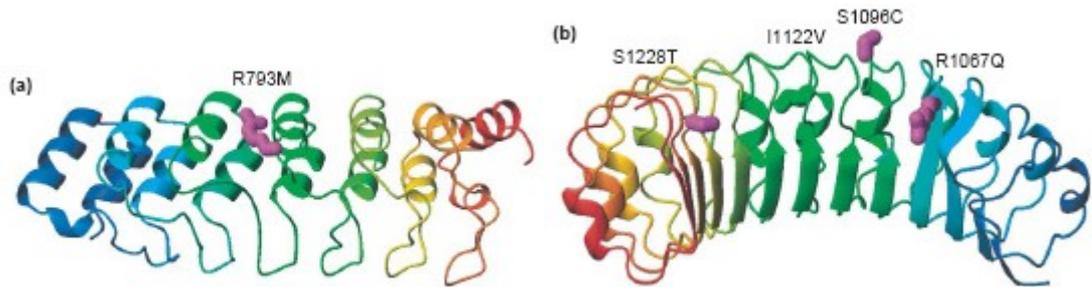
- un dominio “ankyrin repeat”;
- un dominio ricco di leucine (LRR, leucine-rich repeats), contenente un motivo di 22-28 amminoacidi ripetuto 12 volte;
- un dominio Roc con attività GTPasica;
- una porzione COR (C terminal of ROC);
- una regione chinasi omologa alle MAP-chinasi-chinasi-chinasi (MAPKKK);
- un dominio WD-40 in posizione C-terminale;



**Figura 7.** Struttura dei domini di LRRK2 e mutazioni associate al PD [Li T. et al., 2011]

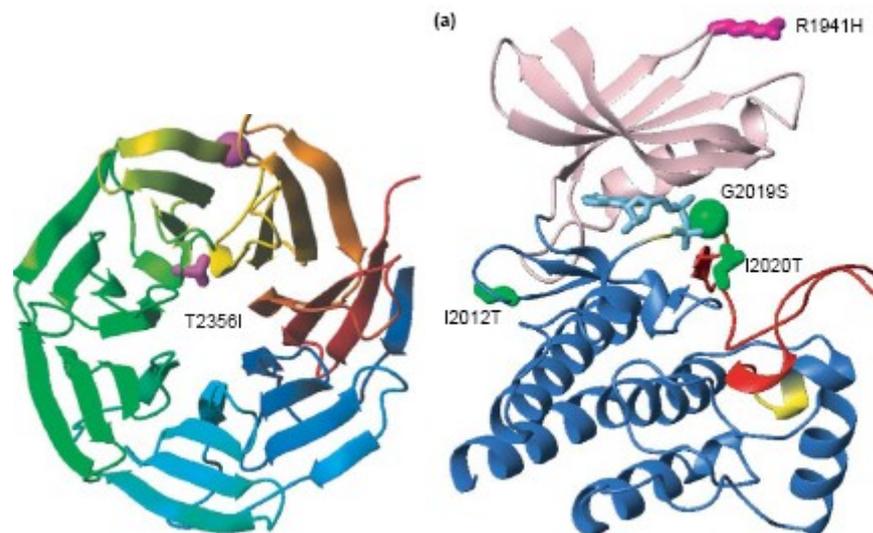
La combinazione di questi motivi strutturali è altamente conservata all'interno dei vertebrati e mostra omologia con la famiglia delle proteine ROCO, in cui il dominio chinasi presenta un'attività catalitica regolata dal dominio GTPasi [Marin et al., 2008]. Il dominio ankyrin è costituito dalla ripetizione di 7 motivi anchirina ciascuno dei quali consta di 2 eliche antiparallele seguite da una  $\beta$ -forcina o un loop. Questo motivo è ricorrente in numerose proteine sia procariotiche sia eucariotiche: proteine del citoscheletro, fattori di trascrizione, proteine segnale e regolatrici del ciclo cellulare [Mosavi et al., 2004].

Il dominio LRR è costituito da 13 ripetizioni di un motivo di circa 30 aminoacidi strutturato in un foglietto  $\beta$  seguito da un' $\alpha$  elica che si ripiegano con una forma ad arco. In generale la faccia concava dell'arco funge da superficie di interazione, in essa infatti si concentrano aminoacidi con carica netta positiva, mentre il resto della struttura assolve il ruolo di impalcatura. Le ripetizioni ricche in leucine si ritrovano in proteine virali, batteriche ed eucariotiche e sembrano rappresentare una piattaforma strutturale per la formazione di interazioni proteina-proteina. Tra le principali proteine contenenti domini LRR annoveriamo recettori tirosin-chinasi, fattori di virulenza, glicoproteine di membrana che rivestono un ruolo significativo in molti processi biologici: trasduzione del segnale, adesione cellulare, ricombinazione, trascrizione, apoptosi e risposta immunitaria.



**Figura 8.** Rappresentazione schematica della struttura terziaria dei domini ANK (a) ed LRR (b). In evidenza alcune mutazioni puntiformi identificate in questi due domini [Mata et al.,2006]

Il dominio WD-40 (noto anche come ripetizioni della beta-transducina) è formato da motivi ripetuti di circa 40 aminoacidi, che terminano spesso con un dipeptide triptofano-aspartato. Ciascun motivo è costituito da 4 foglietti  $\beta$  antiparalleli che si organizzano in una struttura circolare, la ripetizione di 7 di questi motivi si dispone a formare una rigida piattaforma con una faccia ricca di residui di arginina carichi positivamente. Proteine contenenti domini WD-40 sono state trovate in tutti gli eucarioti e sono implicate in una grande varietà di funzioni, tra cui trasduzione del segnale, regolazione della trascrizione, controllo del ciclo cellulare ed apoptosi. Il compito principale dei domini WD-40 è quello di coordinare l'assemblaggio di complessi multi proteici. Esempi di complessi contenenti domini WD-40 sono le proteine G (la cui subunità beta ha una struttura ad elica beta) e l'ubiquitina ligasi E3 [Mata et al., 2006].



**Figura 9.** Rappresentazione della struttura terziaria del domini WD-40 e chinasi di LRRK2 [Mata et al., 2006]

I domini catalitici delle protein-chinasi consistono normalmente di 250-300 residui aminoacidici ed hanno una forma bilobata: la regione N-terminale ha la funzione di legare e orientare i nucleotidi (donatori di gruppi fosfato) e presenta una struttura predominante a foglietti  $\beta$  ( in rosa nella figura 9); il lobo C-terminale è responsabile del legame col substrato e si organizza prevalentemente in motivi ad  $\alpha$ -elica (in blu nella figura 9). Tra i 2 lobi si crea una fessura in cui risiede il sito catalitico, un segmento di 20-35 aminoacidi che nella maggior parte delle protein chinasi richiede fosforilazione per essere attivato [Mata et al., 2006]

Recenti studi di analisi dell'espressione dell'mRNA di LRRK2 dimostrano che il trascritto è presente in numerosi organi e tessuti quali alcune aree del cervello, cuore, fegato, reni, polmoni e leucociti . E' particolarmente abbondante nella corteccia, nello striato, nel cervelletto, nell'ippocampo e nel tubercolo olfattivo mentre si riscontra a livelli più bassi nella *substantia nigra* [Melrose et al., 2006] .La localizzazione intracellulare della proteina sembra essere per lo più citosolica con una forte componente associata alle membrane, alle vescicole e agli organelli cellulari inclusi mitocondri, lisosomi, Golgi e reticolo endoplasmico come anche ai microtubuli delle strutture citoscheletriche [Higashia et al., 2007; Galter et al., 2006; Biskup et al., 2006]. West e collaboratori hanno dimostrato che circa il 10% della LRRK2 totale si trova associato alla membrana mitocondriale esterna [West et al., 2005]

Le mutazioni patologiche di LRRK2 non sembrano avere effetti sulla stabilità o localizzazione della proteina, ma alcune di esse alterano l'attività chinastica; sono infatti concentrate nella porzione centrale del gene che comprende il dominio Roc GTPasico ed il dominio chinastico [Cookson, 2010]; in particolare un aumento dell'attività chinastica sembra sufficiente a generare tossicità neuronale implicata con l'insorgenza del PD [West et al., 2005; Li and Beal, 2005; Anand et al., 2009]. Studi sperimentali su linee cellulari indicano che LRRK2 ha una lunga emivita, e che, specialmente se coespressa con la parkina, ha tendenza a formare aggregati che vengono ubiquitinati attraverso un processo che, indirettamente, chiama in gioco anche la parkina [Smith et al., 2005]. Sono state descritte oltre 75 varianti della proteina LRRK2, ma non tutte costituiscono predisposizione alla malattia di Parkinson: per lo più si tratta di mutazioni

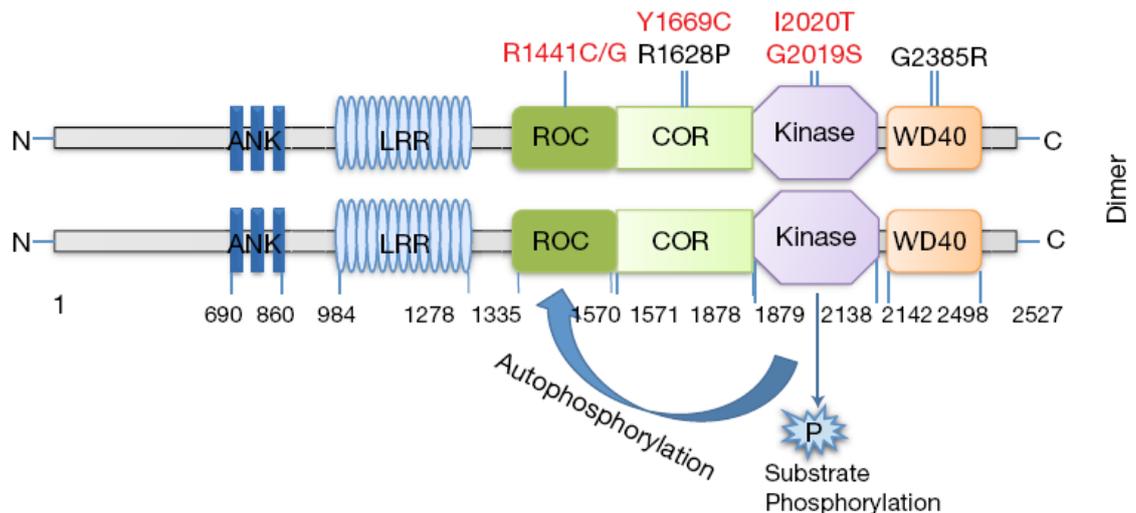
benigne o polimorfismi. Alcune invece rappresentano forme patogeniche associate al PD ed interessano per lo più la regione enzimatica della proteina: il dominio Roc presenta mutazioni multiple al sito R1441 di cui una presenta un'alta incidenza esclusivamente nella popolazione Basca (R1441G), la seconda, R1441C, originaria del Belgio si è diffusa per "effetto fondatore" in tutta Europa, una terza è stata descritta in pazienti italiani (R1441H) [Paisan-Ruiz, 2009]. Gli effetti di queste mutazioni sembrerebbero condurre ad un'alterazione dell'attività GTPasica, ma gli effetti di quest'ultimo sulla regolazione dell'attività chinasica sono alquanto discordanti. Nel dominio Cor è stata descritta una mutazione patogenica (Y1699C) mentre nel dominio chinasico abbiamo due mutazioni adiacenti (G2019S e I2020T) di cui la sostituzione G2019S rappresenta la sostituzione patogenica più diffusa fra le forme familiari di PD, riscontrabile anche in casi di malattia definiti sporadici [Dachsel and Farrer, 2011; Cookson, 2010; Gandhi et al., 2009]. I risultati degli studi sugli effetti delle forme mutate della proteina LRRK2 sono concordi nell'attribuire a tale sostituzione un incremento dell'attività chinasica in modelli cellulari. Infatti il residuo 2019 si trova in un loop che come un nastro protegge chiudendolo il sito catalitico, la sostituzione della glicina con una serina costringe il sito a mantenere uno stato costitutivamente attivo che porta ad una aumentata attività chinasica [Melrose, 2008; Anand and Braithwaite, 2009]. Risultati discordanti sugli effetti di alcune mutazioni (R1441C, R1441H, I2020T) sono probabilmente dovuti a differenze nei costrutti utilizzati (alcuni utilizzano l'intera sequenza LRRK2 altri porzioni di essa), ai sistemi di espressione usati (differenti linee cellulari: HEK293, Cos-7, SH-SY5Y; topi transgenici).

Dall'avvenuta associazione gene-malattia nel 2004, numerosi studi epidemiologici hanno mostrato che mutazioni di LRRK2 sono responsabili di circa il 10% dei casi di PD familiare e soprattutto fino al 4% dei casi sporadici. La mutazione della guanina in posizione 6099 in alanina, Gly2019Ser (G2019S) rappresenta la più frequente sostituzione nella popolazione caucasica: causa infatti l' 1-2% dei casi di Parkinson sporadico e il 6% di patologia familiare ma ancora più elevata è la sua frequenza nelle popolazioni del Nord Africa e negli Ebrei Ashkenazi (13-41% dei casi sporadici di PD e fino al 40% dei casi familiari) [Lesage et al., 2006; Ozelius et al., 2006]. La penetranza della malattia è

dipendente dall'età: varia dal 28% intorno ai 60 anni fino all'74% intorno agli 80 [Wirdefeldt, 2011]. Per quanto riguarda la Sardegna, uno studio pubblicato nel 2006 da Cossu e coll. ha mostrato che la mutazione G2019S è presente nell'isola anche se con una frequenza minore rispetto alle popolazioni su descritte mentre la mutazione R1441C è molto rara se non addirittura assente. Inoltre sempre in tale studio è stato individuato un soggetto di 85 anni neurologicamente sano portatore della mutazione al sito 2019 (G2019S), dato che conferma la teoria di una penetranza incompleta di tale mutazione [Cossu et al., 2007].

### **1.5.2 Coinvolgimento di LRRK2 nella malattia di Parkinson**

Ad oggi pochissimo è noto per quanto concerne le funzioni fisiologiche della dardarina . Nonostante i suoi domini funzionali indichino sicuramente un ruolo chiave nella sua attività chinasi e GTPasi e nelle interazioni proteina-proteina i substrati fisiologici di LRRK2 sono ancora oggetto di intense ricerche. La regolazione dell'attività chinasi è complessa e probabilmente richiede eventi di fosforilazione intra ed intermolecolari: alcuni studiosi hanno dimostrato che i domini chinasi e GTPasi lavorano influenzandosi reciprocamente, in particolare l'attività del dominio chinasi necessita del legame con il GTP , mentre l'attività GTPasi sembra funzionare in maniera indipendente da quella chinasi [West et al., 2007] . Una interpretazione di questi dati è che il ruolo del dominio chinasi sia quello di regolare con meccanismo GTP-dipendente tutte le funzioni di LRRK2 [Kumar and Cookson, 2011]. Un altro meccanismo comune alle protein chinasi per regolare la propria attività consiste nel formare dimeri, Greggio e collaboratori hanno dimostrato che la dardarina tende a formare complessi di alto peso molecolare tra i quali il dimero rappresenta la specie più abbondante (Figura 10) ed è inoltre capace di auto fosforilarsi in *cis* [Greggio et al.,2008; Cookson, 2010].



**Figura 10.** Domini e mutazioni nella proteina LRRK2. In evidenza l'interazione tra il dominio GTPasico e chinasi [Kumar and Cookson, 2011]

Studi recenti dimostrano che mutazioni di LRRK2 correlate alla malattia di Parkinson provochino tossicità neuronale. Alcune mutazioni patogenetiche aumentano la tendenza di LRRK2 a formare corpi di inclusione in sistemi cellulari [Greggio et al., 2006]. La presenza di aggregati proteici nei neuroni dei soggetti affetti da Parkinson in cui sono presenti mutazioni di *LRRK2* suggerisce che uno degli effetti a valle delle alterazioni del gene *PARK8* legati all'attività chinasi della proteina possa essere l'aggregazione proteica. Colture cellulari trasfettate con LRRK2 wt e mutata mostrano aggregati e tossicità cellulare che viene soppressa trasfettando varianti che manifestano invece una diminuzione dell'attività chinasi [Dachsel and Farrer, 2011]. Secondo alcuni studiosi esiste un meccanismo comune che coinvolgerebbe LRRK2 ed  $\alpha$ -sinucleina, infatti l'  $\alpha$ -sinucleina depositata nei corpi di Lewy è abbondantemente fosforilata su un residuo di serina in posizione 129 e le proteine fosforilate manifestano una tendenza maggiore a formare aggregati, essendo LRRK2 una protein chinasi sembra plausibile che essa fosforili l' $\alpha$ -sinucleina scatenando il processo neurodegenerativo. Qing e collaboratori hanno co-immunoprecipitato LRRK2 e  $\alpha$ -sinucleina da tessuti patologici positivi ai corpi di Lewy e da cellule HEK293 sottoposte a stress ossidativo [Qing et al., 2009 a], sembra inoltre che l' $\alpha$ -sinucleina ricombinante sia direttamente fosforilata da lisato cellulare di cellule HEK293 che iperesprimono LRRK2 [Qing

et al., 2009 b]. Cellule SH-SY5Y cotrasfettate con LRRK2 (wt e G2019S) e  $\alpha$ -sinucleina mostrano un aumentato grado di aggregazione, un incremento della fosforilazione e rilascio nel mezzo extracellulare della  $\alpha$ -sinucleina [Kondo et al., 2011]. Nell'insieme questi dati confermano l'ipotesi di Lin e collaboratori secondo cui esiste un'importante relazione funzionale tra LRRK2 ed  $\alpha$ -sinucleina nell'innescare gli eventi che portano a neurodegenerazione nella malattia di Parkinson.

