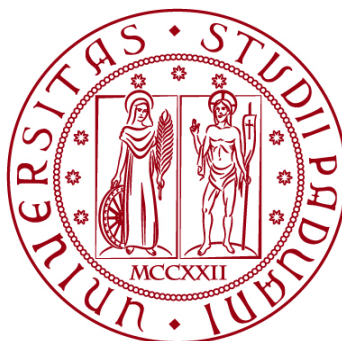


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

Validazione dell'interazione tra le proteine LRRK2 e TRIM32 e implicazione nella malattia di Parkinson

Tutor: Prof.ssa Elisa Greggio
Dipartimento di Biologia "A. Vallisneri"

Co-tutor: Dott.ssa Giulia Tombesi
Dipartimento di Biologia "A. Vallisneri"

Laureanda: Alessia Panazzolo

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

Abstract	3
1. Introduzione	4
1.1 Malattia di Parkinson.....	4
1.2 LRRK2.....	5
1.3 TRIM32	7
2. Scopo del progetto	9
3. Materiali e metodi	10
3.1 Colture cellulari.....	10
3.2 Trasfezione.....	10
3.3 Lisi.....	11
3.4 Immunoprecipitazione	11
3.5 SDS-PAGE	11
3.6 Western Blot	12
3.7 Immunofluorescenza in rene di topo	12
4. Risultati	14
4.1 Western Blot	14
4.2 Quantificazione	15
4.3 Immagini al microscopio confocale	17
5. Discussione e conclusioni	19
Bibliografia.....	21

Abstract

La Malattia di Parkinson (MP) è la seconda malattia neurodegenerativa più comune. Nelle forme familiari sono state caratterizzate varianti del gene *LRRK2*. Nonostante i meccanismi alla base della malattia non siano ancora chiari, la patogenicità di tali varianti *gain of function* è ben nota. È necessario, perciò, chiarire il ruolo fisiologico della proteina LRRK2 e capire come questa sia coinvolta nella patogenesi della malattia. Fondamentale per caratterizzare i *pathways* che la riguardano è studiare le proteine con cui interagisce.

Analisi preliminari di proteomica effettuate nel laboratorio dove ho svolto il tirocinio hanno evidenziato TRIM32, una E3-ubiquitin ligasi, come possibile interattore di LRRK2; quindi, la sua attività potrebbe contribuire alla patogenesi nella MP.

L'obiettivo di questo studio è quello di validare l'interazione tra LRRK2 e TRIM32. Per fare ciò, sono state ottenute linee cellulari esprimenti LRRK2, con tag Flag, *wild-type* e mutata. Attraverso l'immunoprecipitazione con resina anti-Flag e l'analisi di Western Blot è stata validata l'interazione tra le due proteine. Inoltre, in seguito alla quantificazione dei risultati ottenuti, l'entità dell'interazione tra TRIM32 e LRRK2 mutata si è rivelata differente rispetto alla condizione fisiologica.

1. Introduzione

1.1 Malattia di Parkinson

La Malattia di Parkinson (MP) è la malattia neurodegenerativa più comune dopo la malattia di Alzheimer. Le caratteristiche neuropatologiche salienti della MP sono la progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici nella *substantia nigra* e il deposito di aggregati della proteina α -sinucleina (α Syn) in inclusioni dette corpi di Lewy. La MP si manifesta, oltre ai caratteristici disturbi del movimento, con un'alterata percezione olfattiva, disturbi del sonno, alterazione delle capacità cognitive e del sistema nervoso autonomo.

Sebbene le forme familiari rappresentino solo il 5-10% dei casi, esse hanno reso possibile l'individuazione di geni associati alla MP, come *LRRK2* (*leucine rich repeat kinase 2*), codificanti proteine coinvolte in processi cellulari che risultano alterati anche nelle forme sporadiche. Tali processi sono molteplici e complessi, e i meccanismi molecolari patogenetici non sono ancora del tutto chiariti. Dalle evidenze finora raccolte, le vie alterate nel tessuto nervoso dei pazienti affetti riguardano le funzioni mitocondriali, il traffico delle vescicole del *pathway* endolisosomiale, la degradazione dell' α Syn, il trasporto assonale, l'omeostasi del calcio, e la neuroinfiammazione (Figura 1) [1].

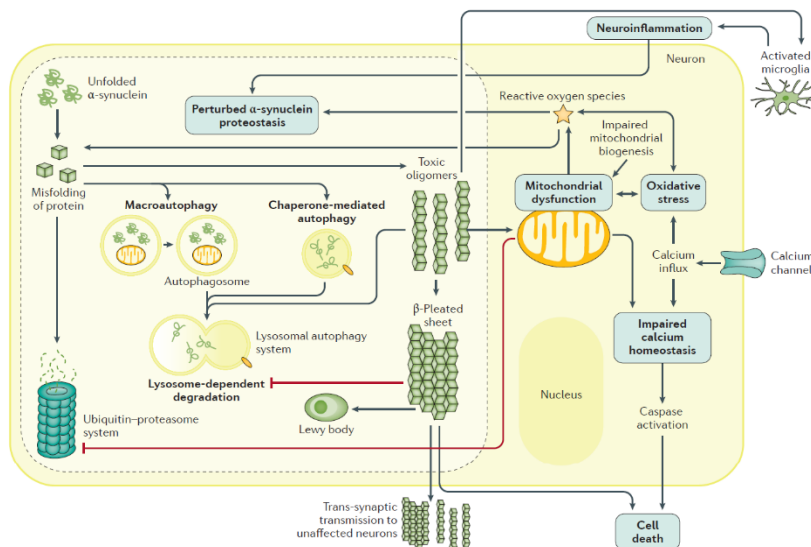


Figura 1: schema dei principali meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi della MP.

Si nota come tutti i meccanismi caratterizzati finora siano strettamente legati tra loro ed è possibile che dopo le fasi iniziali della malattia, l'inibizione della degradazione di α Syn favorita dall'aggregazione della proteina stessa determini la progressione della degenerazione tissutale (Poewe, W. et al., 2017, [1]).

