UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Evoluzionistica

Una nuova interazione tra LRRK2 e Drebrin nella modulazione del citoscheletro di actina.

Relatore: Prof. **Elisa Greggio**
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Ph.D. **Giulia Tombesi**
Dipartimento di Biologia

Laureanda: ***Noemi Santoro***

ANNO ACCADEMICO: 2021/2022

Abstract VI

1. Introduzione 1

1.1. Fisiologia ed evoluzione delle sinapsi 1

1.1.1. Fisiologia della sinapsi 1

1.1.2. Spine dendritiche 3

1.1.3. Evoluzione sinaptica 4

1.2. Malattia di Parkinson 6

1.2.1. Circuiti deregolati nel PD 8

1.2.2. Malattia di Parkinson sporadica e familiare 9

1.2.3. Degenerazione assonale nella malattia di Parkinson 10

1.3. Leucine-rich repeat kinase 2 12

1.3.1. Struttura di LRRK2 12

1.3.2. Distribuzione tissutale e subcellulare di LRRK2 13

1.3.3. Interattori di LRRK2 15

1.3.4. Funzioni di LRRK2 17

1.3.5. Aspetti evolutivi di LRRK2 19

1.4. Drebrin 22

1.4.1. DBN1 Struttura e isoforme 22

1.4.2. DBN1: Funzione ed espressione 25

1.4.3. DBN1 conservazione filogenetica 28

2. Scopo dello studio 29

3. Materiali e metodi 34

3.1. Costrutti 34

3.1.1. Amplificazione dei plasmidi 36

3.2. Colture cellulari 39

3.2.1. Cellule HEK293T 39

3.2.2. Cellule SH-SY5Y 39

3.2.3. Trasfezione 40

3.3. Purificazione di proteine 41

3.3.1. Lisi e quantificazione della proteine 41

3.3.2. Immunoprecipitazione 41

3.3.3. Elettroforesi su gel (SDS-PAGE) e immunoblotting quantitativo 42

3.4. Immunocitochimica 43

3.5. Analisi filogenetiche 44
3.6. Analisi statistiche 45
4. Risultati 45
4.1. Preparazione e validazione del DNA plasmidico 45
4.2. Drebrin potrebbe interagire con il dominio enzimatico di LRRK2 47
4.3. LRRK2 interagisce con il dominio N-Terminale di Drebrin 50
4.4. Legame competitivo di Drebrin per la F-actina con LRRK2 52
4.5. LRRK2 è coinvolta nella crescita dei neuriti attraverso l'interazione con Drebrin 53
4.6. Analisi filogenetica di Drebrin 56
5. Discussione e conclusione 58
Bibliografia 61

Lista delle abbreviazioni

Acb	Nucleo accumbens
AD	Malattia di Alzheimer
ADF-H	Dominio dell'omologia del fattore depolarizzante l'actina
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANK	Regione Ankyrin-like
AR	Ereditarietà autosomica recessive
ARM	Regione Armadillo
BCA	Acido bicinchoninico
BDNF	Fattore neurotrofico cerebrale
BG	Gangli alla base
BSA	Sieroalbumina bovina
CARB	Carbenicillina
CDS	Sequenze codificanti
CN	Nucleo caudate
CO-IP	Coimmunoprecipitazione
COR	C-terminale di ROC
DBN1	Gene di Drebrin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DRD1	Recettore della dopamina sottotipo 1
DRD2	Recettore della dopamina sottotipo 2
EGF	Fattore di crescita epidermico
ENK	Neuropeptide encefalina

F12	Ham’s F-12 Nutrient Mixture
FBS	Siero di bovino fetale
GABA	Acido γ-aminobutirrico
GFP	Proteina verde fluorescente
GMFs	Fattori di maturazione della glia
GO	Gene ontology
GPe	Segmento esterno del globo pallidum
GPi	Segmento interno del globo pallidum
HMW	Alto peso molecolare
HRP	Perossidasi di rafano
ICC	Immunocitochimica
IP	Immunoprecipitazione
KAN	Kanamicina
KO	Knockout
LRR	Leucine-rich repeat
LRRK1	Leucine-rich repeat kinase 1
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
ML	Maximum Likelihood
MP	Massima Parsimonia
MS	Spettrometria di massa
MSN	Neuroni a proiezione spinosa
MT	Microtubuli
NJ	Neighbor Joining
NMDA	Recettore N-metil-d-aspartato
NSF	N-etilmaleimide

PD	Malattia di Parkinson
PFA	Paraformaldeide
PKA	Protein chinasi A
PSD	Densità postsinaptica
PSP	Potenziale postsinaptico
Put	Putamen
PVDF	Polivinilidifluoruro
RA	Acido retinoico
ROC	Ras of Complex
RT	Temperatura ambiente
SDS-PAGE	Sodio dodecil solfato e policrilammide
SEM	Errore standard della media
SNC	Sistema nervoso centrale
SNCA	Gene dell'α-sinucleina
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulate
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression medium
SV	Vescicole sinaitiche
TBST	Tris-Buffered Saline with Tween® 20 buffer
WT	Wild tipe

Abstract

Le mutazioni nella proteina leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) sono comunemente implicate nella patogenesi della malattia di Parkinson (PD). Nel corso degli anni, diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di un'associazione fisica e funzionale tra LRRK2 ed alcune proteine associate al citoscheletro.

I principali componenti del citoscheletro, actina e microtubuli, tramite una delicata interazione, contribuiscono allo sviluppo e al mantenimento del sistema nervoso; non a caso l'assemblaggio di elementi citoscheletrici anormali è annoverata tra i fattori implicati nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, come ad esempio il PD. In linea con quanto riportato in letteratura, dati preliminari prodotti nel nostro laboratorio hanno mostrato come LRRK2 interagisca con proteine coinvolte nella dinamica del citoscheletro di actina. Molto interessante è che questa interazione riguarda soprattutto proteine postsinaptiche. Una delle interazioni più significative è quella con Drebrin, una delle principali proteine leganti l'actina a livello postsinaptico, caratterizzata da una localizzazione prevalentemente dendritica, il cui ruolo è quella di organizzare e stabilizzare la F-actina regolando così la plasticità e la funzione delle spine. La modalità con cui LRRK2 e Drebrin interagiscono e come questo legame sia regolato è ad oggi sconosciuto. In questo lavoro di tesi abbiamo dunque caratterizzato più in dettaglio questa interazione tramite l'utilizzo di saggi di immunoprecipitazione *in vitro*. I nostri risultati hanno dimostrato che LRRK2 compete con l'actina nel legame con Drebrin attraverso l'interazione tra il suo core enzimatico e la porzione N-terminale di Drebrin. Abbiamo inoltre ricostruito la storia evolutiva di Drebrin attraverso analisi filogenetiche.

1. Introduzione

1.1. Fisiologia ed evoluzione delle sinapsi

Il cervello umano è considerato eccezionale nella sua struttura complessa. Una delle caratteristiche che distingue gli esseri umani dalle altre specie esistenti è la capacità cognitiva (Herculano-Houzel, 2009), quindi la combinazione di capacità mentali uniche, combinate con un'intelligenza più elevata (André M.M.Sousa, 2017). L'origine delle variazioni delle capacità cognitive è stata a lungo ricercata nelle dimensioni del corpo e del cervello, tuttavia gli esseri umani non hanno il sistema nervoso più grande in natura. Pertanto le nostre abilità mentali probabilmente derivano da altre caratteristiche, inclusa l'espansione selettiva di specifiche regioni cerebrali e cambiamenti nel numero di neuroni, nonché nelle loro proprietà strutturali e funzionali. Secondo una nuova visione, infatti, l'origine di questa maggiore complessità è centrata sui neuroni (P. Kartik, 2020).

1.1.1. Fisiologia della sinapsi

I neuroni costituiscono i "mattoni" del nostro sistema nervoso essendo fondamentali per l'elaborazione e il trasporto delle informazioni nel cervello (P. Burkhardt, 2015). Si tratta di cellule elettricamente eccitabili, quindi capaci di reagire a stimoli esterni o interni producendo risposte sotto forma di potenziali elettrotonici o d'azione. Essi formano una rete complessa di connessioni, definite sinapsi, costituite da uno stretto contatto tra la terminazione assonica di un neurone e i dendriti o il corpo cellulare di un altro neurone. Le sinapsi sono elementi molto plastici che si rimodellano continuamente attraverso un processo chiamato plasticità sinaptica. Queste modifiche, che possono essere di diversa natura (morfologica, biochimica, molecolare e genetica) risultano fondamentali durante lo sviluppo dell'organismo, oltre che nel processo di apprendimento e memoria, ma anche nel recupero dopo un danno cerebrale risultando così essenziali per il corretto funzionamento dei circuiti cerebrali. Il loro danneggiamento può compromettere l'organizzazione del sistema nervoso e il corretto trasferimento delle informazioni, portando alla possibile insorgenza di patologie.

Riguardo la morfologia, le sinapsi sono formate da un elemento presinaptico dal quale provengono i segnali, uno spazio intersinaptico e un elemento postsinaptico al quale vengono trasmessi i segnali.