L'identificazione di possibili interattori molecolari della proteina LRRK2 è molto utile per chiarire le sue funzioni fisiologiche. Ad oggi sono note alcune interazioni che coinvolgono LRRK2 in una serie di processi cellulari come ad esempio il controllo ed il mantenimento della lunghezza dei neuriti attraverso la fosforilazione della proteina moesina [MacLeod et al., 2006; Parisiadou et al., 2009], la regolazione del traffico vescicolare tra assoni e dendriti [Sakaguchi-Nakashima et al., 2007], il controllo della trasduzione delle proteine mediato dall'interazione con il fattore 4E-BP1 [Imai et al., 2008], l'attivazione dell'apoptosi attraverso interazioni con proteine FADD e caspasi [Ho et al., 2009; Iaccarino et al., 2007]. La proteina moesina è un membro della famiglia ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) la cui funzione principale è quella di ancorare il citoscheletro di actina alla membrana plasmatica; moesina e radixina sono anche implicate nel controllo del prolungamento dei neuriti. L'iperespressione di LRRK2 mutata riduce la lunghezza del neurite e ne inibisce la ramificazione [MacLeod et al., 2006; Plowey et al., 2008; Ghandi et al., 2008]. Altri dati avvalorano l'ipotesi di un coinvolgimento della dardarina nella dinamica del citoscheletro, infatti Lrrk2 iperespressa in cellule HEK293 è stata co-immunoprecipitata con la tubulina endogena; in seguito è stato dimostrato che l'incremento di fosforilazione della tubulina da parte della forma mutata G2019S rispetto alla forma wt porterebbe ad anomalie a carico dei microtubuli che interferirebbero con la funzionalità neuronale [Gillardon, 2009]. Ancora, topi transgenici che iperesprimono Lrrk2 mostrano un'anomala frammentazione dell'apparato del Golgi (la cui integrità è coadiuvata dai microtubuli) che di per sé non provoca neurotossicità, ma destabilizza l'equilibrio tra reticolo endoplasmico (RE) e Golgi nel controllo del traffico vescicolare [Parisiadou and Cai, 2010]. L'integrità e la stabilità dei microtubuli sono requisiti essenziali per il mantenimento della

morfologia cellulare e per il trasporto di molecole ed organuli che nelle cellule neuronali interessa distanze notevoli rispetto ad altri tipi cellulari. Una caratteristica comune a diversi modelli murini di malattia di Parkinson è un abnorme livello di proteina tau fosforilata indotta dai mutanti G2019S e R1441G della dardarina. La proteina tau si lega alla tubulina e ne promuove l'assemblaggio nei microtubuli, quando viene fosforilata provoca invece la rottura dei microtubuli che si ripercuote danneggiandola sull'intera rete citoscheletrica [Li et al., 2009; Melrose et al., 2010; Yue and Lachenmayer, 2011]. Inoltre è stato dimostrato che la mutazione G2019S causa morte neuronale in cellule SH-SY5Y mediante un meccanismo apoptotico mitocondrio dipendente in cui l'attivazione della caspasi 3 è dipendente dalla proteina Apaf1 che insieme alla pro-caspasi 9 e al citocromo c partecipa alla formazione dell'apoptosoma [Iaccarino et al., 2007]. In questo lavoro è stata utilizzata una linea cellulare di largo impiego nello studio dell'apoptosi in modelli di malattie neurodegenerative che è la linea ETNA<sup>-/-</sup>, deficitaria della proteina Apaf1. In queste cellule trasfettate con LRRK2<sup>G2019S</sup> l'assenza di Apaf1 inibisce l'attivazione della caspasi 3 e la condensazione del nucleo mentre il citocromo c viene normalmente rilasciato dal mitocondrio. Questi risultati confermano il ruolo chiave del mitocondrio nei meccanismi di morte cellulare indotta dai mutanti della dardarina ed individuano nella proteina Apaf1 un fondamentale mediatore di tale processo. Nello stesso studio Iaccarino e collaboratori hanno evidenziato il ruolo dei domini LRR e WD40 nella azione tossica esplicata dai mutanti LRRK2: infatti cellule trasfettate con LRRK2<sup>ΔLRR</sup> e LRRK2<sup>ΔWD40</sup> non mostrano attivazione della caspasi 3 e conseguente morte cellulare via apoptosi.

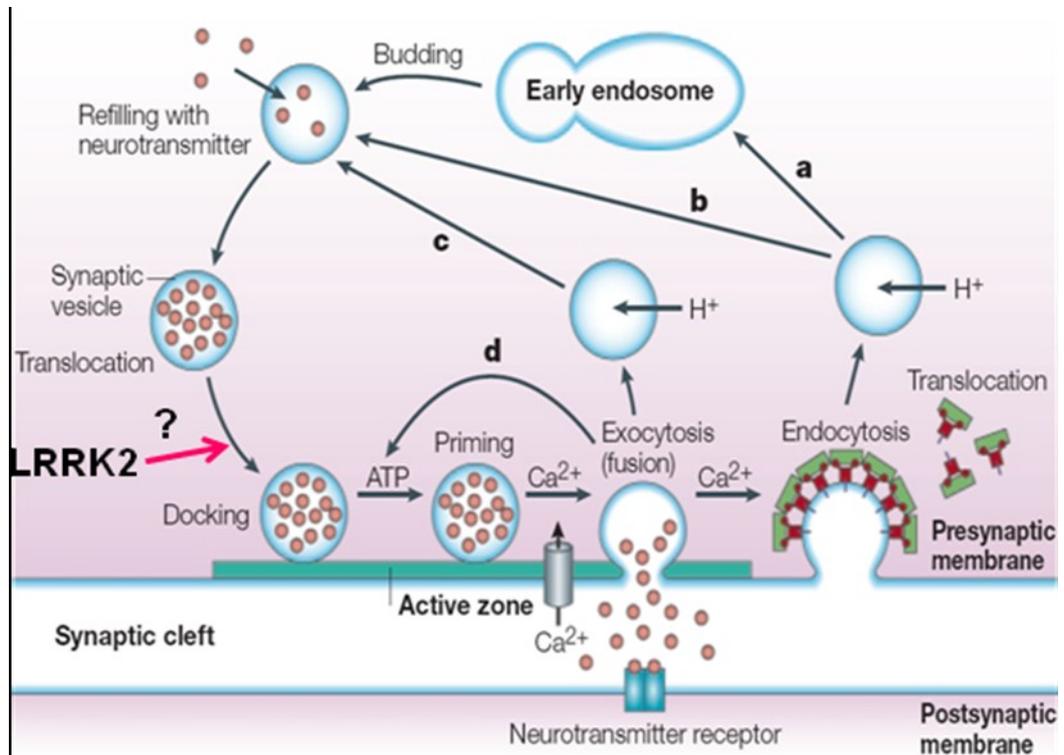
### **1.5.3 Ruolo di LRRK2 nella regolazione del traffico vescicolare**

Tra gli interattori di LRRK2 finora identificati grande interesse ha suscitato la proteina Rab5 che riveste un importante ruolo nella regolazione dell'endocitosi delle vescicole sinaptiche. In generale le proteine Rab sono delle GTPasi che si localizzano nei compartimenti vescicolari della cellula e funzionano da regolatrici del traffico di membrana. In particolare Rab5 svolge un ruolo chiave

nella regolazione del trasporto delle vescicole endocitiche dalla membrana plasmatica ai cosiddetti endosomi precoci [Carney et al., 2006]. Nei loro studi Shin e colleghi hanno scoperto questa interazione utilizzando lo screening dei due ibridi in lievito e la hanno successivamente confermata con saggi di GST pull down e co-immunoprecipitazione. Mediante analisi immunocitochimiche hanno inoltre osservato una loro parziale co-localizzazione nelle vescicole presinaptiche [Shin et al., 2008]. E' possibile che LRRK2 attraverso l'interazione con Rab5 possa modulare l'endocitosi delle vescicole sinaptiche? In una serie di esperimenti Shin e collaboratori hanno misurato la velocità di endocitosi ed esocitosi in cellule neuronali di ippocampo trasfettate con LRRK2 wt o mutata ed hanno osservato una diminuzione nell'endocitosi di vescicole sinaptiche e nessun effetto sull'esocitosi in seguito all'espressione di LRRK2. Tale effetto sull'endocitosi viene meno se insieme a LRRK2 viene trasfettata anche Rab5, cioè gli effetti dell'iperespressione della dardarina sono annullati dall'iperespressione di Rab5, ma non dal suo mutante Q79L che ha perso la capacità di idrolizzare il GTP [Shin et al., 2008].

Oltre alla proteina Rab5 sono state descritte tutta una serie di molecole presinaptiche che mostrano interazione con LRRK2: la proteina NSF, che catalizza il rilascio del complesso SNARE e dà inizio al ciclo endocitico; la subunità AP-2 del complesso della clatrina che costituisce uno dei principali meccanismi di riciclo delle vescicole dalla membrana verso il cosiddetto pool di riserva (Resting Pool, RP); la glicoproteina SV2A, che insieme a SV2B regola l'immagazzinamento e la movimentazione delle vescicole dal pool a facile rilascio (readily releasable pool); e la sinapsina coinvolta nell'immobilizzazione delle vescicole sinaptiche nel compartimento di riserva attraverso legami crociati tra vescicole e citoscheletro di actina [Piccoli et al., 2011]. L'analisi strutturale dei bottoni presinaptici condotta nello studio di Piccoli rivela che il silenziamento di LRRK2 influisce nella distribuzione spaziale delle vescicole in termini di distanza dalla membrana presinaptica, nello specifico è stata osservata una riduzione significativa nel numero di vescicole fisicamente in contatto (docking) con la membrana presinaptica (Figura 11). Nel complesso questi dati suggeriscono che LRRK2, in un contesto di proteine presinaptiche,

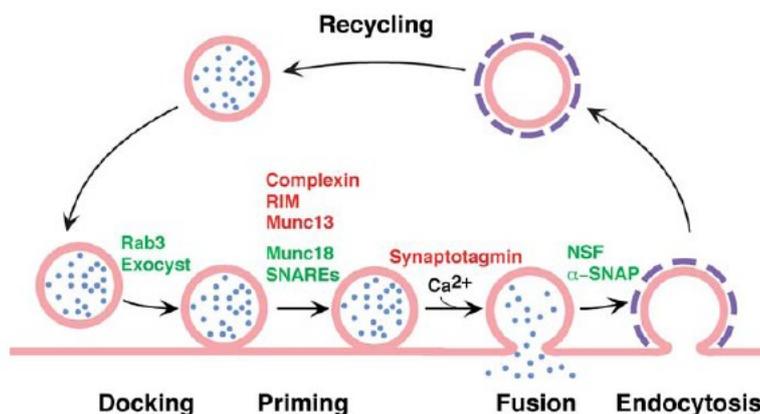
possa essere coinvolta nei processi sia di mantenimento e movimentazione delle vescicole nei pools di riciclo.



**Figura 11.** Rappresentazione dei meccanismi di endocitosi ed esocitosi in corrispondenza della membrana presinaptica. a) le vescicole fuse con la membrana vengono riciclate mediante un meccanismo di endocitosi mediato dalla clatrina verso un compartimento endosomiale; b) le vescicole ricoperte di clatrina possono subire anche un percorso di riciclo diretto senza passare per l'endosoma; c) in alternativa le vescicole possono ritirarsi rapidamente dalla membrana senza fondersi completamente e ricostituirsi; d) in questo caso le vescicole si riciclano immediatamente subito dopo la chiusura del poro di fusione [Gundelfinger et al., 2003].

Incoraggianti progressi nella comprensione del ruolo fisiologico e patologico della proteina LRRK2 nelle cellule neuronali sono stati possibili grazie anche allo sviluppo di modelli genetici animali, in particolare murini, della malattia di Parkinson. Diversi gruppi di studio hanno generato e caratterizzato topi transgenici che iperesprimono la proteina LRRK2 wt o la forma mutata G2019S. I risultati dei loro studi dimostrano che l'espressione della LRRK2<sup>G2019S</sup> induce una progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici della via nigrostriatale accompagnata da anomalie nelle funzioni mitocondriali e

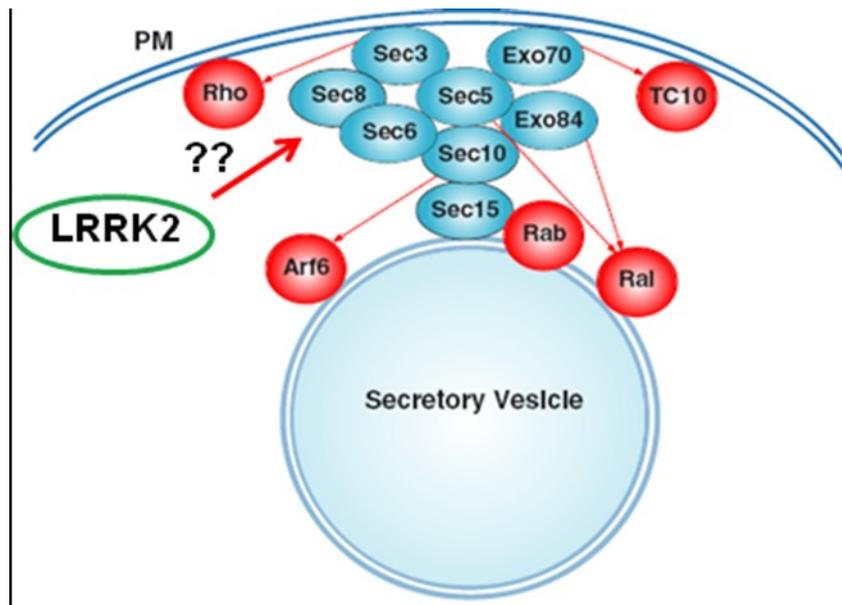
nei meccanismi autofagici nel cervello di topo [Ramonet et al., 2011]; inoltre sia la mutazione G2019S che quella R1441C inibiscono il rilascio della dopamina a livello striatale anche in assenza di neurodegenerazione [Li et al., 2010; Melrose et al., 2010; Dawson et al., 2010]. I livelli di dopamina extracellulare nello striato misurati da Melrose e collaboratori nei topi che iperesprimono LRRK2<sup>WT</sup> e LRRK2<sup>MUT</sup> sono tra loro paragonabili ma sensibilmente ridotti rispetto al controllo. Invece Li ha osservato una riduzione più sensibile nei livelli di dopamina striatale dei topi esponenti LRRK2<sup>MUT</sup> rispetto a quelli esponenti LRRK2<sup>WT</sup> in dipendenza con l'età dell'animale. Considerato che in questi modelli non sono evidenti anomalie nella sintesi, nell'immagazzinamento né nella cattura del neurotrasmettitore, è probabile che tali effetti siano legati ad alterazioni nel traffico delle vescicole sinaptiche e/o nell'esocitosi. I meccanismi che regolano l'esocitosi sono fondamentali per tutte le cellule secretorie, neuronali e non, che rilasciano nell'ambiente extracellulare molecole sotto l'induzione di uno stimolo. Il ciclo delle vescicole sinaptiche nella terminazione nervosa coinvolge diversi passaggi che vanno dal contatto con la membrana plasmatica nella cosiddetta "zona attiva" alla fusione con essa e al successivo riciclo mediato da un processo endocitico (Fig. 12).



**Figura 12.** Rappresentazione delle diverse fasi dell'esocitosi a livello sinaptico con indicate le proteine coinvolte nella regolazione del processo [Li and Chin, 2003]

Questi diversi passaggi richiedono la partecipazione di numerose proteine che interagiscono tra loro: il complesso SNARE, Munc18-1, NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor), CAPS1, synaptotagmine, RalA/RalB GTPasi e il complesso esocistico (Exocyst complex, EXOC) [Li and Chin, 2003; Sugita, 2008; Gundelfinger E.D. et al., 2003]. Il complesso esocistico consta di 8 proteine molto ben conservate in tutti gli eucarioti (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 e Exo84) che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell' ancoraggio (docking) delle vescicole con la membrana plasmatica durante l'esocitosi (Fig.13). Nelle cellule neuronali EXOC è essenziale per l'estensione del neurite e nella sinaptogenesi, processi che richiedono un continuo rimodellamento della membrana plasmatica, ma non sembra indispensabile nel rilascio di neurotrasmettitori [Liu and Guo, 2011]. In particolare è stato mostrato recentemente un importante ruolo della fosforilazione di sec8 nella localizzazione del complesso exocyst nel cono di crescita neurale. Chernyshova e colleghi hanno mostrato che Sec8 interagisce con le NCAM (neural cell adhesion molecules) favorendo la fosforilazione dipendente da FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) su residui di tirosina (non ancora identificati) di Sec8. Quest'ultima modificazione post-traduzionale su Sec8 è necessaria per la localizzazione del complesso exocyst nel cono di crescita delle cellule neuronali [Chernyshova et al., 2011].

Tra i risultati di questa tesi descriverò dettagliatamente più avanti una probabile interazione tra la proteina Sec8 e la proteina LRRK2 che emerge dai nostri esperimenti.



**Figura 13.** Il complesso esocistico comprende 8 proteine (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 e Exo84) che mantengono interazioni proteina-proteina tra loro e con una serie di molecole coinvolte nel meccanismo di esocitosi [Liu and Guo, 2011].

L'elucidazione dei meccanismi molecolari alla base degli effetti che l'espressione delle forme mutate di LRRK2 produce nei modelli sperimentali, potrebbe offrire spunti interessanti nello sviluppo di nuove strategie per la cura della malattia di Parkinson.

## SCOPO DELLA TESI

Le conoscenze sul ruolo fisiologico e patologico della proteina LRRK2 sono ancora piuttosto scarse. I differenti domini funzionali potrebbero essere coinvolti in svariate funzioni fisiologiche, biochimiche e cellulari. In particolare, il dominio chinasi potrebbe catalizzare la fosforilazione di molecole alla base dei meccanismi patogenetici della malattia di Parkinson; inoltre, i domini LRR e WD-40 coinvolti nelle interazioni proteina-proteina potrebbero rivestire un ruolo decisivo nella regolazione delle funzioni o localizzazione della proteina LRRK2 modulando anche le interazioni con i suoi substrati.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di individuare interattori molecolari di LRRK2 *in vitro*, mediante la tecnica del GST-pull down unita alla spettrometria di massa. A tal fine, sono stati costruiti dei vettori inducibili per l'espressione in cellule batteriche BL21 di proteine di fusione tra la glutatione-S-trasferasi (GST) e tre diversi domini funzionali di LRRK2 (LRR, WD-40 e chinasi). Le proteine di fusione purificate sono state quindi utilizzate per isolare possibili interattori molecolari in estratti proteici cellulari murini. L'identificazione, mediante spettrometria di massa, delle proteine con cui LRRK2 interagisce potranno contribuire alla delucidazione del ruolo fisiologico e patogenetico della proteina. Ruolo fisiopatologico che potrebbe anche essere correlato alla localizzazione cellulare della dardarina. La proteina LRRK2 infatti si localizza principalmente nel citoplasma ma circa il 10% è stato rinvenuto in associazione alla membrana esterna del mitocondrio. Inoltre immagini di microscopia elettronica evidenziano la presenza della dardarina anche nella matrice mitocondriale. Al fine di valutare la tossicità di LRRK2 correlata alla sua distribuzione nella cellula abbiamo costruito delle proteine di fusione inserendo, a monte della *dardarina*, un target di localizzazione mitocondriale che indirizzi la proteina nella matrice (MTX) o nello spazio intermembrana (IMS) del mitocondrio.

# MATERIALI E METODI

## 3.1 Materiali

### Ceppo batterico

Per amplificare i vettori plasmidici sono state utilizzate cellule di *Escherichia coli* del ceppo DH5 $\alpha$ . Le cellule batteriche sono difettive per la restrizione e portano mutazioni nel gene *recA1* e *relA1* per migliorare la stabilità e la qualità dei plasmidi ricombinanti. Per far esprimere le proteine ricombinanti sono state utilizzate cellule di *Escherichia coli* del ceppo BL21. Queste cellule sono difettive per la restrizione e la metilazione e portano una mutazione nel gene della proteasi VII per ridurre la proteolisi delle proteine espresse.

### Linee Cellulari

**HEK-293** La linea cellulare continua HEK293 (*human embryonic kidney*) deriva da rene embrionale umano ed è un buon modello per l'espressione di proteine eterologhe. Condizioni di crescita: Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% di siero fetale bovino, Penicillina/Streptomicina 1X, 37°C 5% CO<sub>2</sub>.