L' α Syn, la cui funzione non è nota, è una proteina fisiologicamente presente come monomero solubile nel citosol dei neuroni, dove può aggregare quando presenta specifiche mutazioni o quando è sovraespressa, formando prima oligomeri, poi fibrille insolubili. L'omeostasi di questa proteina è mantenuta dalla degradazione

attraverso il sistema autofagico lisosomiale (LAS) e il proteasoma, con *signaling* mediato dall'ubiquitina; se uno di questi sistemi viene ostacolato si verifica un accumulo di α Syn. La capacità dei sistemi di degradazione di mantenere l'omeostasi della proteina diminuisce con l'avanzare dell'età: ciò fornisce una possibile correlazione tra l'invecchiamento e l'insorgenza della MP. Inoltre, le evidenze mostrano che gli aggregati di α Syn all'interno della cellula inibiscono il LAS, alimentando l'accumulo della proteina stessa. Geni associati alla MP come *LRRK2* sembrano proprio essere coinvolti nella proteostasi di α Syn. In particolare, quando *LRRK2* presenta la mutazione p.Gly2019Ser, la variante più frequente nella MP, impedisce la funzione del LAS, favorendo l'aggregazione di α Syn [1, 2].

Molte evidenze supportano le disfunzioni mitocondriali come l'evento chiave nella patogenesi. Anche in questo caso il deposito di α Syn e la disfunzione mitocondriale si alimentano a vicenda, probabilmente con un meccanismo che vede coinvolti il blocco della catena respiratoria e l'aumento dello stress ossidativo. È infatti possibile che l'aggregazione della proteina, forse presente anche all'interno del mitocondrio, impedisca la funzione del primo complesso della catena respiratoria, interrompendola e causando un deficit energetico a livello della cellula oltre all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno. Anche in questo caso proteine codificate da geni associati a MP, tra cui *LRRK2*, quando mutate sembrano avere un ruolo nell'alterazione delle funzioni mitocondriali e nella mancata *clearance* dei mitocondri non funzionanti. Durante la progressione della patologia, il sistema immunitario sembra ricoprire un ruolo importante, sia perché le fibrille di α Syn ne stimolano la risposta, determinando lo stato infiammatorio del tessuto, sia perché molti geni correlati alla MP, come *LRRK2*, sono particolarmente espressi nelle cellule del sistema immune. La neuroinfiammazione, inoltre, favorisce l'aggregazione dell' α Syn, promuovendo perciò la progressione della lesione [1]. Da notare è il fatto che tutte le evidenze raccolte finora mostrano quanto i meccanismi sospettati di essere alla base della MP siano strettamente legati e che, nonostante l'invecchiamento sia richiesto per l'insorgenza della malattia, la componente genetica risulta fondamentale.

1.1 LRRK2

LRRK2 è un enzima dotato di attività chinasi e GTPasi di particolare interesse per la MP perché sono state riscontrate mutazioni del gene *LRRK2* in famiglie affette dalla patologia in diverse parti del mondo e *LRRK2* è stato proposto come potenziale target terapeutico, nonostante molti aspetti del ruolo di questa proteina nella patogenesi della MP rimangano da indagare [2].

La struttura di *LRRK2* è organizzata in diversi domini che ne permettono il coinvolgimento in vari *pathways* cellulari come l'autofagia, il traffico di vescicole

e lisosomi, l'interazione con le proteine del citoscheletro e la riorganizzazione di quest'ultimo. Tra gli interattori di LRRK2 si trovano infatti proteine della famiglia Rab, GTPasi coinvolte nelle funzioni del TGN e nel traffico endolisomiale, alcune delle quali associate all'omeostasi di α Syn. LRRK2 mutato aumenta la fosforilazione delle Rab e ciò potrebbe contribuire alla patogenesi, per esempio, favorendo la formazione di aggregati di α Syn. Altri interattori di LRRK2 regolano il trasporto vescicolare a livello sinaptico, dove LRRK2 mutato può stravolgere il rilascio e l'*uptake* di neurotrasmettitore agendo a livello del citoscheletro e di proteine coinvolte nell'endocitosi e nell'esocitosi come, ad esempio, fosforilando la NSF, un'ATPasi necessaria al distacco del complesso SNARE. Non bisogna inoltre sottovalutare il ruolo di LRRK2 a livello del sistema immunitario, dove risulta particolarmente espressa, perché essendo una proteina coinvolta nella fagocitosi, nell'autofagia e nelle funzioni lisosomiali, quando è mutata può alterare la *clearance* degli aggregati dell' α Syn rilasciati nel tessuto [2].

Alcune varianti sono state confermate essere patogenetiche (*disease causing*), ma nel locus contenente *LRRK2* sono state riscontrate nei pazienti affetti da forme sporadiche anche altre mutazioni che modificano il rischio di contrarre la patologia (*risk modifiers*). Le varianti sono caratterizzate da ereditarietà autosomica dominante, con penetranza dipendente dall'età, ma incompleta; l'insorgenza della MP richiede cioè l'invecchiamento, ma non tutti i portatori di una variante patogenetica sviluppano sintomi evidenti [3]. Le mutazioni riguardano principalmente il *core* catalitico. Possono interessare il dominio chinasi (G2019S) oppure il dominio ROC-COR (p.Thr1348Asn, p.Arg1441Cys, p.Tyr1699Cys), deputato all'attività GTPasica e all'interazione tra proteine, compresa l'omodimerizzazione (Figura 2).

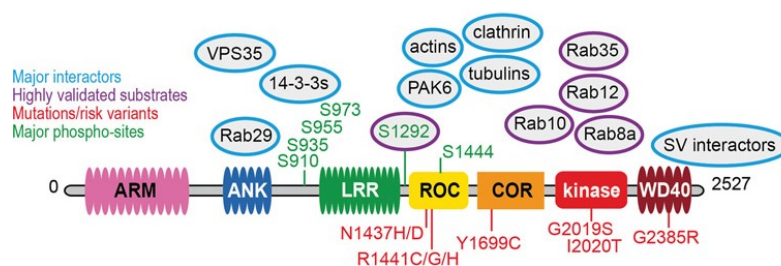


Figura 2: immagine rappresentativa della localizzazione delle principali varianti di LRRK2 associate alla MP (in rosso) (Iannotta, L. & Greggio, E., 2021, [2]). Alcune varianti come G2019S si trovano nel dominio chinasi, aumentandone l'attività; altre come R1441C nel dominio ROC o Y1699C nel dominio COR diminuiscono l'attività GTPasica.