Da un punto di vista funzionale, sulla base del tipo di trasmissione, le sinapsi vengono distinte in 1) **sinapsi elettriche** (Figura 1, A), dove la trasmissione avviene attraverso un flusso ionico identico a quello deputato alla conduzione dell'impulso lungo la fibra nervosa, e 2) **sinapsi chimiche**, nelle quali la trasmissione del segnale è mediata da molecole, dette **neurotrasmettitori,** rilasciate dalle terminazioni presinaptiche. Nelle sinapsi elettriche le membrane

sono collegate attraverso una particolare struttura definita *gap junction*, che permette il passaggio degli ioni dalla cellula presinaptica a quella postsinaptica. Queste giunzioni sono costituite da coppie di canali perfettamente allineati, i **connessoni**, presenti sia nel neurone presinaptico sia nel neurone post sinaptico e di dimensioni tali da permettere il passaggio di ioni e molecole a basso peso molecolare. Questo tipo di trasmissione riduce notevolmente le resistenze offerte dalle membrane, permettendo una trasmissione del segnale ad elevata velocità ma senza amplificazione o specificità. Le sinapsi elettriche sono inoltre eccitatorie e bidirezionali, ovvero in grado di trasmettere con la stessa efficienza segnali depolarizzanti da una cellula all'altra e viceversa; sono molto diffuse negli invertebrati, mentre tendono a scomparire all'aumentare della complessità degli organismi. Nei vertebrati infatti la trasmissione sinaptica avviene prevalentemente attraverso sinapsi chimiche (Figura 1, B), ovvero si basa sul rilascio di un neurotrasmettitore che può attivare o inibire l'elemento postsinaptico. In questo tipo di sinapsi lo spazio tra i neuroni presinaptici e postsinaptici, detto fessura sinaptica, è maggiore rispetto a quello di una sinapsi elettrica. La caratteristica principale dell'elemento presinaptico, oltre all'elevato numero di mitocondri, è la presenza di vescicole sinaptiche (SV), piccoli organelli all'interno della terminazione sinaptica contenenti i neurotrasmettitori. Quando un potenziale d'azione raggiunge la terminazione del neurone presinaptico, si verifica una depolarizzazione della membrana che innesca un afflusso di ioni Ca^{2+} attraverso canali ionici voltaggio-dipendenti nella terminazione presinaptica con conseguente fusione delle SV con la membrana plasmatica del neurone presinaptico. Questa fusione determina il rilascio dei neurotrasmettitori nella fessura sinaptica. Essi diffondono e si legano a specifici recettori posti sulla membrana del neurone postsinaptico: **i recettori post-sinaptici**. Il legame causa l'apertura o la chiusura di canali nella membrana postsinaptica, inducendo un flusso di corrente che modifica il potenziale di membrana generando un potenziale postsinaptico (PSP) la cui ampiezza è proporzionale alla quantità di neurotrasmettitori rilasciati. Rispetto alle sinapsi elettriche, le sinapsi chimiche mostrano caratteristiche differenti: sono unidirezionali e più lente, inoltre la risposta non è di tipo" tutto o nulla", ma è graduata.

Una connessione sinaptica può essere stabilita tra due neuroni o tra un neurone e una cellula non neuronale come le cellule muscolari. Nelle sinapsi inter-neuronali l'elemento presinaptico è più frequentemente costituito dall'assone. I terminali assonali danno origine a diversi tipi di sinapsi in base alle connessioni che formano con l'elemento postsinaptico il quale può essere di varia natura: dendrite (sinapsi asso-dendritica), soma (sinapsi asso-somatica) o assone (sinapsi asso-assonica) (C. Hammond, 2015).

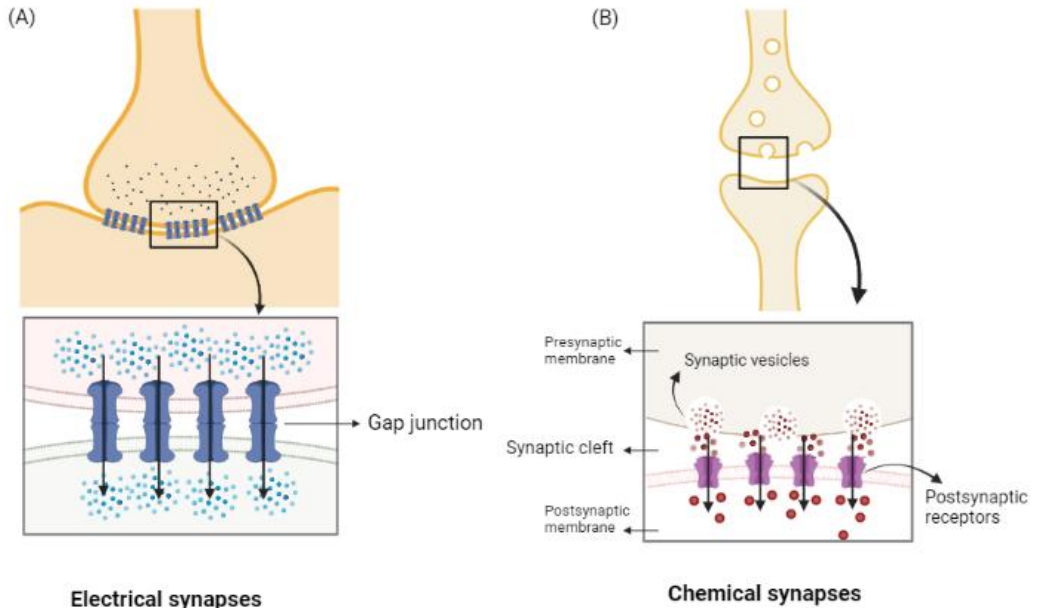


Figura 1 ***Immagine delle sinapsi elettriche e chimiche: (*A) Rappresentazione schematica delle sinapsi elettriche in cui avviene il rilascio di sostanze chimiche. Le membrane sono collegate da *gap junctions*, costituite da coppie di canali allineati, i connessoni. Le sinapsi elettriche sono più veloci e bidizionali. **(B)** Rappresentazione schematica delle sinapsi chimiche in cui il rilascio di neurotrasmettitori avviene in seguito alla fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana presinaptica. I neurotrasmettitori vengono rilasciati nella fessura sinaptica legandosi poi a specifici recettori postsinaptici. Le sinapsi chimiche sono più lente e unidirezionali **(Creato con BioRender)**.

1.1.2. Spine dendritiche

A livello dei processi dendritici, che ricevono l'impulso nervoso dal neurone presinaptico, sono localizzate delle piccole estroflessioni postsinaptiche chiamate spine dendritiche. Queste rappresentano i siti in cui avviene la trasmissione sinaptica eccitatoria e dove il signaling è opportunamente compartimentalizzato. Il principale componente strutturale delle spine dendritiche è costituito dai filamenti di actina. L'actina permette cambiamenti conformazionali e morfologici, conferendo plasticità alle spine dendritiche. Da un punto di vista morfologico esse si presentano in un'ampia varietà di forme, suddivise in quattro classi distinte: le spine "sottili" (*thin spines and filopodia*) che possiedono una testa piccola e un collo stretto e sono anche le meno stabili; le spine "tozze" o sessili sono caratterizzate dalla mancanza di una chiara costrizione tra la testa e il collo (*stubby spines*); le spine "a fungo" sono caratterizzate da un collo stretto e da una testa larga e costituiscono la classe più stabile di spine (*mushroom spines*); le spine "ramificate" o a coppa presentano due teste attaccate a un unico collo stretto (*branched or cup shape spines*) (Figura 2). In realtà le spine sono strutture estremamente dinamiche, quindi la classificazione delle diverse forme rappresenta un concetto statico che non rispecchia la loro vera natura. Le spine possono cambiare la loro forma nelle diverse categorie, consentendo, in modo altamente

regolato, il rimodellamento della testa a seconda delle diverse fasi vitali delle spine dendritiche stesse. Più grande risulta la testa dendritica, più forte sarà il contatto sinaptico e la spina in questo caso verrà definita "matura". La distribuzione di queste strutture varia tra le diverse regioni cerebrali e i diversi tipi di neuroni, rendendo difficile una quantificazione accurata. È interessante notare che queste strutture raramente si presentano in organismi più semplici, come la *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, suggerendo che le spine dendritiche si siano evolute per far fronte allo sviluppo e all'elaborazione di sistemi nervosi più complessi (H.Hering, 2001).

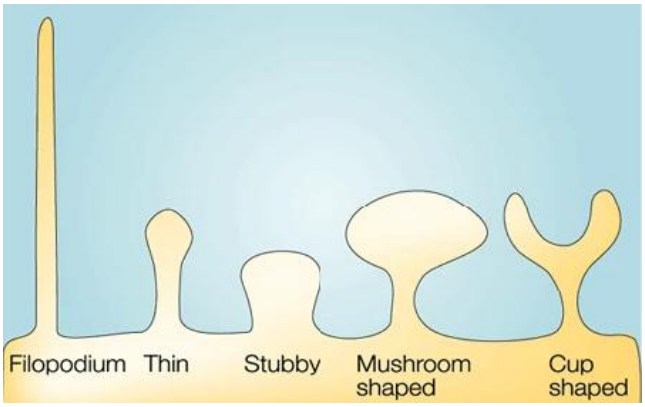


Figura 2 ***Classificazione morfologica delle spine dendritiche***: illustrazione tratta da **(H.Hering, 2001)**. Le spine "sottili" possiedono una testa piccola e un collo stretto; le spine "tozze" o sessili sono caratterizzate dalla mancanza di una chiara costrizione tra la testa e il collo; le spine "a fungo" sono caratterizzate da un collo stretto e una testa larga; le spine "ramificate" o a coppa hanno due teste attaccate a un unico collo stretto.