**SHSY5Y** Questa linea cellulare multipotente deriva da neuroblastoma infantile e può essere indotta a differenziarsi acquisendo un fenotipo neuronale. Condizioni di crescita: F12 Dulbecco's modified Eagle's medium addizionato con il 10% di siero fetale bovino, Penicillina/Streptomicina, 37° C 5% CO<sub>2</sub>.

### Vettori plasmidici

I seguenti vettori plasmidici sono stati utilizzati per clonare e/o esprimere i differenti cDNA

**pGEX-3X**: vettore di espressione pGEX-3X di circa 4900 bp, che consente di ottenere proteine di fusione con la glutatione S-transferasi batterica; contiene il gene per la resistenza all'ampicillina, l'origine di replicazione di pBR322, il promotore inducibile *tac*, l'operatore *lac* e il gene *lacI<sup>q</sup>* per il repressore dell'operone del lattosio.

**pCS2-MTK-LRRK2<sup>WT-1994-2019</sup>**: nel vettore d'espressione eucariotico pCS2-MTK di 4050 bp è stata clonata nei siti *Bam*HI e *Xho*I la sequenza completa codificante per LRRK2 (7584 bp), in forma WT e mutata. Il vettore conferisce il gene per la resistenza all'ampicillina.

**pCMV/myc/mito** e **pCR/CMV/IMS**: questi vettori contengono a valle del promotore le sequenze target per la localizzazione rispettivamente nella matrice e nello spazio intermembrana del mitocondrio. Sono stati utilizzati per amplificare tali target e clonarli successivamente nei vettori pCS2-MTK-LRRK2<sup>WT/2019/1994</sup>.

**pCMV10**: vettore di espressione eucariotico di circa 6300 bp utilizzato per clonare il cDNA della proteina hSec8. A monte del sito multiplo di clonaggio contiene la sequenza del tag 3XFLAG; conferisce il gene per la resistenza all'ampicillina.

## Oligonucleotidi

1. Oligonucleotidi per clonare le sequenze target per la localizzazione nel mitocondrio nei vettori pCS2-MTK-LRRK2<sup>WT/2019/1994</sup>:

NOME	SEQUENZA
MTX senso	5' AAAAGGATCCACCATGTCCGTCCTGACG 3'
MTX antisenso	5' AAAGGATCCCAACGAATGGATCTTGGCG 3'
IMS senso	5' AAAGGATCCACCATGGCGGCGGCGGCGGCT 3'
IMS antisenso	5' AAAAGGATCCACTCACGGCAGAATGAAGG 3'

2. Oligonucleotidi utilizzati per amplificare il cDNA della proteina hSec8 contenenti il sito di restrizione dell'enzima Hind III:

NOME	SEQUENZA
3XFLAGhSec8 senso	5'ACATA <u>AAGCTT</u> GCGGCAGAAGCAGCTGGT 3'
3XLAGhSec8 antisenso	5' ACATA <u>AAGCTT</u> CTTAAACGGTAGTTATCTTCTTG 3'

3. Oligonucleotidi per creare dei mutanti di delezione della proteina hSec8

NOME	SEQUENZA
$\Delta$ 1hSec8 senso	5'GGCAGAAGCAGCTTACATCAAATCGACT 3'
$\Delta$ 1hSec8 antisenso	5' AGTCGATTTGATGTAAGCTGCTTCTGCC 3'
$\Delta$ 2hSec8 senso	5' ACATCAAATCGACTCCAAGATGTTCTACA 3'
$\Delta$ 2hSec8 antisenso	5' TGTAGAACATCTTGAGTCGATTTGATGT 3'
$\Delta$ 3hSec8 senso	5' CCAAGATGTTCTACCTCTCCTACAGAG 3'
$\Delta$ 3hSec8 antisenso	5' CTCTGTAGGAGAGGTAGAACATCTTGG 3'
$\Delta$ 4hSec8 senso	5' CTCTCCTACAGAGCTGCTTGCTTGTCTT 3'
$\Delta$ 4hSec8 antisenso	5' AAGACAAGCAAGCAGCTCCTGTAGGAGAG 3'
$\Delta$ 5hSec8 senso	5' CTTGCTTGTCTTAAAGAAGATAACTAC 3'
$\Delta$ 5hSec8 antisenso	5' GTAGTTATCTTCTTTAAGACAAGCAAG 3'

## **Soluzioni per l'estrazione su scala ridotta di DNA plasmidico (“mini-prep”)**

### Soluzione 1:

Glucosio 50 mM, Tris-HCl (pH 8) 25mM, EDTA 10 mM

### Soluzione 2:

NaOH 0.2 M, SDS 1%

### Soluzione 3:

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> acetato

### TE:

Tris (pH 8) 10 mM, EDTA (pH 8.0) 1mM

## **Soluzioni per l'elettroforesi in gel d'agarosio**

### Tampone TAE 1X:

Tris HCl (pH 8) 40 mM, EDTA 1 mM, acido acetico 20 mM

### Gel d'agarosio 1%:

Sciogliere 1.2 g di agarosio in 120 ml di TAE 1X, aggiungere Bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0.04 µg/ml

### Tampone di caricamento 6X (Loading Dye)

Glicerolo 30%, Blu di bromo fenolo 0.4%

### Marcatore di peso molecolare

DNA1Kb Ladder (Invitrogen)

## **Soluzioni per elettroforesi su gel di acrilammide (SDS-PAGE)**

### Gel di poliacrilammide 10% (Lower gel) (10 ml)

30% Acrilammide-0,8% Bisacrilammide	3,325 ml
Lower buffer (4X)	2,5 ml
APS 10%	30 µl
TEMED	30 µl

Gel di poliacrilammide 4% (Upper gel) (5 ml)

30% Acrilammide-0,8% Bisacrilammide	500 µl
Upper buffer (4X)	1,25 ml
APS 10%	30 µl
TEMED	30 µl

Lower buffer (4X)

Tris – HCl (pH 8.8) 1.5 M, SDS 0.4%

Upper buffer (4X)

Tris – HCl (pH 6.8) 0.5M, SDS 0.4%

Running buffer (1X)

Glicina 200 mM, Tris-HCl pH 7.8 25 mM, SDS 0.1%

Laemli buffer

Tris-HCl (pH 6.8) 50 mM, SDS 1%, Glicerolo 10%, β-mercaptoetanol 1%, Blu di bromo fenolo 0.004%

Transfer buffer (1X)

Tris-HCl (pH 7.8) 25 mM, Glicina 192 mM, Metanolo 20%

Staining solution:

Coomassie 0.2%, acido acetico 7,5%, metanolo 40%

Destaining solution:

Etanolo assoluto 10%, acido acetico 10%

**Soluzioni per l'estrazione delle proteine batteriche**

buffer I: Tris-HCl [pH 8.0] 50mM, EDTA 1mM, NaCl 150 mM, PMSF 1mM, inibitori di proteasi 1X, lisozima 200 µg/ml

buffer II: Tris-HCl [pH 8.0] 50mM, EDTA 1mM, NaCl 500 mM, Triton 1%, PMSF 1mM, inibitori di protease 1X, DTT 1 mM

## 3.2 Metodi

### PCR

Per amplificare la sequenza codificante per la proteina hSec8 a partire da cDNA di linfociti umani disponibile in laboratorio, è stata allestita la seguente reazione di amplificazione:

cDNA	2 $\mu$ l
Pfu Buffer 10X	2 $\mu$ l
dNTPs 2mM	2 $\mu$ l
Oligo senso	1 $\mu$ l
Oligo antisenso	1 $\mu$ l
Pfu 5U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	fino a 20 $\mu$ l

Il protocollo di amplificazione prevede 30 cicli così organizzati:

Denaturazione: 94°C per 30''

Appaiamento: 55°C per 30''

Estensione: 72°C per 30''

### Purificazione di DNA da gel

Il DNA d'interesse viene separato su gel d'agarosio e poi purificato utilizzando il kit Promega "*Wizard SV Gel and PCR clean-Up System*". Il protocollo prevede l'uso di colonnine cromatografiche commercializzate insieme con le soluzioni per il loro uso: si ritaglia dal gel un tassello contenente la banda d'interesse, la si trasferisce in un eppendorf e se ne stima il peso; per ogni 100 mg di gel

d'agarosio aggiungere 100 µl di *Membrane Binding Solution* e incubare a 50°C per 10', agitando su vortex per facilitare lo scioglimento del gel. Si trasferisce il campione nella colonnina e si centrifuga 1' a 13000 rpm quindi si allontana l'eluato e si lava la colonna con 700 µl di *Wash Solution*. A questo punto si centrifuga 1' a 13000 rpm, si ripete il lavaggio con 500 µl di *Wash solution* e centrifuga altri 5' a 13000 rpm. Si Trasferisce la colonna in eppendorf e si aggiungono 50 µl di *Nuclease Free Water*, si lascia incubare per 1' a temperatura ambiente dopodiché si centrifuga per 1 minuto a 13000 rpm.

### **Reazione di ligasi**

Ogni reazione di ligasi è stata allestita come segue: in un volume finale di 15 µl, 40-80 ng di plasmide linearizzato e quantità variabili di inserto sono state incubate in presenza di 1 unità di T4 DNA ligasi (Promega) in presenza di un tampone opportuno (Ligase 10X Buffer, Promega). Questo enzima catalizza la formazione di legami fosfodiesterici tra 3'OH e 5'P adiacenti, utilizzando Mg<sup>2+</sup> e ATP come cofattori. Per ciascun clonaggio è stato valutato di volta in volta il rapporto vettore/inserto in grado di spostare efficacemente la reazione verso la saldatura tra DNA lineare e DNA plasmidico; una miscela di reazione priva dell'inserto è stata inoltre utilizzata come controllo per valutare la capacità del vettore di richiudersi su se stesso. Dopo un'incubazione O/N a 16°C, 5 µl della reazione sono stati utilizzati per trasformare cellule E. coli DH5α.

### **Trasformazione batterica**

Ad un'aliquota di 80 µl di cellule competenti sono stati aggiunti 5 µl di una reazione di ligasi. Dopo un'incubazione in ghiaccio per 30 minuti, le cellule sono state prima sottoposte a shock termico a 37°C per 3 minuti, poi incubate a temperatura ambiente per 10 minuti. In seguito all'aggiunta di 500 µl di LB, le cellule sono state incubate a 37°C per 50 minuti, centrifugate per pochi secondi in modo da far pellettare le cellule e, dopo aver eliminato i 500 ml di LB, e aver risospeso accuratamente il pellet, sono seminate su terreno solido selettivo (LB con agar e antibiotico appropriato) e incubate O/N a 37°C.

### **Estrazione di DNA plasmidico su piccola scala (miniprep)**

Una singola colonia batterica viene inoculata in un tubo batteriologico da 13 ml contenente 2 ml di brodo di coltura LB con 50 µg/ml dell'antibiotico appropriato. Dopo un'incubazione in agitazione a 37°C O/N, la coltura batterica è centrifugata a 5000 rpm per 5 minuti. Il pellet ottenuto viene risospeso in 200 µl di "Soluzione 1" e a questi sono aggiunti 200 µl di "Soluzione 2" La miscela viene delicatamente agitata e lasciata a temperatura ambiente per 5 minuti. Infine si aggiungono 200 µl di "Soluzione 3" e dopo aver miscelato per inversione si lascia incubare in ghiaccio per 10 minuti. Il supernatante recuperato dopo centrifugazione a 12000 rpm per 15 minuti è stato sottoposto ad estrazione con 2 volumi di EtOH assoluto e successiva centrifugazione per 10 minuti a 12000 rpm. Dopo un lavaggio in 80% EtOH, il campione è stato nuovamente centrifugato, il pellet di DNA risospeso in Buffer TE con RNase A (20µg/ml) e incubato per 15 minuti a 37°C.

Nel caso in cui sia necessaria una particolare purezza del DNA estratto, l'estrazione del DNA plasmidico viene effettuata utilizzando il kit per "*Miniprep*" *Wizard® plus SV Minipreps* (Invitrogen) secondo il seguente protocollo: si aliquotano in eppendorf 3 ml dell'inoculo di cellule batteriche contenenti il plasmide. Si centrifuga per 5 minuti a 5000 rpm e si risospende il pellet in 250 µl di Resuspension solution. Successivamente si aggiungono alla sospensione 200 µl di Lysis solution (reazione di lisi alcalina), si mescola delicatamente per inversione e si aggiungono 10 µl di Alkaline protease. Trascorsi non più di 5 minuti a temperatura ambiente si aggiungono 350 µl di Neutralization solution e, dopo aver mescolato per inversione, si centrifuga per 10 minuti a 13000 rpm. A questo punto si procede all'estrazione del DNA plasmidico, si inserisce la colonnina nel tubo e si fa decantare il supernatante nella colonnina, centrifugare per 1 minuto a 13000 rpm. Si butta l'eluato, si reinserisce la colonnina nel tubo, si aggiungono 750 µl di Wash solution, si centrifuga per 1 minuto a 13000 rpm, si butta l'eluato e si reinserisce la colonnina nel tubo. Si effettua un secondo lavaggio con 250 µl di Wash solution e si centrifuga per 2 minuti a 13000 rpm. Si trasferisce la colonnina in un tubo eppendorf sterile e si aggiungono 100 µl di H<sub>2</sub>O mQ. Centrifugare per 1 minuto a 13000 rpm. Buttare la colonnina e conservare il DNA estratto a -20°C .

## **Digestione del DNA con enzimi di restrizione**

Sono stati utilizzati differenti enzimi di restrizione per effettuare digestioni diagnostiche e linearizzare plasmidi per il clonaggio molecolare. Ogni reazione di digestione è stata realizzata di norma in un volume finale di 15-30 µl con 3 U di enzima per ogni microgrammo di DNA plasmidico. La reazione è effettuata per 1 ora a 37°C. Per verificare la completezza della reazione, i prodotti della digestione sono stati separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio 1% colorato con EtBr e confrontati con campioni di controllo, ossia plasmidi non digeriti, e con marcatori di peso molecolare per analizzare le dimensioni delle bande ottenute.

## **Elettroforesi su gel di agarosio**

La corsa elettroforetica in gel d'agarosio si utilizza per verificare la completezza di una digestione, per valutare la purezza del DNA estratto e per stimare la concentrazione e la dimensione del DNA nelle varie preparazioni.

Il gel si prepara sciogliendo l'agarosio in TAE 1X (Tris acetato 40 mM, EDTA 1mM), portato alla temperatura di ebollizione; prima che il gel solidifichi si aggiungono 4µl di bromuro d'etidio (10mg/ml) per ogni 100 ml di gel. Una volta sciolto, si lascia brevemente raffreddare il gel che viene quindi colato in un lettino da elettroforesi di un apparato orizzontale. Quando solidificato si pone il gel di agarosio nell'apparato di corsa immerso nel tampone di corsa TAE 1X a pH 8. Si diluiscono campioni da analizzare in acqua e soluzione di caricamento. Quest'ultimo appesantisce il campione facendolo andare sul fondo del pozzetto e consente al contempo di seguire la corsa elettroforetica. Si caricano i campioni su gel e si applica una differenza di potenziale di 80-90 V per un tempo variabile di 15-30 minuti; si visualizzano infine le bande degli acidi nucleici ponendo il gel sotto raggi UV: il bromuro di etidio che si è intercalato tra le basi appare, in queste condizioni, fluorescente. Le dimensioni dei frammenti sono stimate in presenza di marcatori di peso molecolare.

## **Trasfezione con Lipofectamina (Invitrogen)**

Il protocollo per la trasfezione usato si basa sull'utilizzo di liposomi commerciali (Invitrogen). Si utilizzano 0,4 µg di DNA per ogni pozzetto in Multi-well da 24: il DNA viene diluito con 25 µl di Optimen per reazione.

Si aggiungono in ogni tubo 1,25 µl di Plus reagent, si agita delicatamente e si incuba a temperatura ambiente (*room temperature*, RT) per 15 minuti.

Nel frattempo si prepara una mix composta da 1 µl di lipofectamine reagent in 25 µl di optimem per ogni pozzetto da trasfettare.

Passati i 15 minuti si aggiungono 25 µl di mix in ogni tubo e si incuba per 15 minuti a RT. Nel mentre si sostituisce il terreno delle cellule, piastrate precedentemente in multiwell, con 0,35 ml di Optimum quindi si trasferisce il DNA coi liposomi di ogni tubo nel corrispondente pozzetto e si incuba a 37C° con CO<sub>2</sub> al 5% per tre ore.

Trascorse le tre ore si sostituisce il mezzo con terreno fresco contenente siero e si lascia in incubazione a 37C° con CO<sub>2</sub> al 5% per un tempo variabile a seconda del tipo di esperimento.

## **Purificazione di mitocondri**

La purificazione dei mitocondri è stata effettuata ponendo a confronto due protocolli al fine di valutarne l'efficienza. Il primo protocollo si basa sulla centrifugazione in gradiente di densità che prevede la stratificazione del campione su gradiente di saccarosio e successiva ultracentrifugazione. È stata utilizzata un'ultracentrifuga Beckman L7-55 con rotore SWI 40, dotata di una camera sottovuoto, refrigerata e blindata. Il secondo protocollo non prevede l'utilizzo dell'ultracentrifuga, poiché l'estrazione dei mitocondri avviene mediante semplice centrifugazione.

### *Protocollo ultracentrifugazione:*

dopo 48 ore dalla trasfezione, laviamo e raccogliamo le cellule in PBS-EDTA 1mM; centrifugare a 900 rpm per 5 minuti a 4°C. Allontanare il soprannatante e risospendere il pellet in 1 ml di Mitochondrial Buffer (MB): omogeneizzare in

potter con 25-30 colpi in ghiaccio. Centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm e trasferire il soprannatante contenente citoplasma e organuli. Centrifugare a 13000 rpm per 10 minuti. Risospendere il pellet ottenuto in 250 µl di MB e stratificare su gradiente di saccarosio. Per stratificare il gradiente si utilizzano dei tubi da centrifuga Beckman Ultra-Clean 14-89 mm, all'interno dei quali vengono versati in sequenza: 4,7 ml di saccarosio 1,6 M e 5,8 ml di saccarosio 1,2 M. Dopo aver stratificato il pellet si centrifuga a 27600 rpm (25000g) per 2 h a 4°C. Al termine dell'ultracentrifugazione si recupera l'anello di gradiente per trasferirlo in provette contenenti MB e PMSF 1mM.

Si prosegue centrifugando a 4 °C a 13000 rpm per 10 minuti e il pellet formatosi viene risospeso con 50 µl di Ripa buffer in attesa di effettuare il dosaggio proteico.