L'attività di LRRK2 è stata saggiata in presenza delle diverse mutazioni e si è rilevato un aumento dell'attività chinasi del mutante G2019S, doppia rispetto al *wild-type*; l'aumento dell'attività si verifica anche con altre varianti, che sono

dunque da considerarsi *gain of function* in quanto la funzione chinastica non viene persa [3].

Le varianti T1348N e R1441C interessano il dominio ROC e diminuiscono l'attività GTPasica del dominio stesso. La prima è una variante funzionale che abolisce il legame con il nucleotide, la seconda una mutazione patogena che diminuisce l'attività di idrolisi del GTP. Infatti, LRRK2 è attivo quando associato al GTP: una minore capacità di idrolizzare il GTP equivale alla permanenza della proteina nello stato attivato per più tempo. Inoltre, l'attività chinastica potrebbe essere controllata dallo stato di aggregazione di LRRK2, che è mediata dal dominio COR: la variante Y1699C potrebbe diminuire l'attività GTPasica per questo motivo [2, 3].

Tali mutazioni producono perciò lo stesso risultato biochimico, ovvero un enzima più attivo rispetto al *wild-type*.

1.2 TRIM32

TRIM32 è una proteina appartenente alla famiglia TRIM (*TRIPartite Motif family*) dotata di attività E3-ubiquitin-ligasica grazie al dominio RING che la caratterizza. L'attività di E3-ubiquitin ligasi è necessaria durante l'ubiquitinazione, perché permette il riconoscimento del substrato da marcare. Il pattern di ubiquinazione determina il destino del substrato. TRIM32 ha come substrati importanti proteine muscolari e può interagire anche con molecole di RNA, grazie al dominio NHL: come altri membri della famiglia, può regolare l'attività di microRNA [4].

TRIM32 è coinvolta in *pathways* cellulari mediati dall'ubiquitina, fondamentali per le cellule, ed è stata infatti rilevata una sua implicazione nello sviluppo e nel differenziamento cellulare [5].

L'interazione tra LRRK2 e TRIM32 è stata proposta da diversi studi, ma non è chiaro se questa interazione determini la fosforilazione di TRIM32 oppure l'ubiquitinazione di LRRK2. Anche altri membri della famiglia TRIM sono stati studiati come interattori di LRRK2 ed è stato evidenziato l'importante ruolo di TRIM1 nel *turn-over* di LRRK2 [6]. Inoltre, LRRK2 sembra regolare negativamente l'attività di miRNA e mutanti di LRRK2 possono influenzare tale capacità. TRIM32, invece, attiva la repressione trascrizionale mediata da miRNA, quindi antagonizza l'effetto di LRRK2. Studiando la relazione tra le due proteine e i miRNA durante il differenziamento neuronale, dove TRIM32 induce l'attività dei miRNA, è stato evidenziato che LRRK2 mutante inibisce a tal punto la loro attività da ritardare il differenziamento. Questo supporta l'ipotesi che la MP sia legata a una deregolazione del neurosviluppo, dove anche un leggero ritardo causato dall'inibizione di miRNA stravolge la complessa organizzazione del tessuto [5].

Altri risultati riportano però un'aumentata interazione tra LRRK2 mutato e TRIM32 e ciò sembrerebbe in contraddizione con l'attività di antagonista di TRIM32, facendo supporre che un aumento dell'interazione tra le due comporti una

maggior attività antagonista di TRIM32 nei pazienti affetti da MP. È possibile però che l'aumento dell'interazione tra LRRK2 e TRIM32 determini la fosforilazione di quest'ultima: se così fosse, la quantità di TRIM32 libera nel citosol aumenterebbe, perché la forma fosforilata si è vista impedire l'auto-ubiquitinazione quindi TRIM32 fosforilata inibisce la sua stessa degradazione [7].

TRIM32 potrebbe essere coinvolta nella regolazione dello stress ossidativo e dell'apoptosi. Tale regolazione risulta alterata quando TRIM32 è sovraespressa e ciò suggerisce il possibile coinvolgimento della proteina nella morte da stress ossidativo in condizioni fisiopatologiche. TRIM32 sembrerebbe infatti contribuire alla disfunzione mitocondriale, alla conseguente produzione di ROS e all'attivazione delle caspasi nell'apoptosi [8].

Questa proteina potrebbe perciò avere un ruolo nell'aumento dello stress ossidativo e nella disfunzione mitocondriale, caratteristiche della lesione neurodegenerativa nella MP.

2. Scopo del progetto

La patogenesi della MP non è ancora del tutto chiarita. Dagli studi condotti finora, risulta evidente che nel processo neurodegenerativo sia implicato l'enzima LRRK2, di cui sono note varianti patogenetiche. È perciò fondamentale, al fine di chiarire i meccanismi molecolari alla base della malattia, capire come la proteina LRRK2 mutata alteri i *pathways* cellulari in cui è coinvolta. È quindi necessario indagare le interazioni di questa proteina in condizioni fisiologiche e come tali interazioni cambino in presenza di una mutazione del gene *LRRK2*. Studi preliminari svolti nel laboratorio dove ho effettuato il tirocinio hanno rivelato che TRIM32, una E3-ubiquitin ligasi, è un possibile interattore di LRRK2. In particolari, è stato osservato che in assenza di GTP legato, LRRK2 lega con maggiore affinità TRIM32. TRIM32 è coinvolta in numerosi *pathways* cellulari che potrebbero risultare alterati nella MP, pertanto studiare l'interazione tra TRIM32 e LRRK2 nel contesto delle mutazioni patologiche della MP risulta di grande interesse.

Lo scopo di questo progetto è stato quindi quello di validare la possibile interazione tra LRRK2 e TRIM32 al fine anche di valutare l'eventuale alterazione della stessa in presenza di mutanti di LRRK2.

3. Materiali e metodi

3.1 Colture cellulari

La linea cellulare utilizzata in questo progetto è la linea HEK, derivata da tessuto embrionale renale. Le cellule sono state coltivate in fiasca media T-75, utilizzando come mezzo di coltura il terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, ThermoFisher Scientific™) addizionato di FBS (siero bovino fetale, ThermoFisher Scientific™) e antibiotico (penicillina e streptomina, ThermoFisher Scientific™). Raggiunta la confluenza, le cellule sono state lavate con PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, ThermoFisher Scientific™) e staccate attraverso l'azione enzimatica della tripsina (0,1X, ThermoFisher Scientific™). In seguito, le cellule sono state risospese in terreno nuovo, inibendo l'azione della tripsina, e sono state contate in camera di Burker, stabilendo il volume da seminare nei dishes. Sono stati seminati in 4 dishes da 100mm 4 milioni di cellule in 6mL di terreno (DMEM e FBS) e in un dish da 150mm 6 milioni di cellule in 14mL di terreno (DMEM e FBS).