1.1.3. Evoluzione sinaptica

Studiare l'evoluzione della complessità dei sistemi molecolari sinaptici permette di comprendere la funzione del cervello, infatti l'evoluzione della struttura e della composizione delle sinapsi fornisce un percorso per arrivare alla comprensione unificata della biologia delle sinapsi (R. Emes, 2012). Purtroppo vi è una scarsità di studi sull'evoluzione delle sinapsi, probabilmente perché fino a pochi anni fa le analisi microscopiche ed elettrofisiche erano difficili da ottenere e confrontare tra le specie. L'anno 2000 però è stato un punto di svolta grazie alla combinazione di **proteomica e genomica delle sinapsi**, che è stata al centro dei primi studi sistematici sull'evoluzione delle sinapsi. Si è visto che le principali classi di proteine delle sinapsi si sono evolute nei procarioti e negli eucarioti prima dell'origine dei neuroni nei metazoi (R. Emes, 2012). Sembra quindi che l'evoluzione e l'organizzazione dei proteomi delle sinapsi siano alla base delle origini dei sistemi nervosi e del comportamento. L'origine dei circuiti neuronali risale a circa 600 milioni di anni fa negli Ctenophora e Cnidari (R. Lichtneckert, 2009). Nonostante la semplice anatomia di questi organismi, i loro neuroni possedevano sinapsi elettriche e chimiche. Considerando che le sinapsi sono assenti nei poriferi (spugne) risulta difficile immaginare un insieme di pressioni evolutive che avrebbero selezionato contemporaneamente per l'evoluzione di tutte

le componenti molecolari appartenenti alle sinapsi; è molto più probabile che i numerosi componenti fossero già esistiti negli organismi privi di neuroni e che fossero stati riorganizzati nella struttura che oggi conosciamo come sinapsi neuronale (R. Emes, 2012). Il ruolo primario del sistema nervoso di percepire e rispondere all'ambiente era già presente negli organismi unicellulari, prima dello sviluppo dei neuroni negli organismi pluricellulari. A supporto di questa teoria sono stati condotti una serie di studi in cui si evince che l'origine delle proteine post-sinaptiche non risulta essere concomitante con l'origine dei neuroni e delle sinapsi. Sakarya e collaboratori scoprirono che il genoma delle spugne prive di nervi codifica per gli omologhi della maggior parte delle proteine postsinaptiche dei vertebrati (O. Sakarya, 2007). Le spine dendritiche dei vertebrati sono caratterizzate da una struttura densa agli elettroni chiamata densità postsinaptica (PSD), posta al di sotto della membrana postsinaptica. La PSD è coinvolta in diversi processi quali la sinaptogenesi, la formazione delle spine dendritiche e la plasticità sinaptica. Attraverso un'analisi proteomica sono state identificate circa mille proteine in questo complesso (M.O. Collins, 2006) la maggior parte delle quali sono state identificate anche nel genoma delle spugne, a dimostrazione del fatto che il la PSD avrebbe avuto origine prima dell'acquisizione delle sinapsi in un antenato privo di nervi. Questo suggerisce che le proteine della PSD agissero ancestralmente in un contesto non sinaptico, che solo in seguito è stato integrato nella sinapsi, attraverso l'aggiunta di nuove proteine e funzionalità (A. Alié, 2010). Dunque comprendere il ruolo ancestrale delle proteine sinaptiche può aiutare a rivelare i meccanismi fondamentali alla base dell'evoluzione dei neuroni oltre che a come e quando un sofisticato apparato di segnalazione come la PSD si sia evoluto durante l'evoluzione dei metazoi. Uno studio importante si è concentrato sulla ricostruzione della funzione ancestrale di Homer (D. Cheng, 2006), una delle principali proteine della PSD delle sinapsi eccitatorie nei metazoi. Homer svolge un ruolo chiave nella plasticità sinaptica, nell'influenzare la dimensione delle spine dendritiche e nelle funzioni cerebrali come memoria e apprendimento (U. Thomas, 2002). In un lavoro recente è stata posta l'attenzione sui coanoflagellati come possibili candidati ideali per lo studio dell'origine e funzione delle proteine sinaptiche: da diverse analisi filogenetiche risulta infatti che i coanoflagellati rappresentano i parenti viventi più vicini dei metazoi (H. Philippe, 2009) (I. Ruiz-Trillo, 2008) formando quindi un gruppo monofiletico. Nonostante questi organismi non posseggano neuroni e sinapsi, il loro genoma codifica per diversi omologhi proteici sinaptici, tra cui PSD, Homer e Shank. La presenza di queste proteine omologhe solleva ancora una volta la possibilità che le caratteristiche della trasmissione sinaptica si siano evolute prima della comparsa dei metazoi. Nel considerare l'evoluzione della sinapsi, bisogna focalizzarsi sull'origine delle proteine sinaptiche e, più in dettaglio, sui loro domini e sulla loro organizzazione. Chiaramente la comprensione delle origini delle sinapsi e, più in generale, dell'evoluzione del cervello umano è interconnessa con la comprensione dell'evoluzione dei genomi basata su cambiamenti genetici causati

da forze come la mutazione, la duplicazione e l'eliminazione. Dunque alla base dell'evoluzione delle caratteristiche cellulari, molecolari e strutturali del cervello umano ci sono cambiamenti genetici che influenzano la funzione proteica e l'espressione genetica. È stato ipotizzato che gli stessi cambiamenti evolutivi che ci hanno permesso di sviluppare determinate abilità abbiano reso gli esseri umani suscettibili alle malattie neurodegenerative (P. Kartik, 2020). Negli ultimi 20 anni la genetica accoppiata alla biologia cellulare e funzionale hanno rivoluzionato la comprensione di queste malattie, attraverso l'identificazione e lo studio dei geni mutati. Isolando e confrontando genomi e trascrittomi appartenenti a diverse specie si sono riscontrati dei cluster di geni specifici per l'uomo e per i primati che contenevano una significativa sovrapposizione con geni associati alla malattia di Parkinson e di Alzheimer, dimostrando l'utilità di studiare il cervello nell'arco dell'evoluzione (H. Zhang, 2019) (L. Geirsdottir, 2019).

1.2. Malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (PD) è una malattia neurodegenerativa progressiva, seconda solo alla malattia di Alzheimer (AD) nella sua prevalenza mondiale. Il principale fattore di rischio è l'aumento dell'età, con un'incidenza che aumenta dopo i 50 anni (Driver, 2009). Ad oggi questa malattia colpisce il 2-3% della popolazione al di sopra dei 65 anni di età e viene definita come un disturbo del movimento originato nel cervello, che causa sintomi motori e non motori che peggiorano con l'età. Il PD coinvolge diverse aree neuroatomiche ed è caratterizzato da un insieme di manifestazioni eterogenee. I disturbi non motori possono comparire molti anni prima di quelli motori e comprendono sintomi come l'ansia, la depressione, i disturbi del sonno, ma anche il declino cognitivo. I sintomi motori più comuni, invece, vengono denominati con l'aconimo TRAP, ovvero tremore a riposo, rigidità muscolare, acinesia e instabilità posturale (J. Jankovic, 2008).

L'aumento dell'aspettativa di vita nelle nazioni industrializzate, ha portato a prevedere che l'incidenza del PD raddoppierà nella prossima generazione evidenziando la necessità di trattamenti che prevengano l'insorgenza della malattia (Driver, 2009). Non essendo stato sviluppato alcun test specifico, il PD può essere diagnosticato clinicamente solo diversi anni dopo la sua comparsa, basandosi sull'identificazione delle caratteristiche associate alla compromissione delle capacità motorie, le quali sono associate alla perdita dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SNpc) e alla degenerazione di circa il 50-70% dei terminali dopaminergici striatali (L. Kalia, 2015). Tuttavia, la diagnosi definitiva di PD sulla diagnosi *post-mortem* di questi segni distintivi della patologia.

Nel 1817 James Parkinson pubblicò un saggio intitolato *"An Essay on the Shaking Palsy"*, nel quale vennero descritti per la prima volta i sintomi e le caratteristiche cliniche di un disturbo doloroso, che il medico stesso definì *paralysis agitans*

(paralisi da scuotimento), caratterizzata da un movimento involontario tremolante, con diminuzione della potenza muscolare, accompagnata da una propensione a piegare il tronco in avanti e a passare da un passo di camminata a uno di corsa. Più di 50 anni dopo, il neurologo francese Jean-Martin Charcot sottolineò l'importanza della lentezza dei movimenti ovvero la bradicinesia, evidenziando l'esistenza della forma tremorosa e di quella rigida della malattia (J. Parkinson, 2002).

La malattia di Parkinson sembra più frequente negli uomini rispetto alle donne, a causa probabilmente degli effetti protettivi degli estrogeni. Nonostante il PD sia una malattia legata all'età, esiste una forma di Parkinson ad esordio precoce, comprendente tutti i casi con esordio prima dei 40 anni (A. Ascherio, 2016). Ad oggi la causa specifica della malattia rimane ancora sconosciuta e non è attualmente disponibile alcun trattamento terapeutico in grado di arrestare o rallentare il processo neurodegenerativo; è possibile solo trattare i sintomi motori con farmaci che aumentano la concentrazione di dopamina o stimolano direttamente i recettori della dopamina (terapia sintomatica). Tuttavia, questa strategia diventa meno efficace con il passare del tempo (L. Kalia, 2015). Da un punto di vista patologico, la manifestazione dei sintomi motori è principalmente legata alla degenerazione dei neuroni dopaminergici nella SNpc e alla presenza di inclusioni citoplasmatiche proteiche arricchite in α-sinucleina fosforilata (α-syn) che si trovano all'interno del corpo cellulare (corpi di Lewy) e dei processi (neuriti di Lewy) dei neuroni sopravvissuti (Figura 3).