Protocollo rapido: questo in confronto al primo risulta essere più veloce e meno articolato in quanto esclude l'utilizzo dell'ultracentrifuga. Si lavano le cellule trasfettate 2 volte con 5 ml di MB, si raccolgono in 1 ml di MB staccandole con lo scraper e si trasferiscono in eppendorf freddo. Lavare come prima e risospendere il pellet in 500 µl di 3,5 mM Tris-HCl pH 7.8, 2 mM NaCl, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>; omogeneizzare in potter con 10-15 colpi usando il pestello manualmente. Aggiungere 1/9 di volume di 3,5 mM Tris-HCl pH 7.8, 2 mM NaCl, 0.5mM MgCl<sub>2</sub> e centrifugare a 2000 rpm per 3 minuti a 4°C; trasferire il soprannatante e centrifugare di nuovo nelle medesime condizioni. Trasferire il soprannatante in nuovo tubo e centrifugare a 13000 g per 2 minuti; infine lavare il pellet con 35 mM di Tris-HCl pH7.8

Peeling mitocondriale: i mitocondri vengono purificati seguendo tutte le fasi su descritte, viene soltanto introdotta una blanda digestione con tripsina prima dell'omogeneizzazione aggiungendo 400 µl di tripsina 0,5% e incubando per 10 minuti a 37°C. Quindi si prosegue come sopra.

### **Co-immunoprecipitazione**

L'immunoprecipitazione permette di separare una proteina d'interesse grazie all'affinità di un anticorpo per la stessa e per il legame di una resina alla

porzione Fc dell'anticorpo (nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato anti-myc e anti-flag). Per resina si intende la proteina A (o la proteina G) coniugata al sefarosio. L'utilizzo dell'una o dell'altra proteina o di una miscela delle due è in funzione della classe e della sottoclasse di anticorpo impiegato nell'immunoprecipitazione. Dopo 48 h dalla trasfezione le cellule (SH-SY5Y o HEK293) vengono lisate con un Buffer di lisi (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40) in presenza di PMSF (fluoruro di fenilmetansulfonile, 250 mM) e di Protease inhibitor cocktail (Sigma, 1ml/100ml di lisato cellulare), segue l'incubazione O/N a 4°C di 1 mg di estratto proteico con 1 µl di anticorpo. Il giorno seguente si aggiungono ai campioni 20 µl di soluzione 1:1 di resina opportunamente equilibrata in PBS 1X e si lasciano in incubazione a 4°C in agitazione per 2 ore. Centrifugare a 2000 rpm per 3 minuti a 4°C, eseguire 3 lavaggi aggiungendo ogni volta al pellet della resina 1ml di Buffer di lisi e centrifugando a 2000 rpm per 3 minuti a 4°C. Dopo l'ultima centrifugata allontanare il soprannatante e aggiungere alla resina 20 µl di Laemmli Buffer 2X senza β-mercaptoetanolo, bollire i campioni a 95°C per 5 minuti prima di sottoporli all' SDS-PAGE.

### **Induzione dell'espressione delle proteine ricombinanti**

Per indurre l'espressione di proteine ricombinanti in cellule BL21, precedentemente trasformate con vettori di espressione contenenti le sequenze codificanti per le proteine di fusione, si procede nel seguente modo:

Trasferire in una beuta 1 ml dell'inoculo, cresciuto tutta la notte, di cellule batteriche BL21 contenenti il plasmide ed incubare a 37°C in agitazione finché la coltura abbia raggiunto una densità ottica a 600nm pari a 0.4 OD; a questo punto preleviamo 1 ml di coltura da ciascun campione come controllo prima dell'induzione e aggiungiamo alla coltura IPTG 0.5 mM. Lasciamo crescere per 2 ore a 30° in agitazione. Da ciascun campione preleviamo 1 ml come controllo dell'induzione. Trasferiamo la coltura in tubi Falcon da 50 ml preraffreddati e centrifughiamo a 3500 rpm per 15 minuti a 4°C, eliminiamo il soprannatante. Laviamo il pellet di cellule batteriche con 25 ml di PBS 1X. Questo pellet può essere congelato a -20° o processato immediatamente per l'estrazione delle

proteine tramite lisi batterica. I controlli prelevati prima ( $T_0$ ) e dopo l'induzione sono stati centrifugati a 8000 rpm per 5 minuti, eliminato il soprannatante, e il pellet risospeso in 100 $\mu$ l di Laemli 1X. Dopo averli bolliti per 5' a 95°C i campioni possono essere separati in SDS-PAGE.

### **Estrazione delle proteine tramite lisi batterica**

Per estrarre le proteine batteriche si è proceduto secondo il protocollo seguente: si lisa il pellet batterico (ottenuto da 200 ml di coltura) in 10 ml di *buffer I* e si lascia per 30 minuti in ghiaccio. Si eseguono tre cicli di sonicazione: 10" a 100W e 1' in ghiaccio. Centrifugare a 8000 rpm per 20 minuti a 4°C. Trasferire il soprannatante (SN1) in un tubo da 15 ml, prelevarne 40  $\mu$ l in tubo eppendorf con 10  $\mu$ l di Laemli 5X e congelare il resto a -20°C. Risospendiamo il pellet in 6 ml di *buffer II* ed incubiamo in ghiaccio per 10 minuti. Centrifugare a 8000 rpm per 20 minuti a 4°C e trasferire il soprannatante (SN2) in un tubo da 15 ml, prelevarne 40  $\mu$ l con 10  $\mu$ l di Laemli 5X e congelare il resto ( in attesa del controllo su gel dei campioni estratti, SN1 e SN2 prima di procedere poi con la purificazione). Risospendere il pellet (P) in 300 $\mu$ l di Laemli 1X. Denaturare i campioni ottenuti (SN1, SN2 e P) a 95°C per 5 minuti e caricarli su gel di poliacrilammide in SDS-PAGE.

### **Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE)**

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE) permette di separare le proteine, denaturate e ridotte, in base al loro peso molecolare. Gli estratti proteici vengono caricati su gel discontinuo utilizzando un running gel ad una percentuale relativa alla proteina da rilevare ed uno stacking gel al 4% di acrilammide/bisacrilammide (37.5:1). L'elettroforesi è condotta in tampone di corsa Running 1X applicando una corrente di 80 V per lo stacking e di 120 V per il running gel. A seconda del tipo di esperimento a questo punto il gel può essere colorato oppure le proteine separate vengono trasferite su nitrocellulosa per analisi di Western Blotting.

## **Colorazione del gel con Blue Coomassie**

Per la colorazione con Blue di Coomassie si immerge il gel in una soluzione colorante (*Staining solution*) per circa 30', dopodiché si decolora con la *Destainig solution* per un tempo variabile tra 2h a O/N, avendo cura di sostituire la *Destaining solution* periodicamente.

## **Western Blotting**

Tale tecnica permette di identificare e fornire una stima semiquantitativa delle proteine che sono state separate per elettroforesi e trasferite su membrana di nitrocellulosa. Al termine della corsa elettroforetica i gel vengono lavati per qualche secondo nel tampone di trasferimento, messi a contatto con una membrana di nitrocellulosa ed infine sottoposti ad elettroblot in tampone di trasferimento a 4°C per 2 ore a 180 mA, in apposito apparato (Biorad). Le proteine trasferite sulla membrana sono evidenziate con il colorante Rosso Ponceau S (0.5% Rosso Ponceau S in 1% acido acetico) per assicurarsi che il trasferimento delle proteine sia avvenuto correttamente. La membrana è quindi lavata in abbondante PBS 1X/Tween20 0.05% per eliminare l'eccesso di colorante ed incubata in Blocking solution (PBS 1X/Tween 0.05%/3% latte) per 1 ora, allo scopo di bloccare i siti di legame per le proteine sul filtro con una sostanza inerte nei confronti dell'anticorpo. Successivamente il filtro è immerso O/N, in agitazione, in Blocking solution contenente l'anticorpo primario. Il giorno seguente le membrane vengono lavate in PBS 1X/Tween20 0.05% per 4 volte e quindi incubate per 1 ora con anticorpi secondari anti-specie coniugati a perossidasi di rafano (HRP) diluiti in Blocking solution. Dopo essere state lavate per ulteriori 3 volte in PBS 1X/Tween20 0.05%, le membrane vengono infine visualizzate con il metodo della chemiluminescenza (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham). L'enzima HRP infatti converte, in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un substrato non chemiluminescente in un prodotto finale chemiluminescente in grado di impressionare una lastra fotografica esposta per un tempo opportuno.

## **Purificazione delle proteine di fusione**

La purificazione delle proteine di fusione contenenti il dominio Glutathione-S-transferasico batterico è stata condotta tramite l'utilizzo della resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow della ditta Amersham e portata a termine per eluizione acida.

Aliquotare, dopo averla scongelata lentamente, la frazione contenente la proteina di fusione in tubi eppendorf (1 ml/tubo); lavare tre volte la resina con buffer II centrifugando a 2000 rpm per 3 minuti, infine risospenderla in buffer II secondo un rapporto in volume 1:1. Aggiungere 30 µl di resina 1:1 per ml di soluzione contenente la proteina di fusione e incubare 2 ore in agitazione r.t. Centrifugare a 2000 rpm per 2 minuti, lavare 4 volte con 1 ml di buffer II ad ogni lavaggio.

## **Tecniche di immunofluorescenza**

L'immunofluorescenza utilizza anticorpi coniugati a traccianti fluorescenti in grado di legarsi a strutture cellulari in modo specifico, conservando la valutazione quantitativa e qualitativa delle strutture bersaglio. Le cellule vengono seminate in piastra da 24 pozzetti provvisti di vetrino e trasfettate con i costrutti di interesse. Dopo 24-48 h si fissano le cellule con paraformaldeide al 4% in PBS 1X per 15', ed in seguito si lavano una volta con PBS. La tecnica di fissaggio con paraformaldeide prevede una successiva permeabilizzazione delle cellule con Triton X-100 all'1% in PBS per 10'. Al termine si lava il monostrato prima con PBS 1X, poi con PBS 1X-Tween20 0,05% (PBS-Tween). Una volta fissate e permeabilizzate, si lasciano per 1 h in PBS-Tween+ 5% BSA al fine di saturare i legami e impedire la formazione di reazioni aspecifiche tra antigene e anticorpo.

Si diluisce l'anticorpo primario in PBS-Tween + 3% BSA e si incuba la piastra in termostato ON a 4°C in blanda agitazione. Per evidenziare il legame tra l'anticorpo monoclonale primario e la proteina ricercata si utilizza un anticorpo secondario polivalente, anti-specie, coniugato con un fluorocromo; al termine dell'incubazione con il primo anticorpo le cellule vengono lavate con

PBS/Tween 4 volte e poi incubate per 1 h con l'anticorpo secondario opportunamente diluito in PBS/Tween/3%BSA. Al termine dell'incubazione si eseguono 4 lavaggi da 5 minuti ciascuno come sopra e si tratta ciascun campione per 1' con una soluzione DAPI (diammino-phenil-indolo) 0,1 µg/ml in PBS 1X. Il DAPI ha la capacità di intercalarsi nel DNA permettendo così l'osservazione dei nuclei cellulari.

Infine, si estraggono i vetrini dai pozzetti e si montano su portaoggetto mediante una soluzione di montaggio; quindi si osservano al microscopio confocale in fluorescenza.

### **Saggio chinasiatico *in vitro***

Le proteine utilizzate come enzima (LRRK2<sup>WT/mut</sup>) per allestire il saggio chinasiatico *in vitro* vengono espresse in cellule HEK 293 e purificate mediante immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-myc. Il substrato, la proteina Sec8 viene espressa in cellule batteriche BL21 come proteina di fusione e purificata con la resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow . Il saggio utilizza come donatore di gruppi fosfato la molecola  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  . La miscela di reazione viene allestita secondo il seguente protocollo in un volume finale di 30 µl.

<b>STOCK</b>	<b>6 reazioni</b>	<b>[conc]</b>
Kinase buffer 5X	6 µl	1X
DTT 100mM	1,8 µl	1mM
NaF (250X)	0,9 µl	1X
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (250X)	0,9 µl	1X

Inib. Prot. 1000X	0,3 $\mu$ l	2,5X
$\beta$ -glicerofosfato 1,25M	3,6 $\mu$ l	25 mM
2,5mM ATP	3,6 $\mu$ l	50 $\mu$ m
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP	4,2 $\mu$ l	
Substrato Sec8 IP 10 $\mu$ l	60 $\mu$ l	0,5 mg/ml

La miscela di reazione si lascia incubare a 37°C per 20 minuti, dopodiché si aggiungono 30  $\mu$ l di Laemli 2X per bloccare la reazione . I campioni vengono denaturati per 5 minuti a 95°C. Le prteine separate mediante standard SDS-PAGE vengono colorate con Blu Coomassie e analizzate mediante autoradiografia.

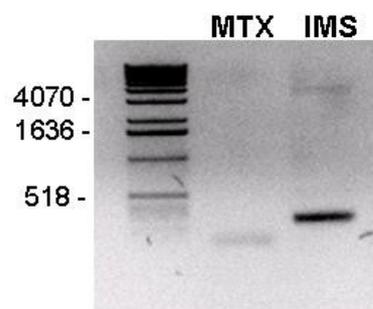
# RISULTATI

## 4. Effetto della localizzazione cellulare di LRRK2 sulla tossicità cellulare

### 4.1 Costruzioni di vettori d'espressione per la localizzazione di LRRK2 nella matrice (MTX) e nello spazio intermembrana (IMS) del mitocondrio.

Come illustrato nell'Introduzione la dardarina si localizza principalmente nel citoplasma anche se e' stata rinvenuta in associazione alla membrana esterna del mitocondrio. Inoltre immagini di microscopia elettronica evidenziano la presenza della dardarina anche nella matrice mitocondriale. Al fine di valutare la tossicità di LRRK2 correlata alla sua localizzazione cellulare abbiamo costruito delle proteine di fusione inserendo, a monte della *dardarina*, un target di localizzazione mitocondriale che indirizzi la proteina nella matrice (MTX) o nello spazio intermembrana (IMS) del mitocondrio.

Per la localizzazione nello spazio intermembrana o nella matrice del mitocondrio abbiamo utilizzato una regione corrispondente rispettivamente all'estremità' amminoternimale del citocromo-c o della citocromo ossidasi (Cox II). I frammenti in questione sono stati amplificati dai plasmidi pCMV/myc/mito e pCR/CMV/IMS, utilizzando dei primers nei quali era stato inserito un sito di restrizione per l'enzima *Bam* HI. L'amplificato, il cui prodotto è mostrato in figura14, è stato purificato e digerito con *Bam* HI.



**Figura 14.** Elettroforesi su gel di agarosio degli amplificati relativi ai target di localizzazione mitocondriale.

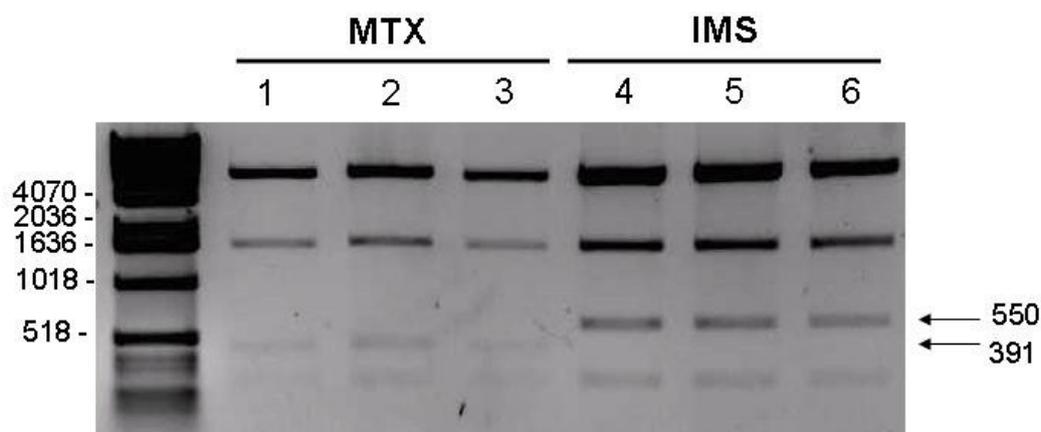
Contemporaneamente abbiamo digerito con il medesimo enzima di restrizione anche pCS2-MTK-LRRK2 WT, 2019 e 1994.

A questo punto abbiamo allestito un'opportuna reazione di ligasi fra i due prodotti di digestione. I prodotti di ligasi sono quindi stati trasformati in cellule batteriche competenti selezionate su terreno contenente l'antibiotico ampicillina. Abbiamo cresciuto singolarmente alcune colonie e ne abbiamo estratto il DNA plasmidico, quindi abbiamo digerito i DNA plasmidici ottenuti con l'enzima di restrizione *Hind*III che ci permette di discriminare, secondo le modalità mostrate in tabella 3, fra i costrutti che hanno inserito MTX, IMS e quelli i cui plasmidi si sono richiusi su se stessi.

IMS	5xMYC	MTX
5218	5218	5218
4689	4689	4689
1607	1607	1607
291	291	291
<b>550</b>	<b>254</b>	<b>391</b>

**Tabella 3.** Possibili bande ottenibili dalla digestione dei costrutti con *Hind*III.

I risultati sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio, i campioni 1,2,3 hanno inserito il target di localizzazione nella matrice del mitocondrio mentre i campioni 4,5,6 quello per la localizzazione nello spazio intermembrana.



**Figura 15.** Elettroforesi su gel di agarosio dei costrutti pCS2-MTK-LRRK2<sup>WT/1994/2019</sup> che hanno inserito il target MTX (1,2,3) e IMS (4,5,6)

Nei plasmidi così identificati sia la presenza della mutazione D1994A o G2019S sia il corretto orientamento delle sequenze codificanti per i peptidi di localizzazione è stata verificata mediante sequenziamento.

#### 4.2 Purificazione di mitocondri

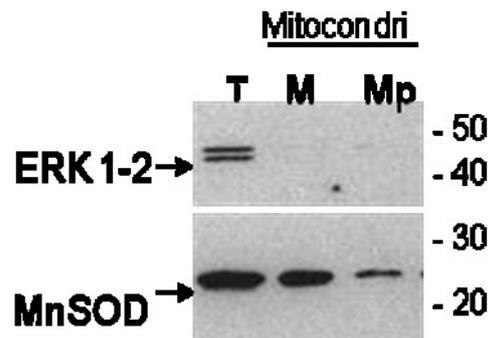
Al fine di valutare la purezza delle frazioni mitocondriali ottenute mediante tecniche di ultracentrifugazione, abbiamo messo a confronto estratti crudi o ulteriormente purificati mediante gradiente di saccarosio.

Brevemente, le cellule HEK 293 sono state staccate dalla superficie delle piastre utilizzando uno scraper, risospese in una soluzione di lavaggio e sottoposte a centrifugazione. Una piccola aliquota delle cellule raccolte viene conservata per poi essere utilizzata come confronto con i campioni purificati. Il pellet formatosi è stato risospeso in un buffer mitocondriale per poi iniziare la fase di omogeneizzazione o frammentazione.

Per separare i nuclei dal citoplasma e dagli organuli, l'omogenato è stato centrifugato; dal surnatante formatosi sono stati separati i mitocondri dal citoplasma attraverso un'ulteriore centrifugazione. Il pellet, contenente appunto i mitocondri, è stato risospeso in un buffer mitocondriale e sottoposto ad ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio per purificare ulteriormente gli stessi mitocondri.

Le fasi del secondo protocollo sono le stesse descritte nel primo, infatti i due differiscono per l'ultracentrifugazione e nella fase di omogeneizzazione, poiché vengono utilizzati differenti buffers.