3.2 Trasfezione

Con la trasfezione si ottengono linee cellulari esprimenti la proteina di interesse. In questo caso sono state allestite cinque linee: una linea *wild-type* (WT), trasfettata con un plasmide recante il gene *LRRK2 wild-type* che presenta il tag Flag, e le altre quattro linee in cui il gene è mutato e fuso con tag Flag. Le varianti analizzate sono: G2019S (GS), R1441C (RC), Y1699C (YC) e T1348N (TN). Il plasmide con la mutazione TN è stato trasfettato nelle cellule del dish da 150mm, perché da letteratura è noto che questo mutante fatica ad esprimersi.

Trascorse le 24 ore necessarie affinché le cellule aderiscano alla flask, esse sono state trasfettate con 20µg di DNA nei dishes da 100mm e con 40µg di DNA nel dish da 150mm. La trasfezione è stata eseguita in Opti-MEM™ attraverso l'utilizzo della polietilenimmina (PEI) come agente trasfettante per tre ore, cambiando terreno prima e dopo la procedura. Le mix per la trasfezione sono state preparate separatamente e poi miscelate. Per i dishes da 100mm, sono state preparate le mix con il DNA e il terreno Opti-MEM™ per un totale di 250µL, e la mix con l'agente trasfettante in rapporto 2:1 rispetto al DNA in Opti-MEM™. Il volume totale per ogni dish è di 500µL. Per il dish da 150mm, il volume totale è di 1000µL, di cui 500µL contenenti Opti-MEM™ e DNA, e 500µL contenenti Opti-MEM™ e PEI in rapporto 2:1 rispetto al DNA.

3.3 Lisi

Dopo 48 ore dalla trasfezione, tempo necessario per l'espressione dei costrutti, si è proceduto alla lisi delle cellule. Il terreno è stato rimosso, è stato eseguito un lavaggio in PBS e le cellule sono state lisate con il *lysis buffer* (Tris-HCl, 20mM, pH 7,5; NaCl 150mM; EDTA 1mM; Tween[®] 1%; β-glicerofosfato 1mM; sodio pirofosfato 2,5mM; sodio ortovanadato 1mM; inibitori di proteasi 1%). Dopo aver incubato i lisati in ghiaccio per 30 minuti è stata eseguita una centrifuga a 4°C per altri 30 minuti e conservato il surnatante.

3.4 Immunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione (IP) è una tecnica utilizzata per purificare la proteina di interesse in un campione per affinità: la resina utilizzata è rivestita di anticorpi che riconoscono il tag Flag presente nella proteina di fusione espressa dalle cellule trasfettate. Con questa tecnica è quindi possibile concentrare la proteina che interagisce con gli anticorpi α-Flag; inoltre, grazie all'immunoprecipitazione, è possibile con successive analisi evidenziare la presenza di interattori e l'entità dell'interazione, in quanto gli interattori co-precipitano con la proteina di interesse. Dopo aver equilibrato la resina α-Flag (20μL) con PBS e buffer di lisi essa è stata incubata con il lisato cellulare da cui sono stati precedentemente prelevati 50μL di input. L'immunoprecipitazione è stata condotta in ruota a 4 °C per due ore. Dopo aver rimosso il flow-through (FT), la resina è stata lavata con diversi *washing buffer* a concentrazione salina crescente per eliminare ciò che non ha aderito. I lavaggi sono stati eseguiti incubando la resina con i *washing buffer* dopo averla pellettata tramite centrifugazione (7500g x 2 minuti). Infine, è stato aggiunto il sample buffer (30μL), che, denaturando i campioni, ne consente l'eluizione e la preparazione per l'elettroforesi in gel di poliacrilammide.

3.5 SDS-PAGE

La corsa in gel di poliacrilammide permette la separazione delle proteine denaturate e caricate negativamente dal sodio dodecil solfato in modo proporzionale alla dimensione, applicando una differenza di potenziale. La percentuale di poliacrilammide si può modificare a seconda della grandezza delle proteine da separare. In questo caso, è stato utilizzato un gel di poliacrilammide all'8% dati i pesi molecolari di LRRK2 (270kDa) e TRIM32 (70kDa). Lo *stacking* del gel è costituito da H₂O, Acryl 40%, Tris 0,3M, SDS 10%, APS 10%, TEMED; il *running* del gel è costituito da H₂O, Acryl 40%, Tris 1,5M, SDS 10%, APS 10%, TEMED. La corsa è stata eseguita in Tris-glicina (Tris Base 25mM; glicina 250mM; SDS 0,1%). Sono state eseguite due corse in SDS-PAGE, caricando rispettivamente:

Primo gel	Flow-through	6 μ L + 2 μ L di sample buffer
	Input	6 μ L + 2 μ L di sample buffer
	Marker	3 μ L
Secondo gel	Input	6 μ L + 2 μ L di sample buffer
	IP	20 μ L
	Marker	3 μ L

3.6 Western Blot

Il Western Blot permette di visualizzare le proteine di interesse e determinarne le quantità relative attraverso l'utilizzo di anticorpi specifici.