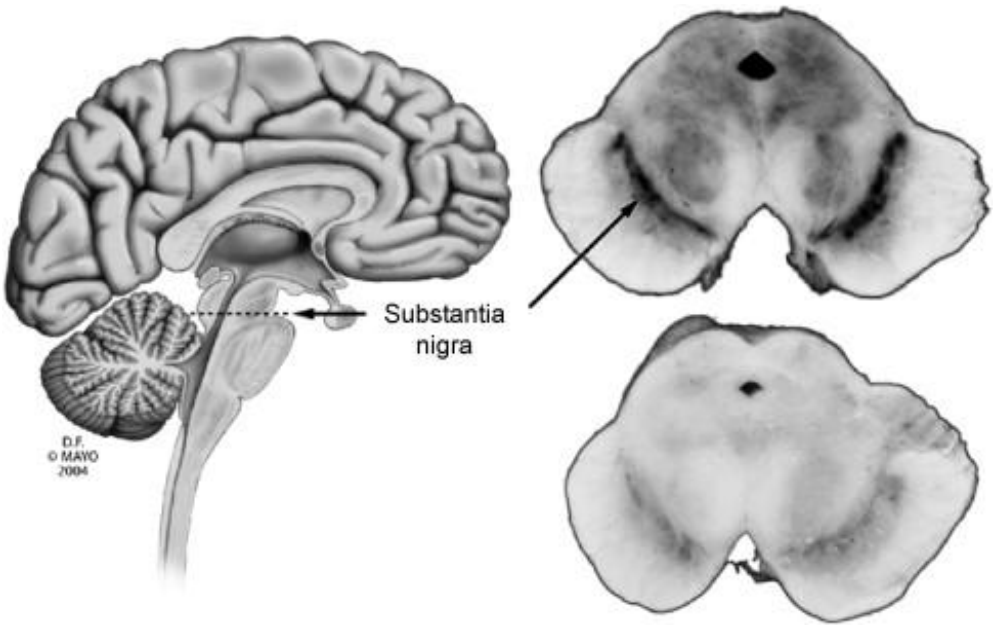


Figura 3 ***Confronto tra un cervello normale e uno affetto da PD*** Sezione sagittale del cervello umano, a livello del mesencefalo sono segnate le linee tratteggiate. In alto a destra: mesencefalo in condizioni fisiologiche, con il normale colore nero della substantia nigra sana, contenente neuroni dopaminergici. In basso a destra: mesencefalo di un paziente con malattia di Parkinson caratterizzata da pallore della substantia nigra **(W. Freeman, 2007)**.

1.2.1. Circuiti deregolati nel PD

I gangli alla base (BG) e i relativi nuclei, costituiti da diversi gruppi di cellule sottocorticali, sono principalmente implicati nel controllo del movimento. I nuclei possono suddividersi in: nuclei di input, come il nucleo caudato (CN), il putamen (Put) e il nucleo accumbens (Acb), che ricevono informazioni in entrata da diverse fonti; nuclei di output, che inviano le informazioni dei gangli della base al talamo e sono costituiti dal segmento interno del globo pallidum (GPi) e dalla substantia nigra pars reticulata (SNr); i nuclei intrinseci come il segmento esterno del globo pallidum (GPe), l'STN e la SNpc, situati tra i nuclei di ingresso e di uscita nella trasmissione delle informazioni. Il corpo striato è la componente principale dei BG e stabilisce sinapsi con segmenti interni ed esterni del GPe e del GPi. Le informazioni provenienti dalle efferenze corticali e talamiche entrano nello striato (CN, Put e Acb) per essere ulteriormente elaborate all'interno del sistema dei gangli della base. Più in dettaglio, i BG presentano diversi circuiti che collegano i nuclei sottocorticali tra loro in una rete complessa in cui si possono verificare eventi simultaneamente (Figura 4). Lo striato è composto prevalentemente da neuroni a proiezione spinosa (MSN) di medie dimensioni. Tutti gli MSN striatali sono neuroni inibitori che utilizzano come neurotrasmettitore l'acido γ-aminobutirrico (GABA), questi possono essere suddivisi in base ai loro siti di proiezione. Nello specifico, i MSN striatali che proiettano direttamente al GPi e al SNpr esprimono il neuropeptide P e il recettore della dopamina sottotipo 1 (DRD1), mentre i MSN striatali che innervano il GPe e il STN contengono il neuropeptide encefalina (ENK) e il recettore della dopamina sottotipo 2 (DRD2).
A livello degli MSN, esistono due vie distinte bilanciate, che permettono di elaborare i segnali attraverso il BG: la via diretta, eccitatoria e responsabile dell'attivazione dei movimenti volontari, e la via indiretta, inibitoria e necessaria per la cessazione dei movimenti. Dunque la dopamina, rilasciata nello striato dorsale da parte dei terminali assonici dopaminergici, avrà un effetto diverso sui MSN che esprimono DRD1 o DRD2: quando la dopamina si lega al DRD1 facilita la via diretta, quando interagisce con DRD2 inibisce la segnalazione intracellulare dell'adenil-ciclasi attraverso la proteina G e dà origine alla via indiretta. In questo modo, la dopamina controlla l'attività motoria impedendo alle contrazioni muscolari incontrollate di competere con i movimenti volontari. Quindi, Il corretto funzionamento del sistema dei gangli della base richiede il rilascio di dopamina nei nuclei di ingresso e un'alterazione di questo ultimo aspetto è associata a diversi disturbi del movimento dei gangli della base come la sindrome parkinsoniana (P. Calabresi, 2014).

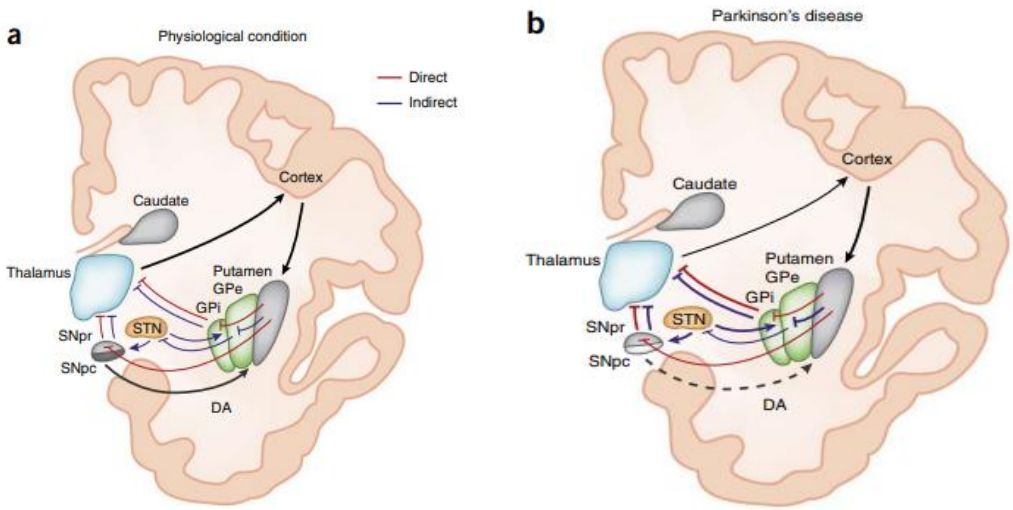


Figura 4 ***Rappresentazione schematica del modello classico della via diretta/indiretta in condizioni fisiologiche (a) e nella malattia di Parkinson (b)***. In condizioni fisiologiche, la DA proveniente dalla SNpc attiva i MSN striatali D1 della via diretta (linee rosse) e inibisce i neuroni striatali D2 della via indiretta (linee blu). I nuclei di uscita GPi e SNpr proiettano al talamo. **(b)** Nella malattia di Parkinson, la degenerazione dei neuroni della SNpc riduce la stimolazione dei recettori della DA nei MSN striatali. Lo squilibrio tra vie dirette e indirette determina un'attivazione anomala dei nuclei di uscita e una sovrainibizione dei neuroni talamici che proiettano alla corteccia **(P. Calabresi, 2014)**.

1.2.2. Malattia di Parkinson sporadica e familiare

I casi di PD sono per lo più sporadici, cioè non ereditari, con eziologia sconosciuta, probabilmente causata da un'associazione di fattori di rischio genetici e ambientali (N. Tambasco, 2016). In bassissima percentuale (5-10% dei casi totali) e prevalentemente nelle forme ad esordio precoce, la malattia è legata alla disfunzione di un singolo gene, si parla quindi di "Parkinson monogenetico". Ad oggi sono state individuate almeno 15 mutazioni genetiche coinvolte nell'insorgenza del PD. Le indagini genetiche e la scoperta di forme monogenetiche di PD sono fondamentali per lo sviluppo di nuove terapie, dato che ad oggi i trattamenti disponibili sono solo sintomatici e non arrestano o rallentano il processo di neurodegenerazione (H. Deng, 2018).

Il fattore di rischio più noto per l'insorgenza di PD è l'invecchiamento, anche se molti casi di PD non presentano un'eziologia chiara. Questa malattia può essere distinta in una forma primitiva, degenerativa, e in forme secondarie. Queste ultime sono legate a fattori esterni, come ad esempio traumi cranici ripetuti, somministrazione di alcuni farmaci, oppure tumori cerebrali. Anche i traumi cranici ripetuti in età avanzata aumentano il rischio di sviluppare la malattia. Sembra inoltre che il sesso biologico influisca sulla probabilità di insorgenza di PD, infatti è 2 volte superiore negli uomini, probabilmente a causa dell'effetto protettivo esercitato da parte degli estrogeni (N. Thadathil, 2021). Da alcuni studi è emerso che l'esposizione a pesticidi, prodotti chimici industriali e alcuni metalli come il ferro, manganese, piombo e rame possano essere correlati all'insorgenza

del PD (S. Nandipati, 2016). Anche l'etnia rientra nei fattori di rischio. Infatti, il PD idiopatico è meno comune tra gli asiatici e gli africani rispetto agli europei, ai nordamericani e ai sudamericani (A. Sauerbier, 2018).
Si ritiene che i fattori ambientali ed epigenetici agiscano in combinazione con la predisposizione genetica nel modulare il rischio di PD (M. A.Nalls, 2019). Anni di ricerca genetica sul PD hanno portato all'identificazione di diverse forme monogenetiche del disturbo e di numerosi fattori di rischio genetici che aumentano la probabilità di sviluppare la malattia di Parkinson. Le forme monogenetiche, causate da una mutazione in un gene ereditato in modo dominante o recessivo, sono forme di PD ben conosciute, ma rare, infatti rappresentano il 3-5% dei casi sporadici e circa il 30% dei casi familiari. Dei diversi geni legati indubbiamente al PD monogenico ereditario, le mutazioni nel gene dell' α-sinucleina (*SNCA* o *PARK1*) e nel gene Leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2* o *PARK8*) sono responsabili di forme autosomiche dominanti di PD; inoltre le mutazioni in Parkin (*PARK2*), PINK1 (*PARK6*), DJ-1 (*PARK7*) e ATP13A2 (*PARK9*) sono responsabili del PD con ereditarietà autosomica recessiva (AR) (C. Blauwendraat, 2020). Le mutazioni associate al gene DJ-1 sono molto rare, infatti rappresentano l'1-2% dei casi di PD ad esordio precoce. DJ-1 svolge funzioni di protezione verso i mitocondri e i neuroni funzionando come sensore dello stress ossidativo. Al contrario, le mutazioni in *LRRK2* sono tra le cause genetiche più comuni di PD autosomico dominante con penetranza incompleta ad insorgenza tardiva e sono responsabili di una percentuale di casi di PD sporadici, riscontrati nel 5-10% dei pazienti con una storia familiare della malattia e rappresentano l'1-2% di tutti i casi sporadici, dovuti alla presenza di fattori di rischio per il PD (S. Lesage, 2009). Considerando inoltre che il fenotipo della forma sporadica è indistinguibile dal fenotipo della forma ereditata è ipotizzabile che i meccanismi patologici siano comuni. Ecco dunque che la scoperta dei geni e delle forme monogenetiche di PD rappresenta un'importante opportunità per identificare i meccanismi alla base della malattia utilizzando modelli appropriati.