Per valutare l'efficienza dei due protocolli, i campioni purificati sono stati analizzati mediante Western Blotting con anticorpi  $\alpha$ -ERK (chinasi citoplasmatiche),  $\alpha$ -MnSOD (proteina mitocondriale).



**Figura 16.** Confronto tra protocolli per la purificazione di mitocondri: a) Localizzazione cellulare delle chinasi citoplasmatiche Erk e della proteina mitocondriale MnSOD. b) Analisi mediante Western blotting di estratti proteici ottenuti come descritto in figura 10 con anticorpi anti-Erk e anti-MnSod. T: lisato cellulare totale; M: mitocondri estratti; Mp: mitocondri purificati.

La figura 16 dimostra che entrambe le metodiche di estrazione sono efficienti, poiché le anti-Erk indicano che nei purificati non vi è una contaminazione di proteine citoplasmatiche a livello dei mitocondri.

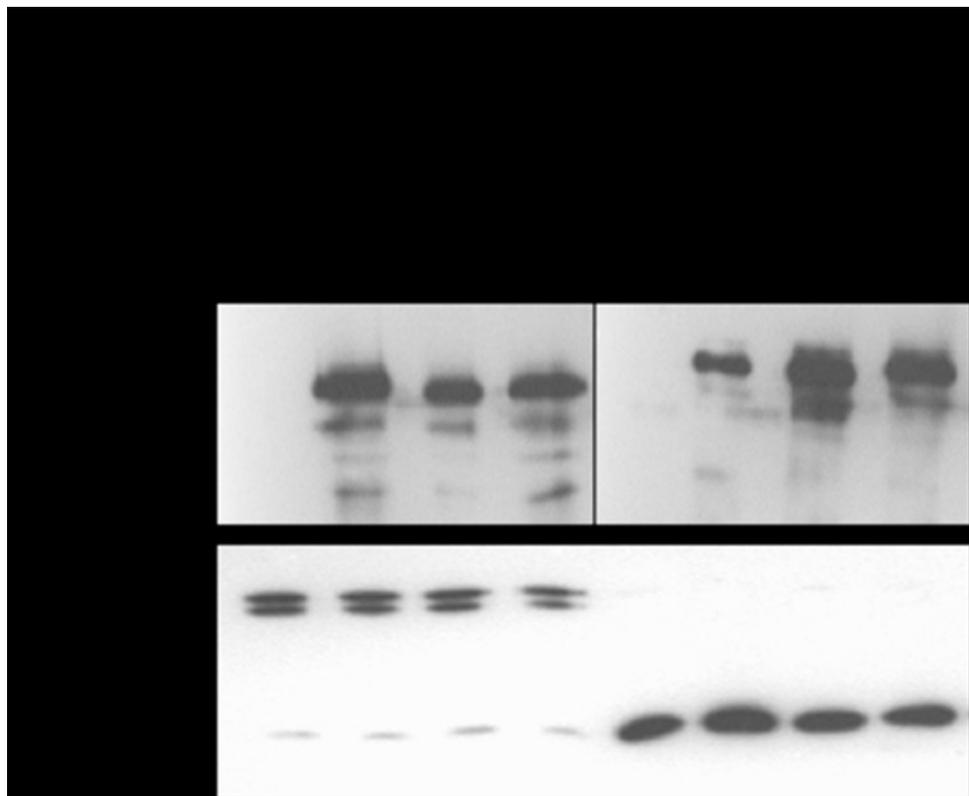
Invece con l'utilizzo dell'anti-MnSod emerge una piccola differenza, il secondo protocollo risulta essere più efficiente, dato che si nota un maggior arricchimento in organuli, ossia risulta essere stata isolata un quantità maggiore di mitocondri.

Valutando questi risultati, negli esperimenti successivi abbiamo deciso di utilizzare il secondo protocollo, essendo più efficace e più veloce.

### 4.3 - Localizzazione mitocondriale di IMS-LRRK2 ed MTX-LRRK2

Al fine di valutare la capacità delle sequenze segnale MTX ed IMS di veicolare LRRK2 all'interno del mitocondrio, cellule HEK 293 sono state trasfettate con il metodo del calcio-fosfato con i costrutti LRRK2-WT, LRRK2 MTX e LRRK2-IMS. Dopo 48 di crescita, le cellule sono state raccolte ed i mitocondri estratti con il protocollo illustrato in precedenza.

Quantità equivalenti di estratto totale e mitocondri le sono state analizzate mediante Western Blotting con anticorpi  $\alpha$ -ERK (chinasi citoplasmatiche),  $\alpha$ -MnSOD (proteina mitocondriale) e con  $\alpha$ -LRRK2 (figura 17).

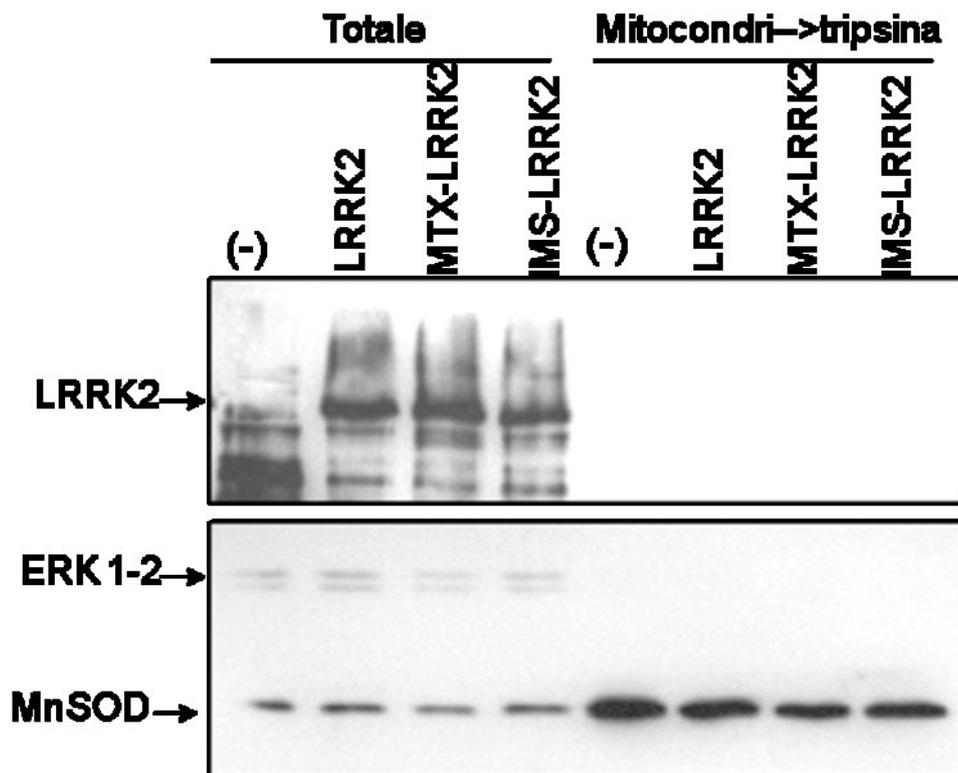


**Figura 17.** Localizzazione subcellulare di LRRK2, IMS-LRRK2 e MTX-LRRK2. Analisi mediante Western Blotting lisati cellulari totali e dei mitocondri purificati ottenuti da cellule HEK293 trasfettate come indicato, con anticorpi anti-Erk e anti-MnSOD; (-) = cellule non trasfettate, LRRK2 = LRRK2 WT; MTX-LRRK2 = sequenza matrice; IMS-LRRK2 = spazio intermembrana.

Come mostrato in figura 17 LRRK2-WT viene purificata insieme agli organuli al pari della proteina contenente le sequenze segnale specifiche per il

trasferimento della stessa nella matrice o nello spazio intermembrana del mitocondrio. L'analisi con gli anticorpi anti-ERK e anti-MnSOD conferma l'efficienza della purificazione degli organelli.

Per estendere la nostra analisi, abbiamo effettuato un peeling dei mitocondri con la tripsina. Tale trattamento consente di discriminare tra le proteine adese alla membrana esterna del mitocondrio e quelle localizzate al suo interno, in quanto solo queste ultime saranno resistenti alla digestione triptica. Abbiamo quindi ripetuto l'esperimento descritto in figure 17, introducendo una blanda digestione con la tripsina prima di procedere con la purificazione dei mitocondri (Figura 18).



**Figura 18.** – Peeling mitocondriale. Analisi mediante western-blotting condotta su estratti proteici di lisati cellulari e di mitocondri purificati trattati con tripsina, ottenuti da coem descritto in figura 14, con anticorpi anti-LRRK2, anti-Erk e anti-MnSOD. (-) = cellule non trasfettate, LRRK2 = LRRK2 WT; MTX-LRRK2 = sequenza matrice; IMS-LRRK2 = spazio intermembrana.

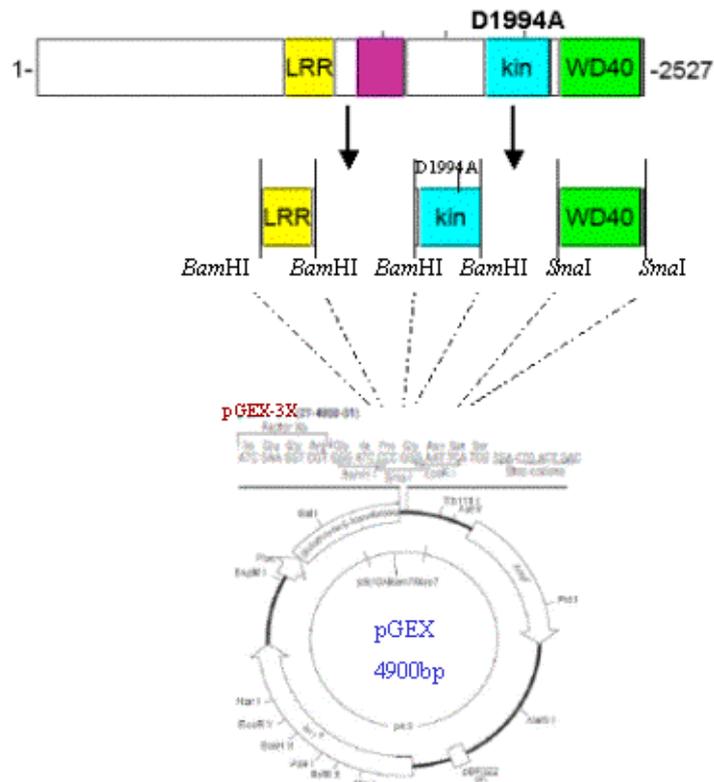
La figura 18, mostra che la proteina LRRK2 indipendentemente dai segnali di localizzazione mitocondriale, è sensibile all'azione della tripsina, indicando che essa è adesa alla membrana mitocondriale esterna e non è presente all'interno della matrice mitocondriale.

## **5. Identificazione di interattori molecolari di LRRK2**

La cromatografia d'affinità, basata sull'utilizzo di proteine di fusione come esca, associata alla spettrometria di massa è una delle tecniche analitiche più versatili per l'identificazione di complessi molecolari. A questo scopo abbiamo realizzato proteine di fusione tra la GST procariotica e tre diversi domini funzionali di LRRK2. Le proteine di fusione così ottenute sono state utilizzate per l'identificazione di interattori proteici da un estratto proteico ottenuto da cervello di topo.

### **5.1 Vettori per l'espressione delle proteine di fusione per esperimenti di GST-pull down.**

Al fine di produrre le proteine di fusione tra GST e i domini LRR, WD40 e KIN (dominio chinasi) di LRRK2, sono state trasformate cellule batteriche competenti di E.coli del ceppo BL21 con le costruzioni plasmidiche illustrate in Figura 19:



**Figura 19.** Rappresentazione schematica del clonaggio dei domini LRR, KIN e WD-40 della proteina LRRK2 nei vettori d'espressione pGEX.

Il vettore di clonaggio utilizzato per l'espressione delle proteine di fusione è il plasmide pGEX-3X di 4900 bp, che contiene la sequenza codificante per la Glutathione-S-Transferasi (GST) batterica a monte di un sito multiplo di clonaggio. Il sistema di espressione è sotto controllo del promotore ibrido tac e può essere indotto con IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside). Il plasmide contiene il gene per la resistenza all'ampicillina, l'origine di replicazione di pBR322, l'operatore lac, il gene lacIq per l'espressione del repressore dell'operone del lattosio e la sequenza riconosciuta dal Fattore Xa del complemento per l'eventuale separazione della GST dalla proteina di interesse. Nel mio lavoro sperimentale ho utilizzato plasmidi pGEX-3X in cui erano state precedentemente clonate rispettivamente le sequenze codificanti per:

- il dominio LRR (sito di clonaggio: BamHI),
- il dominio WD40 (sito di clonaggio: SmaI),
- il dominio KIN recante la mutazione D1994A (sito di clonaggio: BamHI);

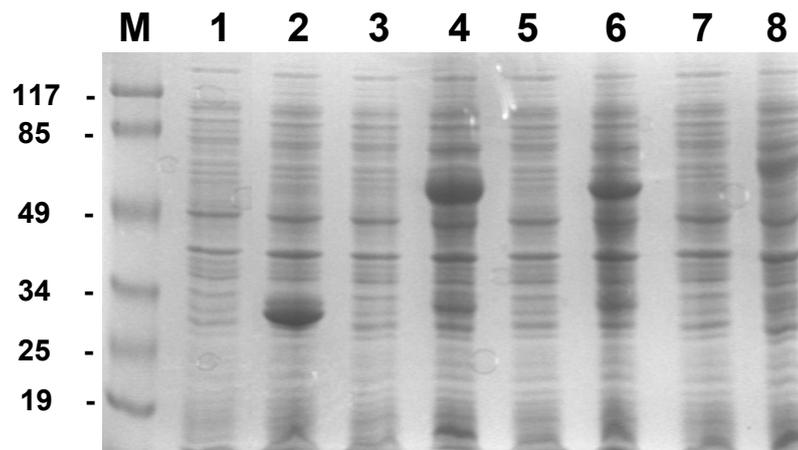
Il residuo aspartato è omologo all'aspartato 166 della protein-chinasi A ed è conservato nei siti attivi di tutte le protein-chinasi. Esso forma un ponte idrogeno con la serina del substrato che verrà fosforilata. Mutazioni in alanina di questo residuo determinano una riduzione di almeno 300 volte della velocità di reazione ( $V_{max}$ ) senza alterare le costanti di associazione ( $K_m$ ) dell'ATP e del substrato. In tal modo si riduce notevolmente la velocità di fosforilazione e di rilascio del substrato, che può quindi essere più facilmente isolato ed identificato.

Infine il plasmide pGEX 3X, codificante per la sola proteina Glutathione-STransferasi, è stato utilizzato come controllo.

## **5.2 Espressione e purificazione delle proteine di fusione**

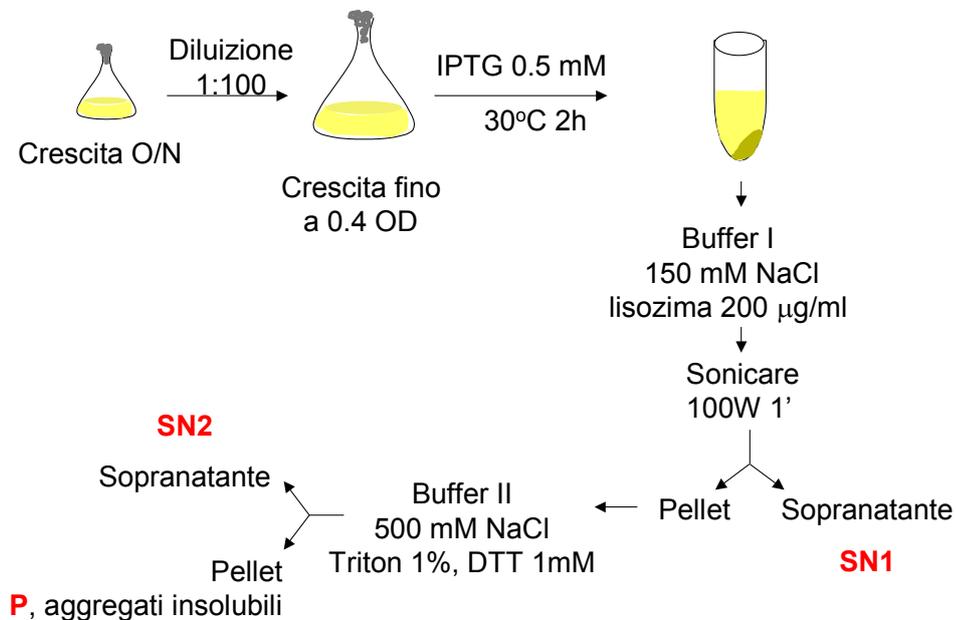
Al fine di ottenere l'espressione delle proteine di fusione GST-LRR, GST-KIND1994A, GST-WD40 e GST, una colonia per ciascuna costruzione plasmidica è stata cresciuta. La coltura batterica è stata diluita di 100 volte in terreno di crescita e fatta crescere sino all'ottenimento di una densità ottica a 600nm pari a 0,4 O.D. Dopo aver prelevato un'aliquota per ciascuna coltura, indicata nel testo e nelle figure come  $T_0$  (tempo zero), si è proceduto con l'induzione dell'espressione della proteina di fusione aggiungendo al mezzo di coltura 0,5 mM IPTG in incubazione per circa 2 ore. E' stata effettuata l'analisi dell'avvenuta induzione mediante elettroforesi SDS-PAGE di un'aliquota dei campioni (indicata come 2h in figura) ottenuti dopo l' incubazione con l'induttore. Il gel di poliacrilammide ottenuto è stato colorato con Blue di Coomassie per visualizzare le proteine.

Come mostrato in Figura 20, l'induzione è risultata buona per tutte le costruzioni geniche analizzate.