Al termine della corsa elettroforetica, è stato eseguito il trasferimento su membrane di polivinilidenefluoruro (PVDF) attivate in metanolo e lavate in TBS-T (*Tris Buffered Saline with Tween*[®]). Il trasferimento *semi-dry* è stato eseguito con il sistema Trans-Blot[®] Turbo (Bio-Rad) utilizzando il Transfer Buffer (5X Transfer Buffer Bio-Rad, 20% etanolo in dH₂O) e il programma *High Molecular Weight* per venti minuti. Dopo il trasferimento, le membrane sono state lavate in TBS-T e incubate per un'ora in latte diluito al 5% in TBS-T per saturare i siti di ibridazione aspecifica. Dopo altri tre lavaggi, le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario α -TRIM32 (1:500, Proteintech, 10326-1-AP) a 4 °C overnight e con l'anticorpo α -Flag M2-HRP (1:50000, Sigma-Aldrich, A8592) a temperatura ambiente per un'ora per visualizzare LRRK2. A differenza del secondo anticorpo, il primo non è coniugato alla perossidasi di rafano, quindi, è necessaria una seconda incubazione con anticorpo secondario α -rabbit IgG-HRP (1:16000, Sigma-Aldrich, A9169), dato che l'anticorpo primario che riconosce TRIM32 è prodotto in coniglio. Dopo l'incubazione con gli anticorpi, le membrane sono state lavate 10 minuti in TBS-T a temperatura ambiente e in agitazione, e successivamente sono state osservate allo strumento VMR[®] (Imager CHEMI Premium Bio-Rad) utilizzando il reagente Immobilon[®] Enhanced Chemiluminescence (ECL) per rilevare il segnale relativo alle proteine di interesse.

3.7 Immunofluorescenza in rene di topo

Per valutare le differenze di espressione degli interattori di LRRK2 in presenza della mutazione TN sono stati utilizzati reni di topo, in quanto è nota l'elevata espressione della proteina in questa sede. Nello specifico sono stati prelevati i reni di tre topi *wild-type* e tre topi *knock-in* che presentano la mutazione TN, sacrificati a 12 mesi. Il tessuto è stato incluso in resina OCT (kaltek), congelato e tagliato al criostato, ottenendo sezioni di circa 30 μ m. Le sezioni sono state depositate su

vetrini carichi positivamente, dato che il tessuto presenta cariche negative. I vetrini vengono conservati a -20 °C fino all'ibridazione con gli anticorpi. Prima dell'ibridazione, si procede al lavaggio in PBS, poi al passaggio in soluzione di *quenching* (50mM NH₄Cl) per 10 minuti per abbassare la fluorescenza endogena del campione; i campioni sono quindi incubati con la *blocking solution* (BSA 2%, goat serum 15%, gelatina 0,25%, glicina 0,2%, Triton 0,5%) per almeno un'ora. Questo passaggio è necessario a rendere il campione più permeabile agli anticorpi e a saturare i siti di ibridazione aspecifici.

Tra gli interattori analizzati, è stato evidenziato anche TRIM32. L'anticorpo primario α -TRIM32 viene lasciato ibridare *overnight* in *blocking solution* (1:200), poi si procede ai lavaggi e all'ibridazione con l'anticorpo secondario α -rabbit Alexa Fluor 568 (1:200, Invitrogen). Infine, si tratta il campione con DAPI (1:10000, Hoechst 33258, Invitrogen) per dieci minuti, un intercalante fluorescente nel blu, necessario a visualizzare i nuclei.

Le immagini dei tessuti sono state ottenute al microscopio confocale, eccitando i diversi fluorofori alla lunghezza d'onda corrispondente ed utilizzando l'ingrandimento 63x.

4. Risultati

4.1 Western Blot

L'interazione tra LRRK2 e TRIM32 è stata evidenziata tramite un'analisi di co-immunoprecipitazione e Western Blot. LRRK2 presenta il tag Flag in ogni costrutto, dunque è stato possibile immunoprecipitare la proteina in ciascun lisato utilizzando una resina rivestita di anticorpi α -Flag. Se TRIM32 fosse un interattore di LRRK2 allora co-precipiterebbe con quest'ultimo, quindi sarebbe evidenziabile con l'analisi di Western Blot in seguito all'immunoprecipitazione. Le membrane sono state sviluppate con Immobilon[®] forte. Osservando i lisati proteici (input) (Figura 3, Figura 4) si nota che LRRK2 è presente in tutti i campioni, tranne che nel mutante TN. Tuttavia, risulta visibile nell'immunoprecipitazione (Figura 4) facendo supporre che il costrutto si sia espresso poco con la trasfezione. A differenza del mutante TN, il mutante GS è rilevabile nell'input, ma rispetto agli altri mutanti è meno visibile in seguito a immunoprecipitazione; dunque, si può ipotizzare che si sia espresso meno.

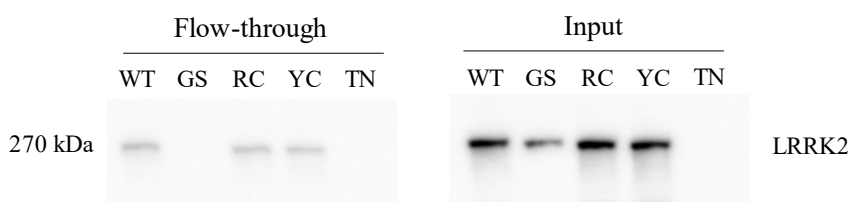


Figura 3: Western Blot che mostra la presenza di LRRK2 in flow-through e input; i mutanti TN e GS si sono espressi meno, oppure la raccolta e la lisi cellulare non sono state efficienti.



Figura 4: Western Blot che evidenzia l'avvenuta immunoprecipitazione di LRRK2; inoltre, si conferma la presenza del mutante TN. Le bande dei campioni IP non sono quantificabili, in quanto il segnale rilevato è fuori scala.

Purtroppo, lo sviluppo delle membrane con Immobilon[®] forte le ha alterate (Figura 4), probabilmente perché il campione caricato era troppo concentrato e si è verificata una saturazione del segnale, ottenendo delle bande non quantificabili. Si è perciò deciso di lavare la membrana con TBS-T e incubarla nuovamente, diluendo però la soluzione contenente gli anticorpi e sviluppando con Immobilon[®], in modo

da ottenere un segnale quantificabile (Figura 5). Con questa diluizione, i mutanti GS e TN non vengono evidenziati, quindi sono stati quantificati WT, RC, YC.

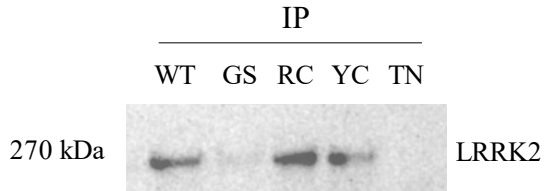


Figura 5: le bande corrispondenti a LRRK2 sono ora quantificabili, perché diminuendo la concentrazione dell'anticorpo e sviluppando con Immobilon® si è abbassato il segnale rilevabile. In queste condizioni non sono però visibili i mutanti GS e TN.