1.2.3. Degenerazione assonale nella malattia di Parkinson

I neuroni richiedono un'elevata attività metabolica per sostenere la neurotrasmissione, inoltre la loro natura post-mitotica impedisce di diluire, attraverso la divisione, i detriti cellulari che si accumulano all'interno del citoplasma. Queste caratteristiche rendono i neuroni particolarmente dipendenti da efficienti meccanismi che controllano l'omeostasi proteica (E. Robert, 2013). È stato suggerito che, nei disturbi neurodegenerativi, determinati tipi di neuroni siano più vulnerabili sulla base della loro morfologia assonale. Tra questi ci sono i neuroni dopaminergici della SNpc caratterizzati da assoni lunghi, sottili, non mielinizzati o scarsamente mielinizzati; essi inoltre danno origine ad una massiccia arborizzazione terminale striatale con un vasto numero di terminali assonici che forniscono una densa innervazione allo striato (H. Braak, 2004).

Pertanto, il mantenimento di un'architettura assonale così ampia può porre il neurone dopaminergico sotto una notevole richiesta di energia, tale che qualsiasi disturbo che induca un bilancio energetico negativo possa portare al fallimento funzionale e, infine, alla morte cellulare (P. Bolam, 2012). Le sinapsi sono spesso molto lontane dal corpo cellulare dove vengono sintetizzate le proteine. Tuttavia, letteratura recente indica l'esistenza di meccanismi specifici delle sinapsi che regolano il turnover proteico. Questo risulta essere importante nel contesto delle malattie neurodegenerative (S. Soukup, 2018). Nella condizione di una lesione o di una malattia neurologica possono verificarsi due forme di degenerazione degli assoni: anterograda e retrograda. La degenerazione anterograda si verifica in seguito a una lesione dell'assone prossimale, seguita dalla degenerazione dell'assone distale nel sito della lesione, mentre la degenerazione retrograda procede dai terminali distali dell'assone fino al corpo cellulare del neurone. Entrambe le forme risultano nel danno e disassemblaggio degli elementi citoscheletrici, il rigonfiamento dei mitocondri e la frammentazione degli assoni, nonostante le basi molecolari siano probabilmente diverse. Ci sono evidenze derivanti sia da studi su pazienti con PD che da modelli genetici animali, a sostegno del concetto che la degenerazione del sistema dopaminergico nel PD inizia nell'assone e nei terminali sinaptici e solo successivamente coinvolge i corpi cellulari neuronali nella SNpc, quindi, il decadimento sinaptico può essere considerato un evento patologico precoce che precede la morte neuronale (MC. Raff, 2002).

Storicamente, la maggior parte della ricerca si è concentrata sull'identificazione di strategie per ridurre o arrestare la perdita di neuroni che caratterizza la patologia, implicando che il soma neuronale sia il primo compartimento a essere colpito. Tuttavia, recenti evidenze supportano l'idea che il deterioramento dei neuroni dopaminergici inizi nell'assone e nei terminali sinaptici e, solo in un secondo momento, probabilmente attraverso una forma di degenerazione retrograda, arrivi al corpo cellulare neuronale. Ad esempio la patologia da α-syn è abbondante negli assoni e nei terminali presinaptici, e l'aggregazione di α-syn è stata dimostrata essere strettamente associata a riduzioni dei livelli di proteine motorie assonali nei neuroni della SN di casi con PD sporadico (P. Tagliaferro, 2016). Una spiegazione della mancanza di progressi nello sviluppo di terapie può essere legata alla sottovalutazione della rilevanza della degenerazione assonale; infatti in questo nuovo contesto, che vede la prima patologia rilevabile nel PD a livello degli assoni e non del soma neuronale, gli sforzi per proteggere il soma neuronale sarebbero un approccio "troppo poco, troppo tardi", visto che la perdita neuronale, a differenza delle disfunzioni assonali, è irreversibile. Quindi terapie mirate a rallentare o bloccare la perdita delle sinapsi potrebbero fornire benefici terapeutici anche nel PD avanzato (E. Robert, 2013) (B. Picconi, 2012).

1.3. Leucine-rich repeat kinase 2

Le mutazioni nel gene *LRRK2* possono causare la manifestazione di una forma di PD autosomica dominante ad esordio tardivo (C. Ruíz, 2004). Queste mutazioni rappresentano fino al 13% dei casi familiari di PD compatibili con l'ereditarietà dominante a penetranza incompleta e si trovano anche nell'1-2% dei pazienti con PD sporadico (W. Smith, 2005). La scoperta di mutazioni nel gene *LRRK2* in soggetti affetti da PD autosomico dominante ha permesso di definire il locus della malattia di Parkinson, *PARK8* (M. Funayama, 2005).

Nello specifico, l'attenzione verso il locus *PARK8* è nata per la prima volta nel 2002 dalla scoperta, da parte di Funayama e collaboratori, di un'ampia famiglia giapponese affetta da una forma autosomica dominante di PD. I membri della "famiglia Sagamihara" erano portatori di alterazioni in un nuovo locus associato al PD, denominato *PARK8*, mappato sul cromosoma 12 e contenente circa 116 geni (M. Funayama, 2002). Nel 2004, due studi indipendenti hanno identificato LRRK2 come il gene causale del PD associato a *PARK8* (Paisán-Ruíz et al., 2004; Zimprich et al., 2004). Data l'origine basca delle famiglie studiate, la proteina codificata dal gene *LRRK2* è stata chiamata anche "dardarin", dalla parola basca "dardara", che significa tremore (C. Ruíz, 2004).

1.3.1. Struttura di LRRK2

LRRK2 è una proteina molto grande (286 kDa) composta da 2.527 aminoacidi, che consiste in più domini funzionali (Figura 5), appartenenti al nucleo catalitico di LRRK2, il quale possiede una duplice funzione enzimatica: si comporta come una serina-treonina chinasi (dominio KIN) e possiede un'attività GTPasica, mediata dai domini ROC e COR (ovvero C-terminale di ROC), importante per la dimerizzazione della proteina (A.Myasnikov, 2021). L'N-terminale di LRRK2 contiene domini armadillo (ARM), ankyrin (ANK) e leucine-rich repeat (LRR). Oltre ai domini catalitici ben caratterizzati, le ripetizioni nell'N-terminale ARM, LRR e Ankyrin, così come il dominio C-terminale WD40, ospitano diversi siti di interazione proteica e consentono la dimerizzazione di LRRK2, che infatti viene descritta come un hub molecolare che orchestra numerose vie di segnale. Inoltre, il dominio WD40 può influenzare il ripiegamento della proteina e, di conseguenza, la funzione di LRRK2 (R. Wallings, 2015).

In condizioni patologiche sono state riportate anche strutture filamentose di LRRK2 dipendenti dai microtubuli (CK. Deniston, 2020). Tuttavia, in condizioni fisiologiche LRRK2 esiste principalmente sotto forma di monomeri e dimeri piuttosto che come filamenti (B. Gilsbach, 2018).

Le mutazioni nel gene *LRRK2* rappresentano la causa genetica più comune del PD (C. Ruiz, 2013), che si manifesta con un fenotipo clinico e patologico quasi indistinguibile dalla forma di PD sporadica. Pertanto, sin dalla sua scoperta, LRRK2 ha suscitato notevole interesse nella ricerca sul PD, e diversi studi sono stati condotti per far luce sulle sue funzioni genetiche, biochimiche e cellulari.

LRRK2 è fosforilata da varie chinasi su un tratto N-terminale ricco di residui di serina (R. J. Nichols, 2017); una caratteristica sorprendente della maggior parte delle mutazioni patogene di LRRK2, ad eccezione di G2019S, è che mostrano tutte un'importante perdita della fosforilazione di S910/S935 (R. J. Nichols, 2010). Pertanto, la fosforilazione cellulare è un evento chiave per il controllo della funzione LRRK2 (P. S. Athanasopoulos, 2018). Si è visto, inoltre, che le mutazioni all'interno del dominio della chinasi LRRK2 (G2019S e I2020T) ne aumentano l'attività sia *in vitro* (E. Greggio, 2006) che *in vivo* (M. Steger, 2016). Parallelamente, le mutazioni che rientrano nel dominio ROC e COR (N1437H, R1441G/C/H, Y1699C) sopprimono l'attività della GTPasi, mentre la mutazione più comune G2019S, situata nel dominio KIN (responsabile fino al 10% della PD apparentemente sporadica e fino al 42% della PD familiare) l'attività chinasica di 2-3 volte. Ciò suggerisce che alterate attività chinasica e GTPasica possono essere importanti nella patogenesi del PD, rendendo LRRK2 un promettente bersaglio farmacologico per il trattamento della malattia (M. Nguyen, 2018). È inoltre importante specificare che il contributo genetico di LRRK2 al PD non si limita semplicemente alle mutazioni che causano la malattia, ma include varianti di rischio per la malattia, come ad esempio una variante di rischio nel dominio WD40 (il polimorfismo G2385R) che riduce l'attività chinasica di LRRK2, contrariamente dell'effetto della mutazione G2019S (C. Ruiz, 2013).
I substrati più robusti dell'attività chinasica di LRRK2 identificati finora sono un gruppo di GTPasi monomeriche, chiamate proteine Rab, tra cui Rab8A e Rab10. Non a caso, tutti i mutanti LRRK2 legati al PD mostrano una maggiore attività della chinasi sulle Rabs (M. Steger, 2016).