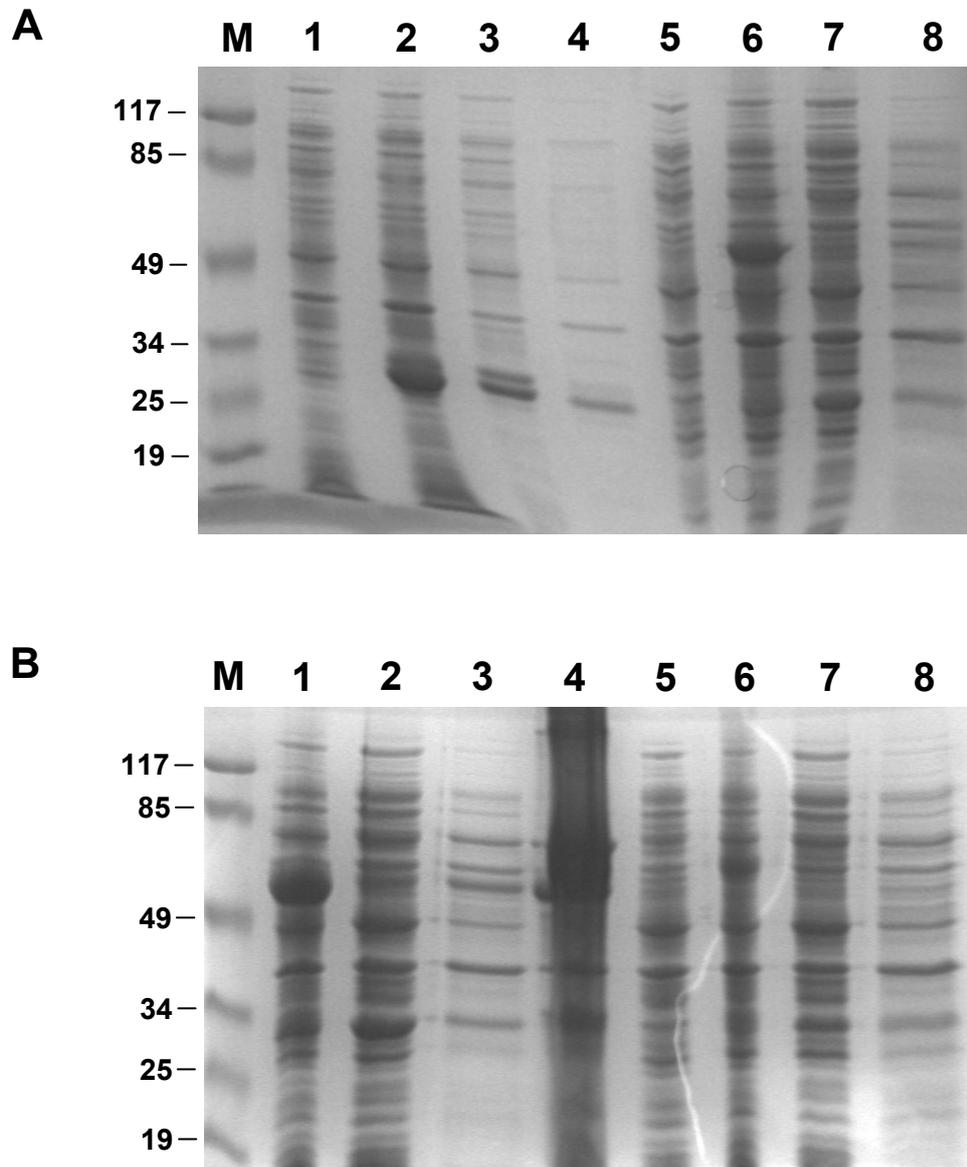
**Figura 20.** Elettroforesi su gel di poliaccrilammide (SDS-PAGE): analisi dell'induzione dell'espressione delle proteine di fusione. M) Marcatore di peso molecolare; 1-2: GST [ $T_0$ ; 2 h] 3-4: LRR [ $T_0$ ; 2 h] 5-6: KIN [ $T_0$ ; 2 h]; 7-8: WD40 [ $T_0$ ; 2 h].

Le proteine ricombinanti sono state estratte tramite lisi batterica seguendo il procedimento illustrato in Figura 21, che prevede l'utilizzo di lisozima (200 $\mu$ g/ml) per ottenere un primo surnatante (SN1) e successivamente di alto sale ed un detergente, quale il Triton 1%, per un secondo surnatante (SN2)



**Figura 21.** Induzione dell'espressione e estrazione delle proteine di fusione.

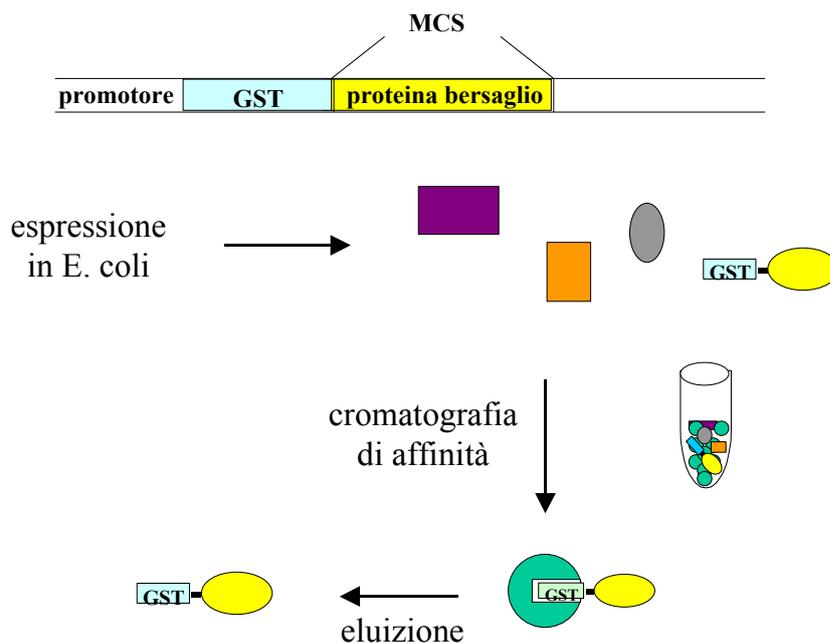
Per identificare la frazione contenente la maggior quantità di proteina ricombinante estratta si è effettuata un'elettroforesi SDS-PAGE di aliquote delle frazioni SN1 e SN2 per ogni campione [Figura 22 A e B].



**Figura 22.** Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE): analisi delle diverse frazioni ottenute nei procedimenti di estrazione. M) Marcatore di peso molecolare. A: 1-4) GST [T<sub>0</sub>; 2 h; SN1; SN2]; 5-8) KIN [T<sub>0</sub>; 2 h; SN1; SN2]. B) 1-4) LRR [2 h; SN1; SN2; P]; 5-8) WD40 [T<sub>0</sub>; 2 h; SN1; SN2].

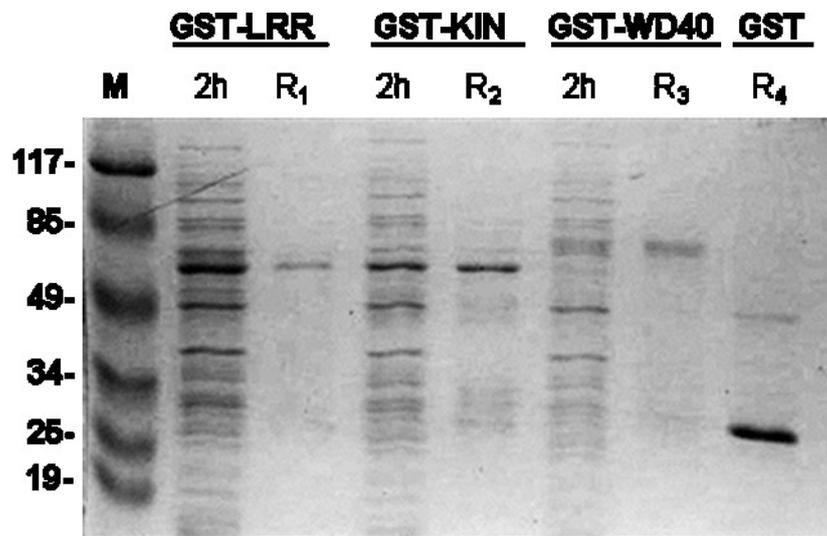
Tutte e tre le fusioni tra i domini di LRRK2 e GST tendono a formare corpi di inclusione e pertanto vengono estratte nella frazione SN2, mentre il controllo GST è maggiormente presente nella frazione SN1.

Queste frazioni sono state sottoposte a purificazione, mediante cromatografia di affinità [Figura 23]. E' stata utilizzata la resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Amersham) che ha la proprietà di legare specificamente il GST delle proteine di fusione, in quanto è composta da granuli di agarosio rivestiti di glutatione, substrato dell'enzima Glutathione-S-Transferasi (GST).



**Figura 23.** Purificazione delle proteine di fusione mediante cromatografia di affinità

Nella Figura 24 sono mostrati i risultati della purificazione analizzati mediante elettroforesi SDS-PAGE. La quantità di proteina di fusione purificata dalla frazione SN2 è risultata buona.



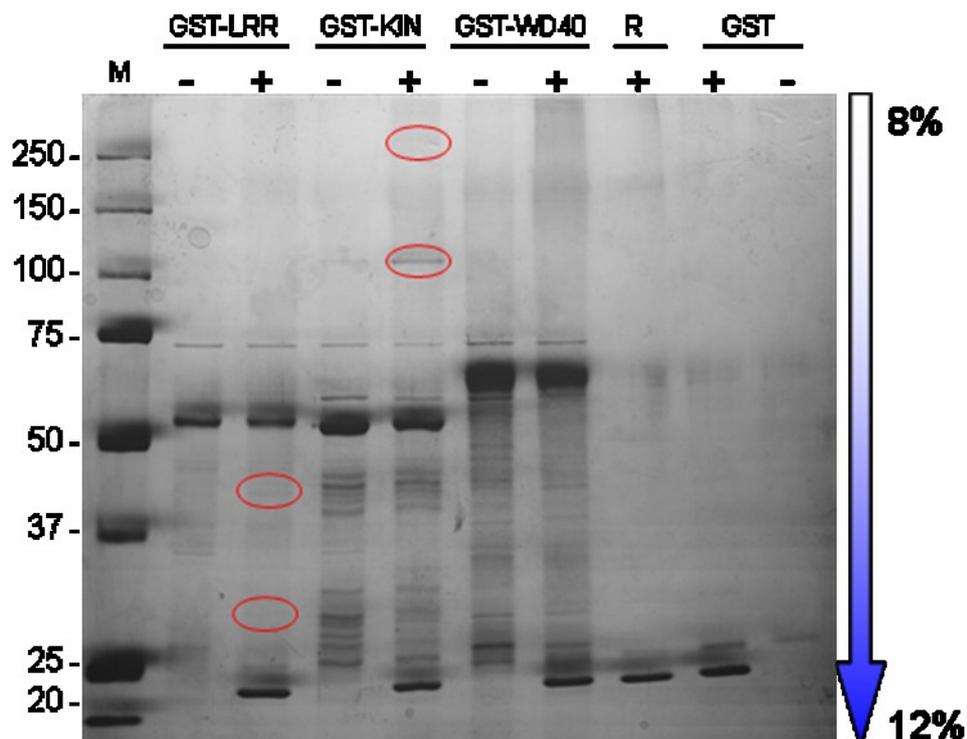
**Figura 24.** Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE): purificazione delle proteine di fusione. M) marcatore di peso molecolare; R1) frazione SN2 GST-LRR purificata; R2) frazione SN2 GST-KIN purificata; R3) frazione SN2 GST-WD40 purificata; R4) frazione SN1 GST purificata.

### 5.3 Identificazione di interattori molecolari della proteina LRRK2 mediante saggio GST pull-down e spettrometria di massa

Le proteine di fusione purificate sono state utilizzate in un saggio di GST-pull down, con lo scopo di isolare, in vitro, possibili interattori molecolari di LRRK2.

Si è preparato un estratto cellulare proteico da cervello di topo che è stato incubato per una notte con le proteine ricombinanti purificate [Figura 24].

Un'aliquota di ciascun campione è stata incubata senza l'estratto cellulare eucariotico, come controllo. I risultati della prova di GST-pull down sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide monodimensionale in gradiente (running gel: 8%-12%). E' stata caricata come controllo la resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Amersham) incubata con l'estratto cellulare eucariotico [Figura 25].



**Figura 25.** Elettroforesi su gel di poliacrilammide monodimensionale in gradiente (8%-12%): GST-pull down. R) Resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Amersham) incubata con l'estratto cellulare eucariotico come controllo. Il simbolo – indica la fusione GST-dominio LRRK2 non incubata con l'estratto cellulare eucariotico; mentre il simbolo +.indica la stessa fusione incubata con l'estratto.

Le bande d'interesse (cerchiate in rosso in Figura 25) indicate con l'acronimo LIP (*LRRK2 interacting protein*) sono state ritagliate dal gel ed inviate alla ditta Nurex Srl per essere analizzate mediante spettrometria di massa.

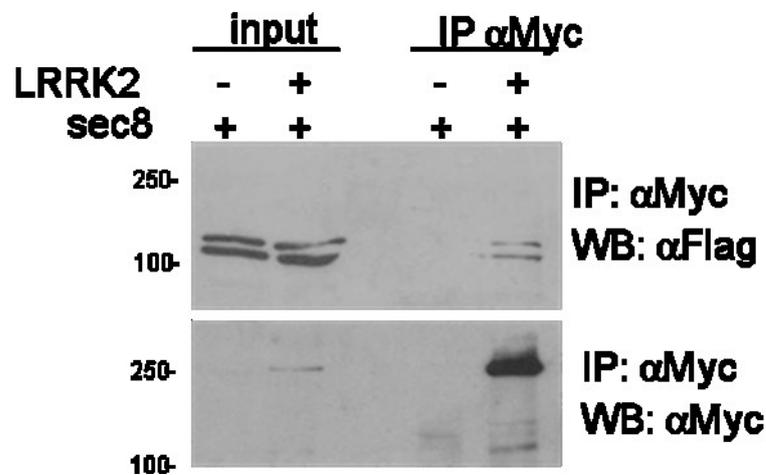
L'analisi dei digesti triptici attraverso il software Mascot Peptide Mass Fingerprint ha consentito di individuare alcune delle proteine isolate (tab. 4):

LIP	Dominio d'interazione	Proteina identificata
LIP <sub>250</sub>	KIN <sup>D1994A</sup>	indeterminata
LIP <sub>110</sub>	KIN <sup>D1994A</sup>	Sec-8
LIP <sub>45</sub>	LRR	β-actina
LIP <sub>37</sub>	LRR	CBR-1

**Tabella 4:** Interattori putativi della proteina LRRK2 identificati mediante spettrometria di massa. La proteina LIP<sub>250</sub> non è stata identificata probabilmente a causa della scarsa quantità del campione.

#### 5.4 LIP<sub>110</sub> è un interattore molecolare di LRRK2

Al fine di confermare l'interazione tra le proteine identificate mediante GST pull down e la proteina LRRK2 sono stati allestiti dei saggi di co-immunoprecipitazione. E' stato amplificato il cDNA codificante per la proteina hSec8 (EXOC4) mediante PCR su cDNA di linfociti umani disponibile in laboratorio, e successivamente si è proceduto al suo clonaggio nel vettore p3XFlagCMV10. Cellule HEK293 sono state co-trasfettate con i vettori pMTK5XmycLRRK2<sup>WT</sup> e pCMV3XFlagSec8, lisate e sottoposte ad immunoprecipitazione con anticorpo anti-myc. Gli immunoprecipitati insieme agli input (estratti proteici totali) del controllo e del campione sono stati analizzati mediante western blotting usando l'anticorpo anti-flag. I risultati ottenuti sono mostrati nella Figura 26 :



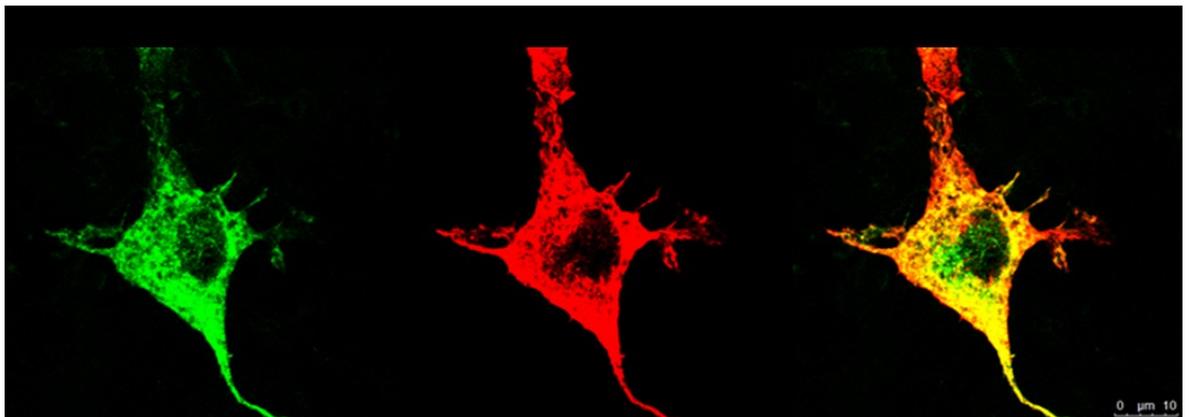
**Figura 26:** Saggio di co-immunoprecipitazione. Il campione co-trasfettato ed il controllo trasfettato solo con il vettore pSec8Flag sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-myc; l'analisi sugli immunoprecipitati e sugli input mediante western blotting è stata realizzata utilizzando l'anticorpo anti-Flag.

La figura 26 mostra la presenza di Sec8 negli input e nell'immunoprecipitato differentemente dal controllo indicando un'interazione specifica con LRRK2. L'interazione è stata confermata anche mediante immunoprecipitazione con anti-flag e western blot con anti-myc. Lo stesso saggio è stato allestito con

LRRK2 e CBR1 ma le due proteine non sono state co-immunoprecipitate insieme ( risultati non mostrati).

#### **5.4 LRRK2 e Sec8 co-localizzano parzialmente *in vivo***

Per verificare la distribuzione cellulare delle proteine LRRK2 e Sec8 abbiamo co-trasfettato la linea cellulare SH-SY5Y con i costrutti p5xmyc-LRRK2 e p3xflag –Sec8. Al fine di valutare una eventuale co-localizzazione tra le 2 proteine abbiamo analizzato le cellule mediante immunofluorescenza utilizzando una miscela di anticorpi a-myc e a-flag rivelati con anticorpi secondari anti-specie coniugati con differenti fluorocromi:

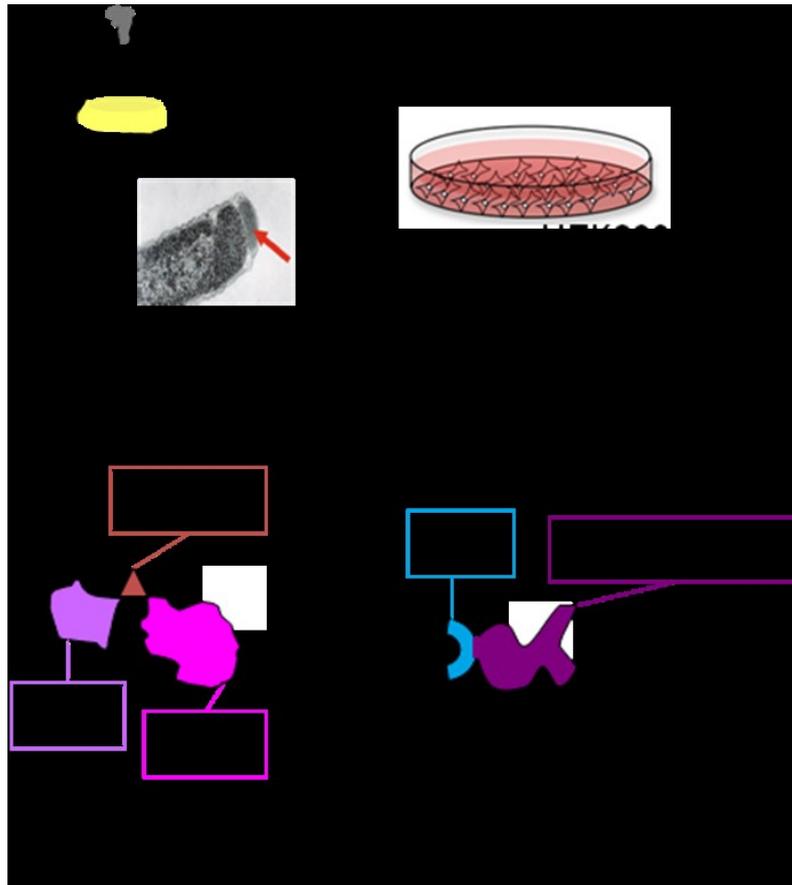


**Figura 27:** Le proteine LRRK2 e Sec8 espresse in cellule SH-SY5Y manifestano una importante co-localizzazione diffusa nel citoplasma cellulare.