L'analisi di Western Blot ha mostrato la presenza di TRIM32 confermando l'ipotesi che questa proteina sia un interattore di LRRK2. TRIM32 appare infatti visibile soprattutto in seguito a immunoprecipitazione: ciò significa che TRIM32, interagendo con LRRK2, è stato concentrato durante la purificazione per affinità per LRRK2 (Figura 6, Figura 7). Inoltre, nonostante LRRK2 mutante per GS e TN sia poco presente nell'immunoprecipitazione, TRIM32 nelle due *lanes* corrispondenti risulta ben visibile e ciò fa supporre un'aumentata capacità di interazione tra questi due mutanti e TRIM32 rispetto a LRRK2 *wild-type*.

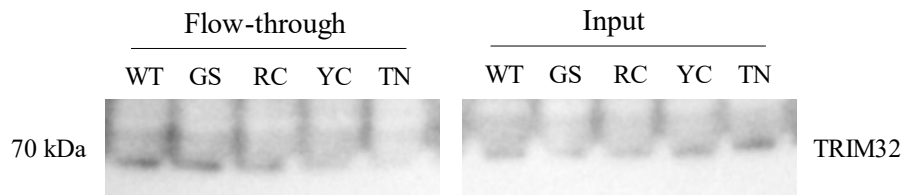


Figura 6: Western Blot che mostra la presenza di TRIM32 in Flow-through e Input

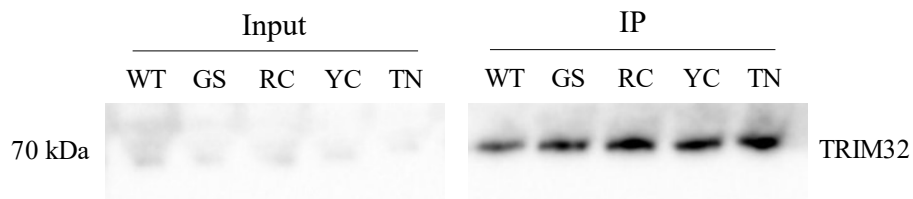


Figura 7: Western Blot con cui si evidenzia la presenza di TRIM32 in seguito all'immunoprecipitazione di LRRK2, validando l'ipotesi che TRIM32 sia un interattore di quest'ultimo.

4.2 Quantificazione

Tramite il software ImageJ, sono state quantificate le bande ottenute in Western Blot, per valutare l'entità dell'interazione tra le due proteine; questa si può analizzare confrontando i rapporti tra l'intensità della banda di TRIM32 e l'intensità della banda di LRRK2 con la mutazione corrispondente.

Nella tabella vengono riportati i risultati della quantificazione:

	TRIM32	LRRK2	Ratio
WT	4039,4	19423,3	0,21
GS	10259,4		
RC	15382,5	24844,5	0,62
YC	13029,6	14396,4	0,91
TN	15869,3		

Il rapporto tra le aree dei picchi corrispondenti all'intensità delle bande (*Ratio*) è stato calcolato come $TRIM32/LRRK2$ e, nel nostro caso, fornisce un'indicazione di quanto interagiscano le proteine di interesse. Secondo i risultati ottenuti, la quantità di TRIM32 che si lega a LRRK2 aumenta quando questa è mutata, come si può evincere anche dal grafico (Figura 8). Nonostante l'intensità delle bande corrispondenti ai mutanti GS e TN non risultino quantificabili, è comunque possibile supporre che, in presenza di tali mutazioni, LRRK2 interagisca con TRIM32 in misura maggiore rispetto al *wild-type*, in quanto l'intensità della banda di TRIM32 è paragonabile a quella degli altri mutanti, suggerendo che TRIM32 sia co-precipitata efficientemente con LRRK2 mutata.

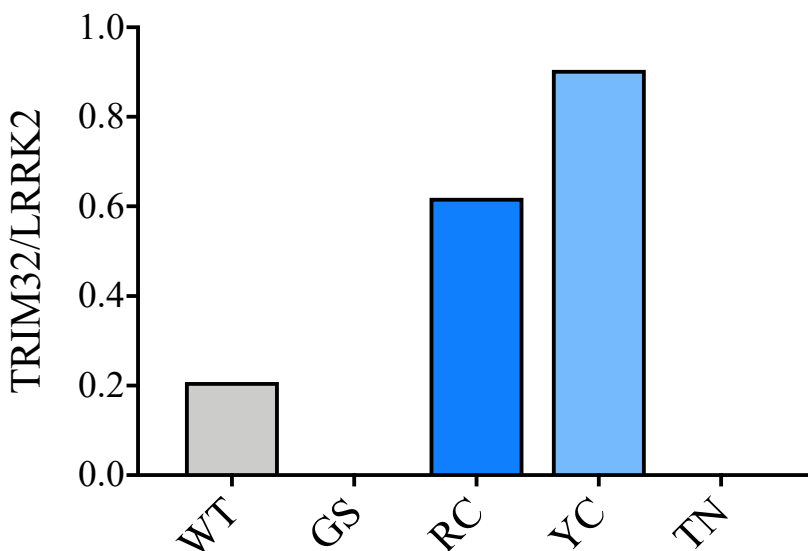


Figura 8: risultato della quantificazione; dal rapporto tra le aree si può notare come i mutanti RC e YC interagiscano con TRIM32 di più rispetto al *wild-type*.

Questa maggior interazione è in linea con i risultati preliminari di immunoprecipitazione di 3xFlag-LRRK2 (WT e TN) accoppiata a spettrometria di massa effettuati precedentemente in laboratorio (Figura 9).