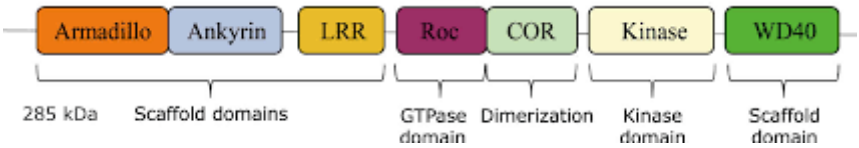


Figura 5 ***Struttura LRRK2***. LRRK2 contiene sette domini strutturali, noti come dominio armadillo (Arm), dominio ankyrin (ANK), dominio ripetuto ricco di leucina (LRR), dominio ROC (Ras of Complex), dominio COR (C-terminale di ROC), dominio chinasi (chinasi) e dominio ripetuto WD40 (WD40).

1.3.2. Distribuzione tissutale e subcellulare di LRRK2

LRRK2 è presente in diversi tessuti e organi (Figura 6 B), con maggiore espressione nel cervello, nei polmoni, nei reni e nelle cellule immunitarie circolanti (S. Biskup, 2007). È espresso nella maggior parte delle regioni cerebrali, infatti si trova nelle cellule neuronali e gliali. LRRK2 viene espresso anche in aree non correlate all'insorgenza di PD, come il talamo (dove è ampiamente espresso), il tronco encefalico (in vari nuclei e nei motoneuroni colinergici), ma anche la corteccia cerebellare e i nuclei cerebellari profondi. Inoltre, l'mRNA di LRRK2 è presente in una serie di popolazioni neuronali in

regioni anatomiche di diretta rilevanza per la patogenesi del PD (A. B. West, 2014), infatti è localizzato in tutta la via dopaminergica nigro-striatale, con un'espressione elevata nello striato, bersaglio dei neuroni DA della SNpc, che invece presentano livelli molto bassi dell'mRNA (H. L. Melrose, 2007). È interessante notare che l'espressione di LRRK2 sia associata a marcatori specifici di un compartimento dello striato, lo striosoma (W. Mandemakers, 2012). Nel dettaglio i neuroni di output striatale possono essere divisi in popolazioni chiamate striosoma e matrice. Uno studio recente ha evidenziato che i neuroni striosomiali sono l'output striatale predominante verso i neuroni della dopamina diSNpc, suggerendo un ruolo funzionale per LRRK2 negli striasomi (M. McGregor, 2019). Inoltre, nei neuroni striatali e corticali, LRRK2 appare principalmente all'interno del soma e dei dendriti, dove tende ad assumere una localizzazione puntiforme, in particolare è stato dimostrato che queste grandi strutture puntiformi colocalizzano con una proteina *scaffold* legata all'ubiquitina coinvolta nel processo autofagico, P62 (F. Kalogeropulou, 2018). Un'elevata espressione di LRRK2 è stata notata nei macrofagi e nei monociti, così come nei linfociti T, portando alla speculazione su un ruolo funzionale per LRRK2 nel sistema immunitario innato (A. Schildt, 2019).

LRRK2 ha un ortologo strettamente correlato noto come LRRK1 (Figura 6A). Entrambi hanno funzioni ridondanti nella protezione dei neuroni dalla degenerazione. Si è visto che LRRK1 regola l'inattivazione della proteina Rab7A, promuovendo così la fusione dei componenti endocitici e autofagici ai lisosomi, inoltre è stato anche implicato nel traffico endosomiale dei recettori del fattore di crescita epidermico (EGF) (H. Hanafusa, 2011). Questi dati suggeriscono che LRRK1 e LRRK2 hanno funzioni ridondanti nella via di autofagia-lisosomiale. Tuttavia, analisi proteomiche comparative sugli interattomi di LRRK1 e LRRK2 hanno dimostrato una scarsa sovrapposizione tra i due (L. Reyniers, 2014), questo implica che potrebbero avere funzioni distinte. Sebbene il profilo di espressione delle LRRK sia abbastanza simile in diversi organi (come cuore, polmoni e muscoli), LRRK1 è più abbondante nell'intestino e LRRK2 è altamente espressa nei tessuti renali e cerebrali, infatti in età adulta l'espressione di LRRK1 nel cervello è notevolmente inferiore ai livelli di LRRK2.

A livello subcellulare, poiché LRRK2 non contiene domini transmembrana noti, ci si aspetta che sia una proteina citosolica, infatti si è visto che nelle cellule in coltura LRRK2 è distribuito in tutto il citoplasma ma non si osserva nel nucleo (A.B. West, 2005). Tuttavia, attraverso frazionamento biochimico e analisi al microscopio elettronico, è stato dimostrato che LRRK2 si localizza nelle membrane degli organelli (G. Ito, 2012), ma anche in varie strutture membranose. La presenza di LRRK2 in membrane "pesanti" (apparato di Golgi, reticolo endoplasmatico, ER e membrana mitocondriale esterna) sia nelle vescicole "leggere" (SV, corpi multivescicolari, MVB e lisosomi), ha indotto a pensare che LRRK2 svolga un ruolo nella biogenesi e/o nella regolazione del traffico di strutture intracellulari vescicolari e membranose all'interno delle cellule neuronali.

Per di più LRRK2 è fisiologicamente reclutata sulle membrane dei lisosomi stressati per mantenere la loro omeostasi insieme a Rab29/7L1, Rab8 e Rab10 (M. Akari, 2018).

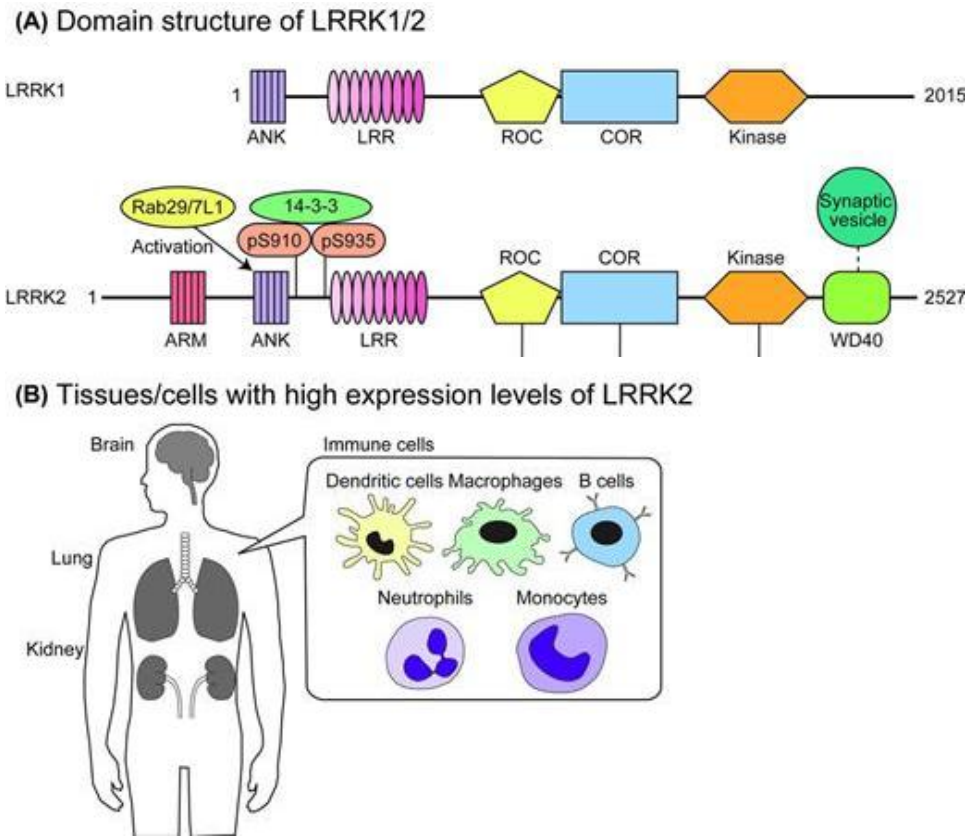


Figura 6 ***Struttura ed espressione di LRRK2*** **(A)** La struttura del dominio di LRRK1/2. Sia LRRK1 che LRRK2 sono composti da un dominio di legame GTP di tipo ROC, un dominio COR, un dominio della proteina chinasi serina/treonina e diversi domini ripetuti. **(B)** LRRK2 è altamente espresso nel cervello, nei polmoni, nei reni e nelle cellule immunitarie, comprese le cellule dendritiche, i macrofagi, i linfociti B, i neutrofili e i monociti **(M. Akari, 2018)**.

1.3.3. Interattori di LRRK2

Nella biologia moderna, la mappatura sistematica delle interazioni proteiche rappresenta un potente strumento per ottenere una rapida comprensione delle funzioni delle reti cellulari.