Come mostrato nell'immagine in figura 27 le proteine si localizzano nel citoplasma cellulare ed esibiscono co-localizzazione all'osservazione in microscopia confocale.

## 5.5 LRRK2 fosforila Sec8 in vitro

Essendo la proteina LRRK2 una protein chinasi ed avendo identificato Sec8 come interattore del dominio chinasi ci siamo chiesti se per caso Sec8 venga fosforilato dalla dardarina. Per verificare questa ipotesi abbiamo allestito un saggio chinasi *in vitro*. Le proteine LRRK2<sup>WT/GS2019S/1994</sup> e Sec8 sono state espresse e purificate secondo lo schema in figura 28:

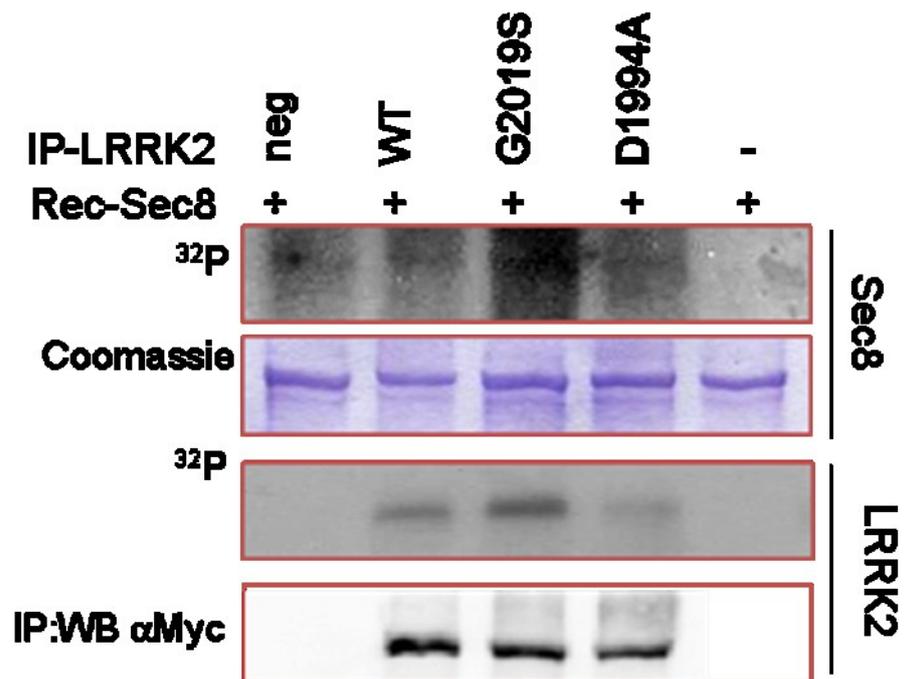


**Figura 28.** Espressione e purificazione delle proteine LRRK2 e Sec8 mediante approcci differenti. Le due proteine saranno utilizzate in un saggio chinasi *in vitro*: LRRK2 come enzima chinasi e Sec8 come substrato

I costrutti p5xmyc-LRRK2<sup>WT</sup> e p5xmycLRRK2<sup>2019</sup>, (il mutante che esibisce un'incrementata attività chinasi rispetto alla forma WT) e p5xmycLRRK2<sup>1994</sup> (mutante con attività chinasi spenta) sono stati trasfettati in cellule HEK293 e purificati mediante immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-myc. La proteina Sec8 è stata espressa e purificata come proteina ricombinante fusa con la GST

in quanto questo approccio ci consente di ottenere quantità maggiori di campione purificato per l'allestimento del saggio chinamico.

Le proteine così purificate sono state risospese in Buffer chinamico 1X (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, inibitori di proteasi), un' aliquota di immunoprecipitato è stata conservata per essere successivamente analizzata con western blotting mentre con il resto si è proceduto con la reazione chinamica che prevede l'utilizzo di [γ-<sup>32</sup>P]ATP come fonte di gruppi fosfato e la proteina Sec8 come substrato. La miscela di reazione è stata incubata per 20 minuti a 37°C e bloccata con l'aggiunta di buffer Laemli 2X . Le proteine denaturate e separate con SDS-PAGE vengono colorate con Blue Coomassie ed analizzate mediante autoradiografia ( Fig. 29)



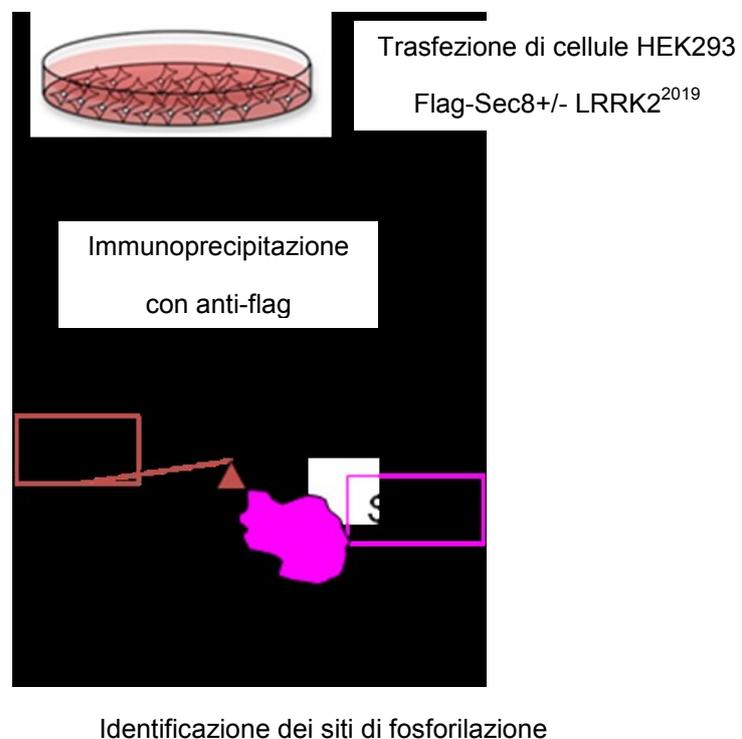
**Figura 29:** Saggio chinamico in vitro sulle proteine immunoprecipitate LRRK2<sup>WT</sup>, LRRK2<sup>2019</sup> e LRRK2<sup>1994</sup> utilizzando la proteina Sec8 come substrato. Gli immunoprecipitati sono stati analizzati mediante WB per verificare l'omogenea espressione di ciascuna chinasi

Come mostrato nella figura 29 la proteina Sec8 viene fosforilata in vitro da LRRK2, in maniera sensibilmente più marcata dalla forma mutata G2019S che

notoriamente manifesta un'incrementata attività chinastica rispetto alla forma WT. Come atteso invece il mutante 1994 manifesta chinastica comparabile al controllo negativo. Il terzo pannello della figura 29 evidenzia la capacità di autofosforilarsi delle proteine LRRK2. Come atteso il mutante 2019 mostra la più alta attività chinastica.

### 5.6 LRRK2 fosforila Sec8 *in vivo*.

Al fine di dimostrare che LRRK2 fosforila Sec8 anche *in vivo* e per identificare i possibili siti di fosforilazione, abbiamo condotto sulla proteina Sec8 immunoprecipitata nelle condizioni descritte in figura 30 un'analisi di Spettrometria di Massa che consente l'identificazione dei peptidi, eventualmente fosforilati, che compongono la proteina. Cellule HEK293 sono state trasfettate con il costrutto pFlagSec8 da solo o cotrasfettate con pFlagSec8 e pLRRK2<sup>2019</sup>, dopo 48 h le cellule sono state lisate e la proteina Sec8 è stata immunoprecipitata con l'anticorpo anti-flag e successivamente sottoposta ad analisi di Spettrometria di Massa nei laboratori di Porto Conte Ricerche.



**Figura 30.** Immunoprecipitazione della proteina Sec8 fosforilata *in vivo* da LRRK2<sup>2019</sup>.

L'analisi di peptidi fosforilati mediante due distinti approcci, HCD e Decision Tree, ci ha consentito di individuare un residuo di treonina in posizione 32 fosforilato nella proteina Sec8 coespressa con LRRK2<sup>2019</sup> che non viene rilevato nel controllo negativo e cioè Sec8 espressa in assenza di LRRK2<sup>2019</sup>, come mostrato nella figura 31

	ESPERIMENTO <i>IN VIVO</i>			
	IP hSEC8		IP hSEC8/ LRRK2	
	HCD	DECISION TREE	HCD	DECISION TREE
COPERTURA DI SEQUENZA	41.2%	61.5%	39.5%	36%
SITI DI FOSFORILAZIONE IDENTIFICATI	S31 T236	S31 T236		S31 <u>T32</u>

**Figura 31.** Risultati dell'analisi in spettrometri di massa per l'identificazione dei siti di fosforilazione nella proteina Sec8 espressa in presenza e in assenza di LRRK2<sup>2019</sup>.

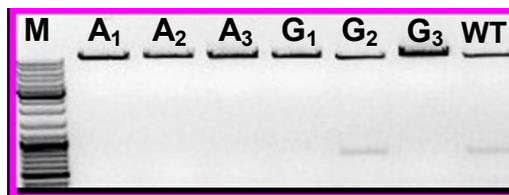
A questo punto per verificare l'importanza fisiologica della fosforilazione su questo residuo di treonina di Sec8, si è pensato di mutagenizzarlo sostituendolo con un residuo di Alanina (che non può essere fosforilato) o con un residuo di Glutammato (che potrebbe simulare la fosforilazione). La reazione di mutagenesi è stata allestita utilizzando i seguenti oligonucleotidi:

Thr/Ala senso	5'GACTCTGTCTGCTAGTGACGAT3'
Thr/Ala antisenso	5'ATCGTCACTTTCAGACAGAGTC3'
Thr/Glu senso	5'AGGACTCTGTCTGAAAGTGACGATGT3'
Thr/Glu antisenso	5'ACATCGTCACTTTCAGACAGAGTCCT3'

Il protocollo di amplificazione prevede 18 cicli così organizzati:

denaturazione	94°C	per 30''
appaiamento	54°C	per 45''
estensione	72°C	per 15'

Il prodotto PCR viene digerito con l'enzima DpnI per degradare le molecole di plasmide originarie sintetizzate in batteri, poi viene purificato con Fenolo/Cloroformio. Il pellet di DNA ottenuto viene utilizzato per trasformare cellule batteriche DH5 $\alpha$ . Le cellule così trasformate vengono piastrate su terreno contenente ampicillina ed incubate O/N a 37°C. Le colonie resistenti vengono cresciute in 2 ml di terreno LB per poi purificare il DNA plasmidico mediante il protocollo di lisi alcalina descritto nei Metodi. Poiché il codone codificante per la treonina che abbiamo sostituito si trova all'interno della sequenza di riconoscimento dell'enzima di restrizione SpeI, sequenza che viene perduta in seguito alle mutagenesi, abbiamo digerito il DNA plasmidico con questo enzima per eseguire uno screening rapido delle colonie ed isolare il clone con le corrette sostituzioni. Le bande attese sono due nella sequenza WT (8500 bp e 800 bp) mentre ci attendiamo la linearizzazione del plasmide nei mutanti Ala e Glu



**Figura 32.** Elettroforesi su gel di agarosio dei plasmidi pCMV3XFlag-hSec8 mutati e WT. A=alanina, G=Glutammico

Come mostrato nella figura 32 siamo riusciti ad isolare 3 cloni per ogni mutante. Dal risultato della digestione si evince che tutti i campioni analizzati tranne G<sub>2</sub>, che presenta lo stesso pattern di bande del plasmide WT, sono stati mutati. I plasmidi così ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento per verificare ulteriormente la correttezza delle mutazioni.

## 5.7 Costruzione di mutanti di delezione della proteina Sec8

In previsione di studi più dettagliati sull'interazione tra Sec8 ed LRRK2 abbiamo pensato di individuare nella proteina Sec8 le regioni che effettivamente interagiscono con LRRK2. Per fare questo si è pensato di creare dei mutanti di delezione disegnando degli oligonucleotidi (descritti nei Materiali) che eliminino delle porzioni di circa 600 bp per volta come illustrato nello schema in figura 33

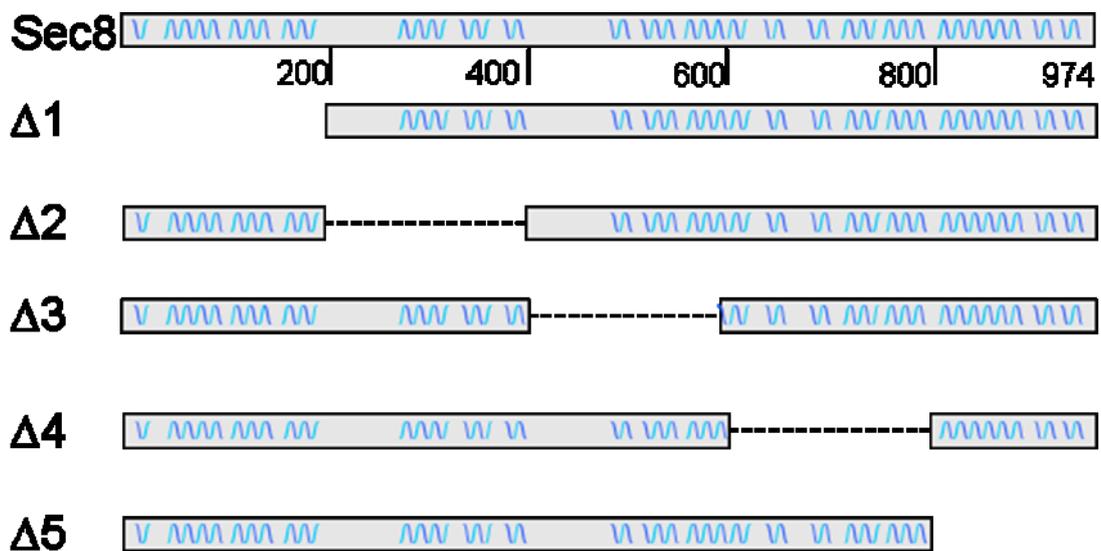
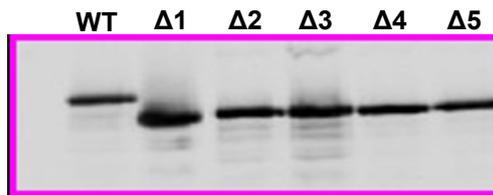


Figura 33. Mutanti di delezione della proteina Sec8

Per realizzare i mutanti illustrati nella Figura 33 abbiamo allestito 5 reazioni di mutagenesi secondo il protocollo già descritto precedentemente. I plasmidi mutati sono stati utilizzati per trasformare cellule batteriche DH5a e i cloni positivi sono stati individuati mediante diverse reazioni di digestione dei plasmidi con enzimi di restrizione. I cloni positivi (pCMV3XFlag-Δ1Sec8, pCMV3XFlag- Δ2Sec8, pCMV3XFlag-Δ3Sec8, pCMV3XFlag-Δ4Sec8 e pCMV3XFlag-Δ5Sec8) sono stati utilizzati per trasfettare cellule HEK293 in modo da verificarne l'espressione. Le cellule trasfettate dopo 24-48 h sono state lisate e le proteine analizzate mediante WB con anticorpo anti-flag. Tutti i costrutti risultano correttamente espressi.



**Figura 34.** WB dei mutanti di delezione di Sec espressi rivelati con anti-flag.

I mutanti di delezione saranno utilizzati per individuare le regioni della proteina Sec8 responsabili dell'interazione con LRRK2. A tal fine saranno utilizzati per allestire dei saggi di co-immunoprecipitazione con la dardarina.

## CONCLUSIONI

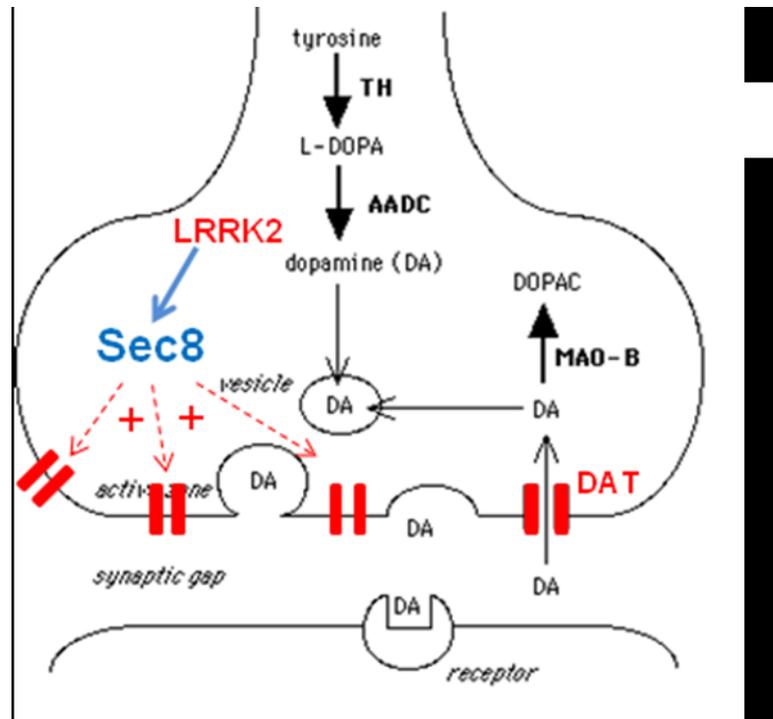
Ad oggi mutazioni a carico del gene LRRK2 rappresentano una delle cause più importanti nella patogenesi della Malattia di Parkinson; infatti, da un lato esse sono presenti in circa 10% dei casi ad eredità mendeliana, dall'altro fino al 4% dei casi sporadici presentano mutazioni nello stesso gene. Nonostante siano passati 7 anni dall'identificazione della dardarina come responsabile del Parkinson di tipo 8, le conoscenze della sue funzioni fisiopatologiche sono ancora piuttosto scarse. La presenza di domini multipli coinvolti in interazioni proteina-proteina suggerisce la possibilità che LRRK2 possa interagire con svariati partner molecolari intervenendo in diversi processi cellulari dei neuroni dopaminergici. Gli effetti principali delle forme mutate di LRRK2 sembrano associate ad un aumento della sua attività chinasi sebbene i suoi substrati cellulari non siano stati ancora identificati con certezza (vedi introduzione). L'identificazione di interattori proteici di LRRK2 è quindi fondamentale per chiarire quale sia il suo ruolo nella cellula e attraverso quali meccanismi molecolari le sue forme mutate scatenino la neurodegenerazione. Nel mio lavoro sperimentale ho identificato un probabile interattore di LRRK2 mediante saggi di GST-pull down e successiva analisi con spettrometria di massa delle proteine isolate. Ho dimostrato, attraverso diversi approcci sperimentali, che LRRK2 è capace di interagire con la proteina Sec-8. Inoltre LRRK2 è capace di fosforilare Sec8 sia *in vitro* che *in vivo* in posizione treonina 32. Il ruolo funzionale di questa fosforilazione è ancora oggetto di studio. Questi dati, comunque, ci consentono delle considerazioni importanti alla luce anche dei meccanismi cellulari in cui Sec8 come componente del complesso "exocyst" è coinvolto. Ad esempio è stato osservato che bloccando, con anticorpi anti-Sec8, il complesso di esocitosi in cellule MDCK viene disregolata l'incorporazione dei recettori per le LDL nella membrana basolaterale. Inoltre, negli adipociti l'insulina stimola il trasporto del recettore GLUT4 per il glucosio da compartimenti intracellulari verso la membrana attraverso meccanismi di esocitosi che coinvolgono Sec8. Recentemente è stato dimostrato un importante ruolo della fosforilazione di sec8 nella localizzazione del complesso exocyst nel cono di crescita neurale. In particolare Chernyshova e colleghi hanno mostrato che Sec8 interagisce con le NCAM (neural cell adhesion

molecules). Questa interazione favorisce la fosforilazione dipendente da FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) su residui di tirosina (non ancora identificati) di Sec8. Quest'ultima modificazione post-traduzionale su Sec8 è necessaria per la localizzazione del complesso exocyst nel cono di crescita delle cellule neuronali. Inoltre il complesso exocyst ed in particolare sec8 riveste anche un ruolo chiave nella corretta localizzazione di recettori sulla membrana plasmatica. Per esempio il dominio PDZ di Sec8 interagisce con SAP102 (synapse-associated protein 102) e questa interazione media passaggio del recettore del glutammato NMDA dal citoplasma alla superficie cellulare [Chernyshova Y. Et al., 2011].