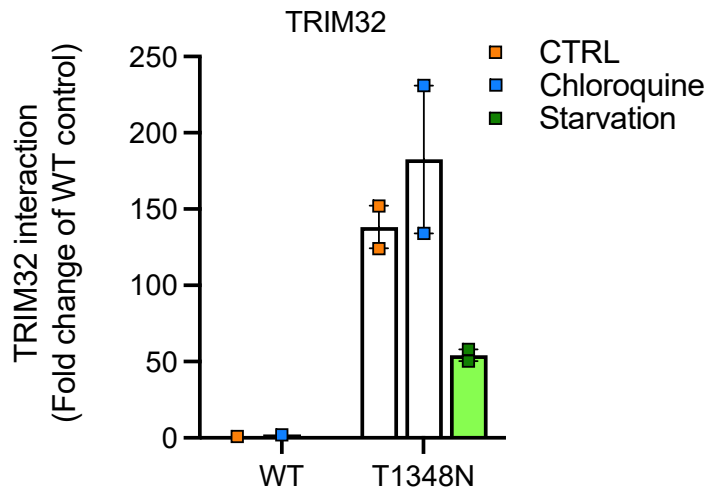
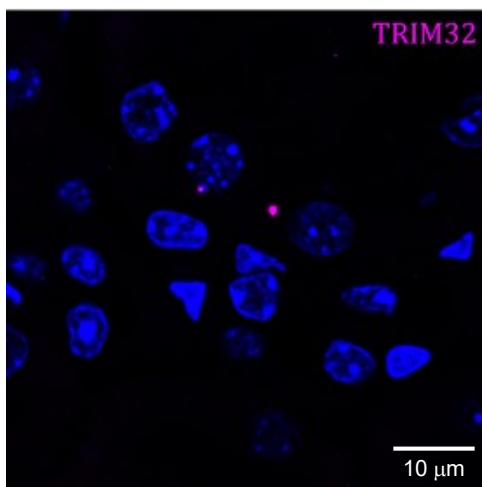


Figura 9: In cellule HEK293T la quantità di TRIM32 endogena legata a LRRK2 aumenta in presenza di mutazione T1348N che abolisce il legame con il GTP (n=2 esperimenti di spettrometria di massa per condizione. Cloroquina e starvation sono stati utilizzati per valutare il possibile effetto del blocco o aumento dell'autofagia nell'interazione tra LRRK2 e TRIM32.

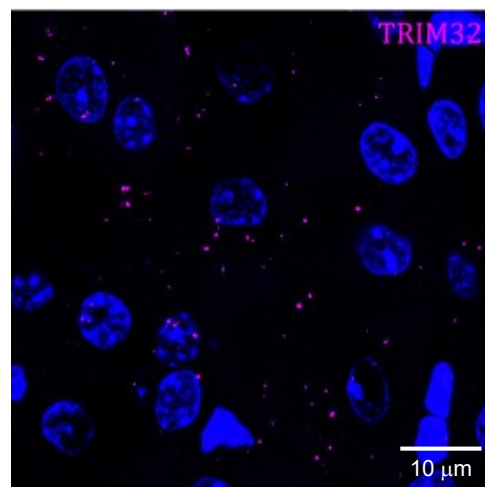
4.3 Immagini al microscopio confocale

Le immagini ottenute al microscopio confocale mostrano le differenze nell'espressione di TRIM32 tra tessuto renale di tre topi LRRK2-WT e tre topi LRRK2-TN (Figura 10). Confrontando i diversi tessuti raccolti, si osserva una differenza nella presenza di TRIM32, che possiamo supporre essere dovuta all'interazione con LRRK2 che è aumentata quando presenta la mutazione TN.

TOPI LRRK2-WT



TOPI LRRK2-TN



TOPI LRRK2-WT

TOPI LRRK2-TN

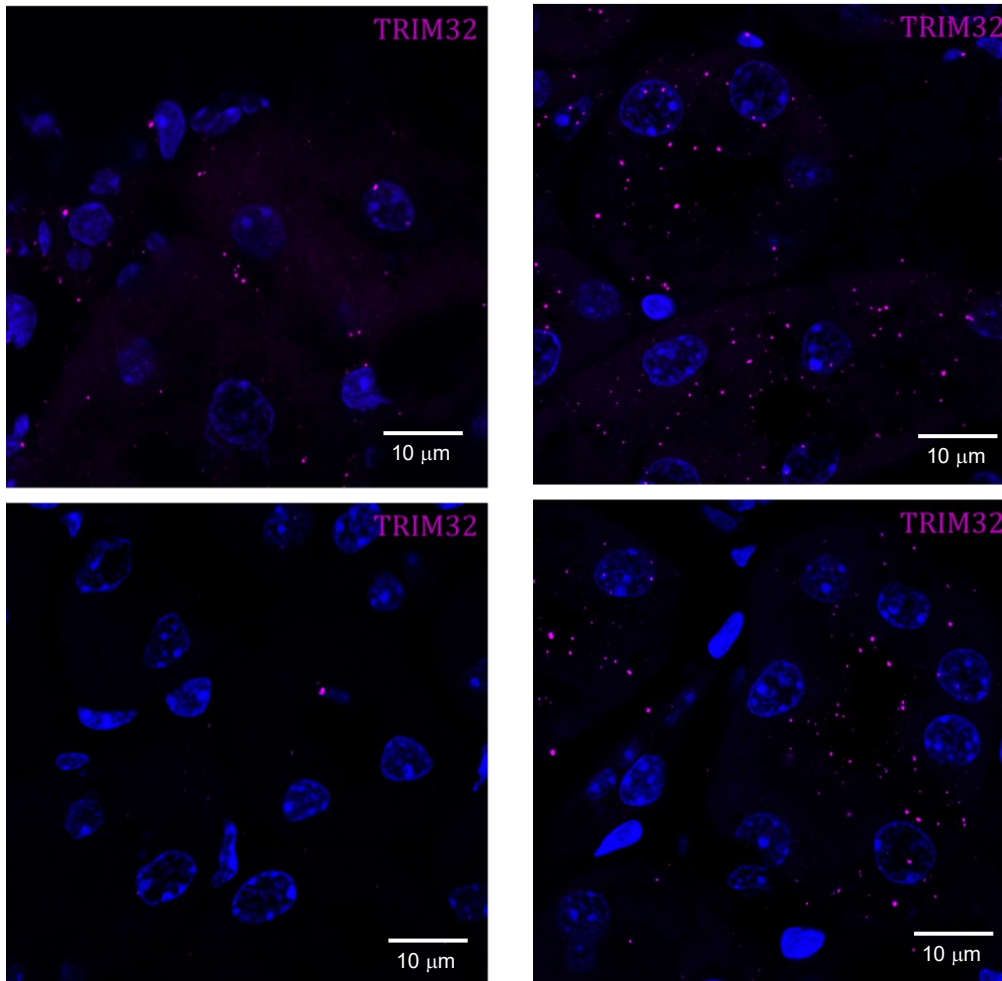


Figura 10: TRIM32 presenta un'espressione più elevata nel tessuto renale dei topi portatori della mutazione TN. Immagini di immunofluorescenza di tessuto renale marcato con TRIM32 (in magenta). Dal confronto tra topi LRRK2-WT (colonna di sinistra) e LRRK2-TN (colonna di destra) emerge come l'espressione della proteina sia maggiore in presenza della mutazione. Ogni immagine è rappresentativa di un topo (n=3 topi per genotipo).