Diversi studi hanno riportato un'interazione di LRRK2 con proteine coinvolte nella dinamica del citoscheletro, nella trasmissione sinaptica e nel traffico vescicolare, ma anche con proteine che influenzano la localizzazione, la stabilità e l'attività di LRRK2 (L. Iannotta, 2021): nel 2010 è stato identificato un sottoinsieme di proteine (14-3-3) in grado di interagire con i residui fosforilati S910 e S935 di LRRK2 tra le ripetizioni LRRK2 Ankyrin e LRR, i cui livelli di fosforilazione sono correlati all'attività della chinasi LRRK2 e sono alterati dalle varianti LRRK2 associate a PD (R. J. Nichols, 2010). Un terzo sito di legame delle 14-3-3 è stato identificato nel C-terminale di LRRK2 attorno al sito di

autofosforilazione (JT. Manschwetus, 2020). Questa scoperta ha dimostrato che il C-terminale forma un' α-elica che interagisce con entrambi i lobi del dominio chinasico (CK. Deniston, 2020). Il legame con le proteina 14-3-3 regola la stabilità di LRRK2, l'attività della chinasi e/o la localizzazione di LRRK2. In effetti, è stato recentemente dimostrato un ruolo di queste proteine dello *scaffold* nella localizzazione subcellulare di LRRK2 (J. H. Lee, 2019).
Una delle interazioni proteiche dirette meglio caratterizzate, oltre a quella già citata con le proteine 14-3-3, è l'interazione fisica di LRRK2 con le proteine Rab. Diverse proteine Rab, come Rab29 (Rab7L1), Rab32 e Rab38 interagiscono direttamente con l'N-terminale di LRRK2 tramite i domini ARM e/o ANK. L'interazione fisica tra queste proteine è stata funzionalmente collegata all'endocitosi delle vescicole sinaptiche (N. Shin, 2008) e alla crescita dei neuriti (H. Y.Heo, 2010). Il traffico difettoso di vescicole sembra essere implicato nell'insorgenza del PD. Alcuni degli interattori di LRRK2 fungono anche da substrati della sua attività chinasica che, di conseguenza, influisce sulle loro funzioni fisiologiche. Ad esempio è stato dimostrato che Rab3a, Rab8a, Rab10 e Rab12 sono bersagli dell'attività di fosforilazione di LRRK2. Queste proteine possono interagire anche con altre proteine correlate al PD quali α-sin, PINK1 e Parkin, VPS35 e TMEM230 (S. Cogo, 2020). L'identificazione dei substrati di LRRK2 può servire come readout dell'attività patogena di LRRK2 nei pazienti affetti da PD. Infatti, un importante contributo nel delineare la funzione di LRRK2 è arrivato quando un sottoinsieme di Rab GTPasi è stato validato come substrato dell' attività chinasica di LRRK2. Nel corso degli anni sono stati riportati diversi substrati *in vitro* (S. Cogo, 2020), come proteine sinaptiche, fattori coinvolti nella traduzione di proteine (4E-BP1) e proteine associate ai microtubuli (MAP) (moesina, β tubulina, tau) (F. Kawakami, 2012). Tra i vari interattori di LRRK2 troviamo proteine associate al citoscheletro che includono microtubuli e filamenti di actina, insieme ad alcune proteine regolatrici dell'actina come le proteine PAK6, ERM e WAVE2. Uno studio del 2008 ha mostrato che l'inibizione dell'attività chinasica di LRRK2 nelle cellule di neuroblastoma SH-SY5Y influisce principalmente sul citoscheletro di actina (K. Habig, 2008). Inoltre, LRRK2 interagisce funzionalmente anche con un'altra importante proteina regolatrice della dinamica del citoscheletro di actina, il fattore di scambio del nucleotide della guanina Cdc42/Rac β1Pix/ArhGEF7 (K. Haebig, 2010) (R. Chia, 2014). Un altro collegamento funzionale alla dinamica del citoscheletro è stato recentemente fornito dall'identificazione della chinasi 6 attivata da p21 (PAK6) come interattore del dominio ROC di LRRK2 (L. Civiero, 2015). In questo lavoro, è stato dimostrato che LRRK2 e PAK6 cooperano nella regolazione della crescita dei neuriti.

1.3.4. Funzioni di LRRK2

LRRK2 svolge un'ampia varietà di funzioni, tra cui la regolazione dell'autofagia, il traffico di vescicole, il controllo della sinaptogenesi, il riciclo delle vescicole nelle sinapsi, la sintesi proteica, l'espressione genica e attività specifiche nel sistema immunitario. Tutti questi processi controllati da LRRK2 inducono a pensare che questa proteina possa comportarsi da "hub", ossia una proteina dinamica in grado di interagire, grazie alle presenza di più domini di interazione, con diverse proteine e di formare diversi complessi in luoghi e tempi diversi, anche a seconda del tipo cellulare e degli stimoli a cui è esposta (R. Wallings, 2015).

Diversi studi hanno evidenziato il ruolo di LRRK2 nell'autofagia, ovvero un processo altamente conservato e specializzato di degradazione cellulare, mediante il quale macromolecole, aggregati proteici e organelli disfunzionali vengono consegnati ai lisosomi per essere degradati. Questa attività fisiologica risulta estremamente importante nelle cellule neuronali post-mtotiche, suscettibili all'accumulo di depositi proteici. Infatti, quando questa attività risulta compromessa, può essere correlata a molti disturbi neurodegenerativi associati all'età e caratterizzati dall'accumulo di aggregati proteici tossici all'interno dei neuroni, come il PD. Ad esempio, studi su linee di topo/ratto LRRK2 KO hanno evidenziato un ruolo di LRRK2 nella neurogenesi (M. Paus, 2013) (C. Schulz, 2011), indicando che la perdita di LRRK2 comporta anomalie morfologiche, osservate in modo riproducibile nei reni e nei polmoni di alcuni roditori LRRK2 KO (M.A.S. Baptista, 2013). Infatti i reni degli animali LRRK2 KO si presentano più scuri e ingrossati. Inoltre analisi istologiche hanno evidenziato nei tubuli renali l'accumulo età-dipendente di granuli autofluorescenti contenenti lipofuscina e il substrato autofagico p62, che riconosce e lega le proteine per il sequestro nell'autofagosoma (M.A.S. Baptista, 2013) (Y. Tong, 2010), suggerendo che LRRK2 svolge un ruolo importante nella via autofagia-lisosomiale proteggendo i tubuli renali dallo stress ossidativo. Anche i polmoni degli animali LRRK2 KO hanno mostrano un ingrossamento specifico dei corpi lamellari nelle cellule epiteliali alveolari di tipo II (ATII) (M.A.S. Baptista, 2013) (P. Miklavc, 2014), cellule specializzate nella sintesi e secrezione del surfattante polmonare, rilasciato nel lume alveolare in seguito all'esocitosi dei corpi lamellari. Si pensa che i corpi lamellari siano un organello correlato al lisosoma, poiché contengono marcatori lisosomiali (T.E. Weaver, 2002). Questi risultati suggeriscono che la carenza di LRRK2 compromette l'omeostasi degli organelli della via endolisosomiale. Nel complesso, sebbene la letteratura sul collegamento tra autofagia e LRRK2 sia molto ampia, i risultati suggeriscono un ruolo regolatorio di LRRK2 sia nella fase iniziale che in quella finale dell'autofagia, evidenziando l'inibizione dell'attività chinasica di LRRK2 (tramite inibizione chimica o knockdown/knockout, KD/KO) o l'aumento (attraverso la sovraespressione di G2019S LRRK2). È importante notare che l'autofagia può regolare la formazione delle sinapsi ed anche la neurotrasmissione sia a livello presinaptico che

postsinaptico. A livello presinaptico, questo processo controlla la funzione mitocondriale, oltre che l'omeostasi e il rilascio di vescicole sinaptiche (SV); nel compartimento postsinaptico, controlla la neurotrasmissione eccitatoria degradando l'acido α-amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolopropionico (AMPA) e i recettori GABA. Pertanto, l'assenza di autofagia può interrompere la plasticità sinaptica, che dipende dai recettori metabotropici del glutammato (mGluRs) (OJ. Lieberman, 2020).

LRRK2 e il citoscheletro

Sempre più studi evidenziano un'associazione fisica e funzionale tra LRRK2 e le componenti associate al citoscheletro nei neuroni (L. Parisiadou, 2010).
Lo sviluppo e il mantenimento del sistema nervoso richiede una delicata interazione tra due componenti chiave del citoscheletro: i microtubuli e l'actina. Non a caso l'assemblaggio di elementi citoscheletrici anormali è una delle principali caratteristiche delle malattie neurodegenerative, come nel PD, dove i corpi di Lewy (segno fisiopatologico della malattia) sono arricchiti di tubulina, proteina associata ai microtubuli e ai neurofilamenti. I MT sono polimeri costituiti dalle subunità α e β della tubulina. Si è visto che LRRK2 interagisce con la tubulina attraverso il suo dominio ROC. In particolare, LRRK2 fosforila la β-tubulina andando a migliorare la stabilità dei microtubuli. Mutazioni in LRRK2 come la sostituzione iperattiva G2019S possono, quindi, comportare una deregolazione della dinamica dei microtubuli compromettendo la corretta funzione neuronale (B. M. H. Law, 2014).
Un lavoro di biochimica ha riportato la proteina moesin come primo substrato per l'attività della chinasi LRRK2 *in vitro*. Moesin, insieme a ezrin e radixin, sono note come proteine ERM e collegano il citoscheletro di actina alla membrana plasmatica. Questo studio rappresenta la prima indicazione chiara che LRRK2 è implicata nella dinamica dell'actina (L. Parisiadou, 2009). In un recente studio è stata evidenziata una connessione tra LRRK2 e la dinamica dell'actina attraverso la fosforilazione delle proteine ERM. Le proteine ERM fosforilate (pERM) legano l'F-actina alla membrana plasmatica connettendo il loro N-terminale a quest'ultima mentre il C-terminale interagisce direttamente con l'F-actina. È stato dimostrato che le proteine ERM sono veri e propri bersagli a valle di LRRK2 in vivo e che LRRK2 influenza la crescita dei neuriti durante lo sviluppo attraverso la regolazione delle proteine ERM e la dinamica dell'actina (A. Meixner, 2011).

LRRK2 nel compartimento presinaptico e post sinaitico

La scoperta che un sottogruppo di proteine Rab sono il substrato principale dell'attività chianasica di LRRK2 (M. Steger, 2016) implica un forte collegamento tra LRRK2 e il sistema vescicolare. Le proteine Rabs infatti orchestrano il traffico di membrane, inclusi i processi di formazione delle vescicole, il movimento delle vescicole, la fusione delle membrane e regolano il traffico di SV.