La disregolazione di molti geni coinvolti nel mantenimento e rilascio di vescicole è stata evidenziata nei pazienti e nei modelli sperimentali di Parkinson [Miller R.M. et al., 2006]. Inoltre uno dei meccanismi di patogenicità suggeriti per l'alfa-sinucleina prevede che le mutazioni a carico di quest'ultima interferiscano con la trasmissione sinaptica causando un accumulo di vescicole nei bottoni presinaptici [Larsen et al., 2006] con una riduzione del pool di vescicole di riciclo e con il conseguente aumento, fino a valori tossici, dei livelli di dopamina intracellulare [Thomas and Beal, 2011].

Il mio lavoro sperimentale suggerisce un importante contributo della dardarina nel controllo delle vescicole secretorie contenenti proteine e/o recettori di membrana o semplicemente coinvolte nella continua aggiunta di nuova membrana plasmatica sulla superficie cellulare. I miei dati potrebbero dare una spiegazione ad alcune delle osservazioni che sono state effettuate nei modelli animali o cellulari che esprimono forme mutate di LRRK2. E' possibile, per esempio, che la diminuzione dei livelli extracellulari di dopamina a livello striatale osservati nei topi che esprimono LRRK2<sup>G2019S</sup> sia legata non tanto ad alterazioni nei meccanismi di rilascio del neurotrasmettitore, ma sia invece il risultato di una disregolazione dei meccanismi che portano all'esposizione dei recettori della dopamina (DAT) nella membrana presinaptica incrementando il processo di ricattura del trasmettitore stesso. La fosforilazione di sec8 potrebbe essere l'evento chiave di questo processo: infatti LRRK2<sup>G2019S</sup> manifesta un'incrementata attività chinasi rispetto alla forma WT per cui fosforilerebbe

in maniera superiore Sec8 alterando processi di secrezione legati al sequestro/ricattura della dopamina.



**Figura 35.** Ipotetico effetto dell'interazione LRRK2-Sec8 sul re-uptake della dopamina. DA=dopamina DAT=trasportatore della dopamina

L'interazione tra LRRK2 e Sec8 potrebbe inoltre spiegare gli effetti della dardarina mutata sulla morfologia e lunghezza dei neuriti. Diversi gruppi di studio infatti hanno osservato sia in cellule neuronali in coltura che in topi transgenici che esprimono LRRK2<sup>2019</sup> una ridotta complessità dei neuriti [Dachsel et al.,2010; Ramonet D., Dawson T.M. et al., 2011]. Lo sviluppo delle terminazioni nervose è uno dei tanti eventi in cui è indispensabile un rapido rimodellamento della membrana plasmatica. In questi meccanismi di movimentazione di "materiale" dai compartimenti cellulari verso la membrana, il complesso exocyst gioca un ruolo fondamentale anche a livello neuronale [Liu and Guo, 2011]. Inoltre Piccoli e colleghi hanno mostrato che la dardarina co-localizza e co-purifica con diverse proteine coinvolte nella secrezione presinaptica. L'eliminazione della dardarina attraverso un approccio di silenziamento genico determina una riduzione delle vescicole associate alla

membrana plasmatica (docked vesicles) senza alterazione del numero totale di vescicole [Piccoli G. et al., 2011]. Sicuramente i miei risultati pongono le basi per un intenso lavoro di ricerca che potrebbe rivelarsi molto utile a chiarire le funzioni fisiologiche di LRRK2 e il suo ruolo nell'insorgenza e nella progressione della malattia di Parkinson. Infine essi possono offrire nuovi spiragli per la progettazione di nuove strategie terapeutiche nel trattamento e nella cura del Parkinson.

## BIBLIOGRAFIA

- Anand V. S. and Braithwaite S. P., (2009) "LRRK2 in Parkinson disease: biochemical functions" *FEBS Journal*
- Anand V. S. *et al.* (2009) "Investigation of leucine-rich repeat kinase 2, enzymological properties and novel assays" *FEBS Journal*
- Andradi S.A., T.M. Dawson and V.L. Dawson (2008) "Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1147**, 233-241
- Bender A. *et al.*, (2006) "High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and parkinson's disease" *Nat. Genet.* **38**, 515-517
- Berwick D.C., and Kirsten H. (2011) "LRRK2 signaling pathways: the key to unlocking neurodegeneration?" *Trends in Cell Biology* **21**, 257-265
- Biskup M.D. *et al.*,(2006) "Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain" *Ann Neurol* **60**, 1-13
- Bogaerts V. *et al.*, (2007) "Genetic findings in Parkinson's disease and translation into treatment: a leading role for mitochondria?" *Genes, Brain and Behavior* **7**, 129-151
- Carney D.S. *et al.*, (2006) "Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons" *TRENDS Cell. Biol.* **16**, 27-35
- Choi W.S *et al.*, (2011) "Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model" *J Cell Biol* **192**, 873-882
- Chu C.T., (2011) "Diversity in the regulation of autophagy and mitophagy: lesson from Parkinson disease" *Parkinson's Disease*
- Cookson M.R. and Bandmann O.,(2010) "Parkinson's disease: insights from pathways" *Hum Mol Genet* **19**, R21-R27
- Cookson M.R. *et al.*, (2008) "Genetic Neuropathology of Parkinson's disease" *Int J Clin Exp Pathol* **1**, 217-231
- Cookson M.R (2009) "α-Synuclein and neuronal cell death" *Molecular Neurodegeneration* **4**, 1-14
- Cookson M.R (2010) "DJ-1, PINK1 and their effects on mitochondrial pathways" *Mov Disord* **25**, S44-S48

- Cookson M.R (2010) "The role of leucine-rich repeats kinase 2 in Parkinson's disease" *Nat Rev Neuroscience* **11**, 791-797
- Coskun P. et al.,(2011) "A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson's disease" *Biochim. Biophys. Acta*
- Covy J.P. and Giasson B.I. (2008) "Identification of compounds that inhibit the kinase activity of leucine-rich repeat kinase 2" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Cossu et al., (2007) "LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Sardinia, a Mediterranean genetic isolate" *Parkinsonism Relat Disord* **13**, 17-21
- Croteau N.J. et al., (2009) "Conservation of Helical bundle structure between the exocyst subunits" *PLoS ONE* **4**, 1-8
- Dachsel J.C. and Farrer M.J., (2010) "LRRK2 and Parkinson disease" *Arch Neurol* **67**, 542-547
- Dachsel J.C. et al., (2010) "A comparative study of Lrrk2 function in primary neuronal cultures". *Parkinsonism and Related Disorder* **16**, 650-655
- Dachsel J.C. et al., (2007) "Identification of potential protein interactors of Lrrk2" *Parkinsonism and Related Disorder*
- Dauer W. and Przedborski S., (2003) "Parkinson's disease: mechanisms and models" *Neuron* **39**, 889-909
- Dawson T.M. et al., (2010) "Genetic animal models of Parkinson's disease" *Neuron* **66**, 646-661
- Duffy P.E. and Tennyson V.M. (1965) Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus coeruleus in parkinson's disease" *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **24**, 398-414
- Farrer J.M., (2006) "Genetics of Parkinson's disease: paradigm shifts and future prospects". *Nature Reviews Genetics* **7**, 306-318
- Gandhi P.N. et al., (2009) "Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2): a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease" *Journal of Neuroscience Research* **87**, 1283-1295
- Gandhi S. and Wood N.W., (2005) "Molecular pathogenesis of Parkinson's disease" *Hum Mol Genet* **14**, 2749-2755
- Gandhi S. et al., (2006) "PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease" *Brain* **129**, 1720-1731

- Gandhi S. et al. (2009) "PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death" *Mol. Cell* **33**, 627-638
- Geisler S. et al., (2010) "PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1" *Nat. Cell. Biol.* **12**, 119-131
- Gillardon F. (2009) "LRRK2 phosphorylates brain tubulin-beta isoforms and modulates microtubule stability: a point of convergence in parkinsonian neurodegeneration?" *J. Neurochem* **110**, 1514-1522
- Goldberg M.S. et al., (2005) "Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1" *Neuron* **45**, 489-496
- Greggio E. and Cookson M.R. (2009) "Leucine-rich repeat kinase 2 mutations and Parkinson's disease: three questions" *ASN NEURO* **1**, 13-24
- Greggio E. et al., (2011) "Leucine-rich repeat kinase 2 and alpha-synuclein: intersecting pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease?" *Molecular Neurodegeneration* **6**, 1-10
- Greggio E. et al., (2008) "The Parkinson disease-associated LRRK2 is a dimer that undergoes intramolecular autophosphorylation" *J Biol Chem* **283**, 16906-16914
- Gundelfinger E.D., Kessel M.M. and Qualmann,, (2003) "Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis" *Nature Reviews Mol Cell Bio* **4**, 127-139
- Hardy J., (2010) "Genetic analysis of pathways to Parkinson's disease" *Neuron* **68**, 201-206
- Hershko A. and Ciechanover A., (1998) " The Ubiquitin System" *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479
- Higashi S. et al., (2007) "Localizatio of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain" *Brain Res.* **1155**, 208-219
- Iaccarino C. et al., (2007) "Apoptotic mechanism in mutant LRRK2-mediated cell death" *Hum Mol Genet* **16**, 1319-1326
- Kicka S. et al., (2011) "The LRRK2-related Roco kinase Roco2 is regulated by Rab1A and controls the actin cytoskeleton" *Mol. Biol. of the Cell* **22**
- Kondo K., Obitsu S. and Teshima R. (2011) "alpha-synuclein aggregation and transmission are enhanced by LRRK2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells" *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 1078-1083

- Kumar A. and Cookson M.R. (2011) "Role of LRRK2 kinase dysfunction in Parkinson's disease" *Expert Reviews in Molecular Medicine* **13** e20
- Larsen K.E. et al.,(2006) "Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis" *J Neurosci.* **26**:11915–22
- Lesage S. and Brice A., (2009) "Parkinson's disease: from monogenic forms to susceptibility factors" *Hum Mol Genet* **18**, R48-R59
- Li C. and Beal M.F. , (2005) "Leucine-rich repeat kinase 2: a new player with a familiar theme for Parkinson's disease pathogenesis" *PNAS* **102**, 16535-16536
- Li L. and Chin L.S. (2003) "The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis" *CMLS, Cell Mol Life Sci* **60**, 942-960
- Li T. et al., (2011) "Models for LRRK2-linked Parkinsonism" *Parkinson's disease*
- Li X. et al., (2010) "Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S" *Neurobiol Dis* **3**, 1788-179
- Lim K.L. and Tan J.M., (2007) " Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease" *BMC Biochemistry* **8**, 1-10
- Liu J. and Guo W. (2011) "The exocyst complex in exocytosis and cell migration" *Protoplasma*
- Lyons P.D., Peck G.R. et al., (2009) "Insulin stimulates the phosphorylation of the exocyst protein Sec8 in adipocytes" *Bioscience Reports* **29**, 229-235
- MacLeod D. et al., (2006) "The familial parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology" *Neuron* **52**, 587-593
- Marin I. et al., (2008) "The Roco protein family: a functional perspective" *FASEB J*
- Mata I.F. et al., (2006) "LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights" *TRENDS in Neuroscience* **29**, 286-293
- Mattson M.P. et al., (2008) "Mitochondria in Neuroplasticity and neurological disorders" *Neuron* **60**, 748-766
- Melrose H.L. et al., (2010) "Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein *tau* alterations in human LRRK2 transgenic mice" *Neurobiology of Disease* **40**, 503-517

- Melrose H.L., (2008) "Update on the functional biology of *Lrrk2*" *Future Neurol.* **3**, 669-681
- Miller R.M. et al., (2006) "Robust dysregulation of gene expression in substantia nigra and striatum in Parkinson's disease" *Neurobiol. Dis.* **2**, 305-313
- Milosevic J. et al., (2009) "Emerging role of LRRK2 in human neural progenitor cell cycle progression, survival and differentiation" *Molecular Neurodegeneration* **4**
- Mizuno Y. et al., (2008) "Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease" *Phil. Trans. R. Soc.* **363**, 2215-2227
- Murthy M. et al., () "Mutations in the Exocyst Component Sec5 Disrupt Neuronal Membrane Traffic, but Neurotransmitter Release Persists" *Neuron* **37**, 433-447
- Narendra D.P. et al., (2010) "PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin" *PLoS ONE* **8**
- Nuytemans K. et al., "Genetic etiology of Parkinson's disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7 and LRRK2 genes: a mutation update" *Human mutation* **31**, 763-780
- Obeso J.A. et al., (2010) "Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle" *Nature Medicine* **16**, 653-661
- Paisan-Ruiz C. (2009) "LRRK2 gene variation and its contribution to Parkinson's disease" *Human mutation* **30**, 1-8
- Pappolla M.A. (1986) "Lewy bodies of Parkinson's disease: immunoelectron microscopic demonstration of neurofilaments antigens in constituent filaments" *Arch. Pathol. Lab. Med.* **110**, 1160-1163
- Parisiadou L. and Cai H. "LRRK2 function on actin and microtubule dynamics in Parkinson's disease" *Communicative & Integrative Biology* **3**, 396-400
- Piccoli G. et al., (2011) "LRRK2 controls synaptic vesicle storage and mobilization within the recycling pool" *J. Neurosci.* **31**, 2225-2237
- Plun-Favreau H. et al., (2007) "The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by parkinson's disease-associated kinase PINK1" *Nature Cell Biology* **11**, 1243-1252
- Poewe W. et al., (2010) "Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong" *Clinical Interventions in Aging* **5**, 229-238
- Pridgeon J.W. et al., (2007) "PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1" *PLoS ONE* **5** e172

- Pungaliya P.P. et al., (2010) "Identification and characterization of a LRRK2 consensus phosphorylation motif" *PLoS ONE* **5** e13672
- Ramonet D. et al., (2011) "Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2" *PLoS ONE* **6** e18568
- Saito T., Shibasaki T. and Seino S., (2008) "Involvement of EXOC3I, a protein structurally related to the exocyst subunit Sec6, in insulin secretion" *Biomedical Research* **29**, 85-91
- Sans N. et al., (2003) "NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex" *Nature Cell Biology* **5**, 520-530
- Sakurai-Yageta M. et al., (2008) "The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is requie for tumor cell invasion downstream of cdc42 and RhoA" *JBC* **181**, 985-998
- Schapira A. (2008) "Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease" *Lancet Neurol* **7**, 97-109
- Schapira A. and Gegg M. (2011) "Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis" *Parkinson's Disease*
- Schapira A. (2008) "Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases" *Neurochem Res* **33**, 2502-2509
- Seol W. (2010) "Biochemical and molecular features of LRRK2 and its pathophysiological roles in Parkinson's disease" *BMB reports* 233-244
- Shen Jie and Cookson M.R. (2004) "mitochondria and dopamine: new insights into recessive parkinsonism" *Neuron* **43**, 301-304
- Shin N. et al., (2008) "LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis" *Experimental Cell Research* **314**, 2055-2065
- Silvestri L. et al., (2005) "Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism" *Hum Mol Genet* **14**, 3477-3492
- Solla P. et al., (2010) "Parkin exon rearrangements and sequence variants in LRRK2 mutations carriers: analysis on a possible modifier effect on LRRK2 penetrance" *Parkinson's Disease*
- Sugita S. (2008) "Mechanism of exocytosis" *Acta Physiol* **192**, 185-193
- Surmeier D. et al., (2010) "What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease?" *Prog. Brain Res.* **183**, 59-77

- Taymans J.M. et al., (2011) "LRRK2 kinase activity is dependent on LRRK2 GTP binding capacity but independent of LRRK2 GTP binding" *PLoS ONE* **6** e23207
- Thomas B. and Beal F. (2007) "Parkinson's disease" *Hum Mol Genet* **16**, R183-R194
- Thomas B. and Beal F. (2011) "Molecular insights into Parkinson's disease" *F1000 Medicine Reports* **37**, 1-8
- Tong Y. et al., (2010) "Loss of LRRK2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein and apoptotic cell death in aged mice" *PNAS* **107**, 9879-9884
- Vila M. et al., (2008) "Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues" *J. Neurochem.* **107**, 317-328
- Wang X. et al., (2011) "PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility" *Cell* **147**, 893-906
- Waxman E. and Giasson (2009) "Molecular mechanism of  $\alpha$ -synuclein neurodegeneration" *Biochimica and Biophysica Acta* **1792**, 616-624
- Webber P. and West A. (2009) "LRRK2 in Parkinson's disease: function in cells and neurodegeneration" *FEBS J.* **276**, 6436-6444
- West A. et al., (2005) "Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity" *PNAS* **102**, 16842-16847
- West A. et al., (2007) "Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity" *Hum. Mol. Genet.* **16**, 223-232
- Wirdefeldt K. et al., (2011) "Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence" *Eur. J. Epidemiol.* **26**, S1-S58
- Yue Z. and Lachermayer L. (2011) "Genetic LRRK2 models of Parkinson's disease: dissecting the pathogenic pathway and exploring clinical applications" *Movement Disorders* **26**, 1386-1397
- Zhou H. et al., (2011) "Temporal expression of mutant LRRK2 in adult rats impairs dopamine reuptake" *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 753-761