5. Discussione e conclusioni

L'obiettivo di questo progetto è stato quello di validare l'interazione tra le proteine LRRK2, nota per avere un ruolo nella patogenesi della MP, e TRIM32, implicata in numerosi *pathways* cellulari e nel *signaling* mediato dall'ubiquitina. Data l'importanza della componente genetica nella MP, risulta fondamentale approfondire i ruoli delle proteine coinvolte e le interazioni che le caratterizzano.

LRRK2, in particolare, ha assunto notevole importanza negli ultimi anni, in quanto varianti *gain of function* risultano patogeniche ed è stata perciò proposta come target terapeutico. Non è ancora del tutto definito il ruolo che essa svolge nella cellula, ma essendo dotata di attività chinasi-GTPasica è coinvolta nel *signaling* cellulare. Sulla base di queste considerazioni è importante capire quali siano gli interattori di LRRK2 e in che modo possano essere coinvolti nella patogenesi.

Per questo motivo, si sono ottenute delle linee cellulari esprimenti LRRK2-Flag *wild-type* e mutante e, in seguito a lisi, è stata immunoprecipitata LRRK2 con resina α -Flag. Se TRIM32 fosse un interattore di LRRK2, precipiterebbe assieme a quest'ultimo; quindi, il risultato dell'IP è stato evidenziato in Western Blot con anticorpi α -Flag e α -TRIM32.

La presenza di TRIM32 è rilevabile in seguito a IP e ciò valida l'ipotesi che TRIM32 sia un interattore di LRRK2. Inoltre, è stata verificata la presenza di TRIM32 anche nelle linee cellulari esprimenti LRRK2 mutante e si è quantificata l'entità dell'interazione tra le due proteine. Nonostante non tutte le bande del Western Blot fossero quantificabili, i risultati mostrano che TRIM32 interagisce in misura maggiore con LRRK2 quando questa è mutata. Dalla quantificazione si nota infatti un rapporto TRIM32/LRRK2 maggiore con i mutanti rispetto al *wild-type*. Anche per quanto riguarda i mutanti TN e GS che non sono stati quantificati, si può supporre che l'interazione sia maggiore, perché nonostante LRRK2 mutato non sia visibile con le condizioni di *blotting* utilizzate, TRIM32 è rilevabile e la banda ha intensità comparabile a quella nelle altre *lanes*.

Queste considerazioni fanno sospettare che TRIM32 abbia un ruolo nell'insorgenza della MP e studi successivi potranno indagare se e come TRIM32 contribuisca alla patogenesi o alla progressione della malattia. Attualmente due ipotesi vedono coinvolta TRIM32. La prima ipotesi è quella che, attraverso la regolazione di miRNA, TRIM32 e LRRK2 si contrastino e se LRRK2 è mutata, l'equilibrio in questa relazione propende verso l'inibizione dell'attività dei miRNA da parte di LRRK2 [5]. La seconda ipotesi invece si basa sull'interazione diretta tra le due proteine che, in questa sede, è stata confermata e che potrebbe comportare un maggiore tasso di ubiquitinazione di LRRK2 o di fosforilazione di TRIM32. In particolare, se LRRK2 fosse responsabile della fosforilazione di TRIM32, questa modificazione post-traduzionale sarebbe favorita in presenza di mutanti di LRRK2,

in quanto più attivi e più propensi a interagire con TRIM32. TRIM32 fosforilato impedisce la sua auto-ubiquitinazione. È dunque possibile che si verifichi un aumento della quantità di TRIM32 libera nel citosol. La sovraespressione di TRIM32 è stata studiata e ha evidenziato un aumento dello stress ossidativo e della disfunzione mitocondriale che possono condurre alla morte cellulare [8].

Un aumento della quantità di TRIM32 attiva nel citosol potrebbe quindi mimare gli effetti tossici della sua sovraespressione, aggravando lo stato di stress cellulare a cui i neuroni della *substantia nigra* sono sottoposti durante la neurodegenerazione e contribuendo alla progressione della lesione tissutale nella MP.

Sembra inoltre che l'assenza di GTP (mutante TN) o una sua idrolisi compromessa (mutanti RC e YC) portino ad un aumento di questa interazione. Una possibilità è che questa alterazione a livello del dominio GTPasico inneschi una maggior ubiquitinazione di LRRK2, ipotesi che dovrà essere testata sperimentalmente in studi futuri.

Bibliografia

1. Poewe, W. *et al.* Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17013 (2017)
2. Iannotta, L. & Greggio, E. LRRK2 signaling in neurodegeneration: two decades of progress. *Essays in Biochemistry* 65, 859–872 (2021)
3. Cookson, M. R. LRRK2 Pathways Leading to Neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 15, 42 (2015)
4. Lazzari, E. & Meroni, G. TRIM32 ubiquitin E3 ligase, one enzyme for several pathologies: From muscular dystrophy to tumours. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 79, 469–477 (2016)
5. Gonzalez-Cano, L., Menzl, I., Tisserand, J., Nicklas, S. & Schwamborn, J. C. Parkinson's Disease-Associated Mutant LRRK2-Mediated Inhibition of miRNA Activity is Antagonized by TRIM32. *Mol Neurobiol* 55, 3490–3498 (2018)
6. Stormo, A. E. D. *et al.* The E3 ligase TRIM1 ubiquitinates LRRK2 and controls its localization, degradation, and toxicity. *Journal of Cell Biology* 221, e202010065 (2022)
7. Ichimura T, Taoka M, Shoji I, *et al.* 14-3-3 proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitylation and cytoplasmic body formation. *J Cell Sci.* 126 (Pt 9): 2014-2026 (2013)
8. Prajapati, P. *et al.* TRIM32 regulates mitochondrial mediated ROS levels and sensitizes the oxidative stress induced cell death. *Cellular Signalling* 76, 109777 (2020)