Nel 2008 Shin e collaboratori (N. Shin, 2008) hanno dimostrato che nel sito presinaptico LRRK2 lega le SV attraverso l'interazione con l'actina e una serie di proteine presinaptiche, ricoprendo un ruolo chiave nella regolazione di diverse fasi della dinamica delle SV, in particolar modo nell'endocitosi. È interessante notare come il dominio C-terminale WD40 di LRRK2 sia in grado di legare alcune delle proteine associate alle SV, come la sinapsina-I, la N-etilmaleimide sensitive factor (NSF), la dinamina-1 e la sinaptojanina, ma anche altre come MUNC18-1, VAMP2, la sinucleina e la sintassina-1A (G. Piccoli, 2014). Inoltre, è stato chiaramente dimostrato che LRRK2 promuove anche il processo di esocitosi. Qualsiasi danno nel corretto funzionamento del processo endo- ed esocitico delle SV può causare a lungo termine difetti nella trasmissione sinaptica.
Il ruolo di LRRK2 nel compartimento post sinaptico non è stato studiato in maniera approfondita come nel sito pre sinaptico. Tuttavia studi recenti hanno evidenziato il coinvolgimento di LRRK2 nel traffico dei recettori dei neurotrasmettitori (G. Piccoli, 2014). È anche probabile che LRRK2 influenzi il traffico dei recettori AMPA attraverso i suoi fattori sensibili alla NSF o i fosfo-target Rab8a, entrambi coinvolti nel mediare l'inserimento delle subunità dei recettori AMPA nella membrana postsinaptica. Dai risultati del lavoro di Parisiadou e colleghi si evince che LRRK2 sia capace di inibire l'attività della subunità regolatoria IIb della proteina chinasi A (PKA) cAMP-dipendente, controllando così la sua localizzazione nell'albero dendritico. La perdita di LRRK2 innesca il reclutamento della PKA all'interno delle spine dendritiche, dove fosforila sia la proteina cofilina, legata all'actina, sia il recettore del glutammato GluR1, coinvolto nella formazione e nella trasmissione sinaptica. Il recettore GluR1 fosforilato dalla PKA è fondamentale nella maturazione e plasticità delle spine dendritiche (J. A. Esteban, 2003).

1.3.5. Aspetti evolutivi di LRRK2

LRRK2 appartiene alla famiglia delle proteine ROCO. In particolare, i domini ROC sono stati identificati nel 2003 come domini di legame GTPasici appartenenti a grandi proteine multidominio (L. Bosgraaf, 2003). I geni della famiglia ROCO sono presenti sia nei procarioti che negli eucarioti e codificano grandi proteine multidominio con due sottodomini caratteristici: ROC (Ras of Complex), una GTPasi, seguita dal C-terminale di ROC (COR), un dominio presente solamente nelle proteine ROCO e implicato nell'omodimerizzazione (I.F. Mata, 2006).
Nei deuterostomi, compreso l'uomo, esistono due isoforme di LRRK, LRRK1 e LRRK2, mentre nei protostomi è stato trovato un singolo gene LRRK. Attraverso analisi strutturali e filogenetiche è stato dimostrato che l'origine di LRRK è molto antica, infatti si è visto che lo cnidario *Nematostella vectensis* presenta quattro geni LRRK, tra cui un ortologo del gene LRRK2 umano (I. Marìn, 2006).
Ignacio Marin e colleghi hanno dimostrato che LRRK1 è il parente più prossimo di LRRK2. Tuttavia, si è visto che la proteina LRRK2 ha una regione N-terminale

lunga 650 amminoacidi, formata da ripetizioni, che è assente nella proteina LRRK1 (I. Marìn, 2006). Come anticipato precedentemente, i geni LRRK1 e LRRK2 sono presenti in tutti i deuterostomi, inclusi non solo i vertebrati, ma anche gli echinodermi, mentre i protostomi come insetti e nematodi hanno un singolo gene LRRK che è strutturalmente molto simile a LRRK1 (L. Bosgraaf, 2003) indicando che il gene LRRK di questi organismi è paralogo del gene LRRK2 umano. Diversamente, l'organismo *N.vectensis* presenta una serie di 11 ripetizioni N-terminali che sono molto simili a quelle trovate in LRRK2. Infatti attraverso analisi filogenetiche, Marin ha confermato la stretta relazione tra la proteina simile a LRRK2 in *N. vectensiscon* e le proteine deuterostomiche LRRK2 comparendo insieme in un gruppo monofiletico (Figura 7). Sembra dunque che ci fossero almeno tre geni (LRRK1, LRRK2 e LRRK3) prima della separazione tra cnidari e bilateri: i risultati ottenuti suggeriscono che LRRK3 esistesse nell'antenato di tutti gli eumetazoi e che è stato conservato negli cnidari, negli echinodermi e nei protostomi, ma è stato poi perso nei vertebrati. Inoltre i protostomi hanno mantenuto LRRK3, perdendo allo stesso tempo i geni LRRK1 e LRRK2, mentre i vertebrati hanno mantenuto LRRK1 e LRRK2, ma hanno perso LRRK3. Questi risultati indicano che i protostomi e i vertebrati non possiedono geni LRRK ortologhi. Questa caratterizzazione indica che i geni LRRK2 di *Drosophila* e *Caenorhabditis*, che sono studiati per ottenere una comprensione della funzione LRRK2 , non sono veri ortologhi del gene umano mutato nel morbo di Parkinson (I. Marìn, 2008).

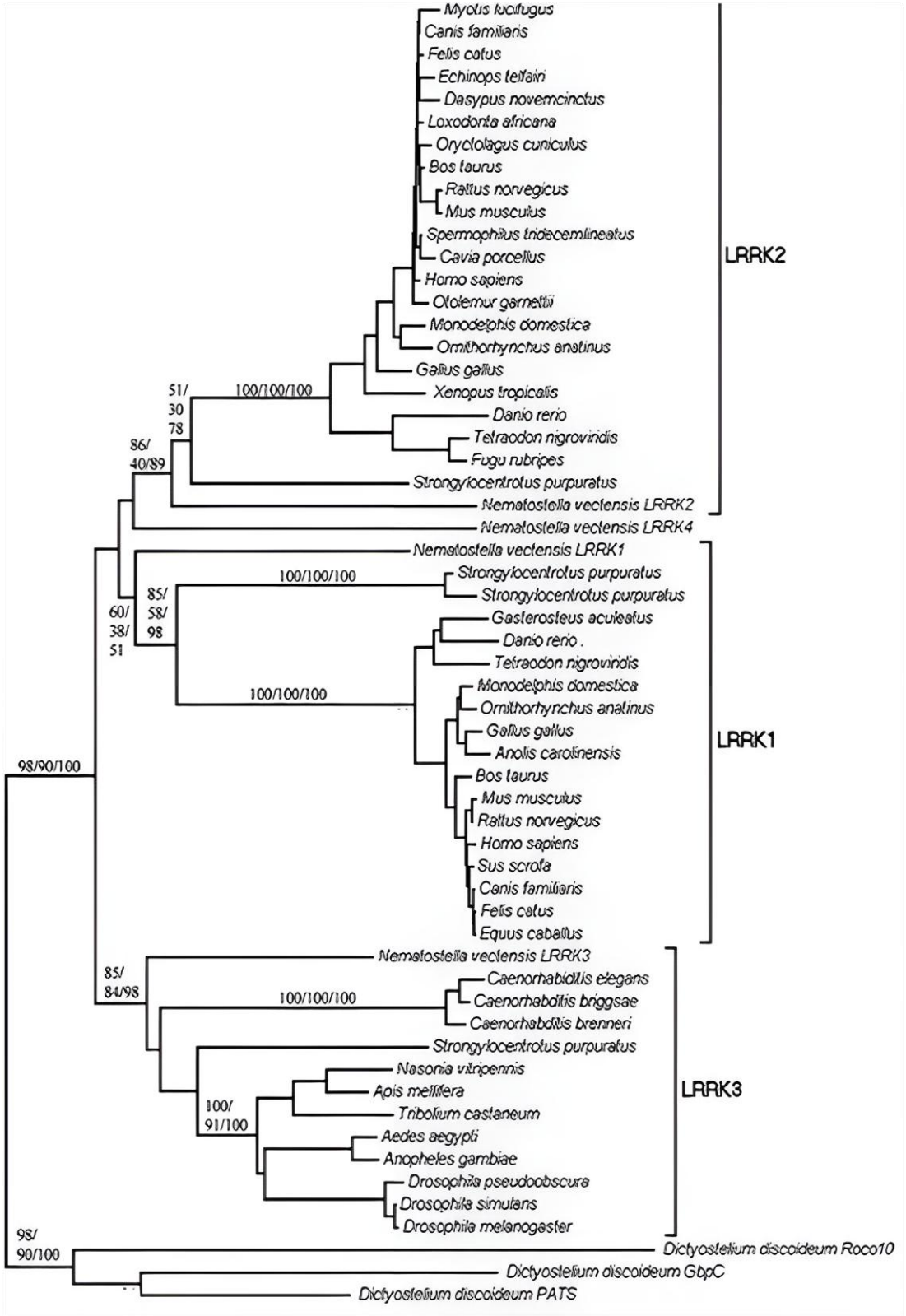


Figura 7 ***Dendrogramma dei geni LRRK*** Dendrogramma ottenuto analizzando le sequenze dei domini COR. La topologia mostrata è quella dedotta utilizzando il metodo neighbor joining (NJ). I numeri si riferiscono alle percentuali di repliche bootstrap che supportano i rami corrispondenti. I tre numeri corrispondono, rispettivamente, alle analisi NJ, massima parsimonia (MP), maximum likelihood (ML). Sono mostrati solo i rami supportati dai tre metodi e in cui il supporto bootstrap è superiore al 50% in almeno due di essi **(I. Marìn, 2008)**.

1.4. Drebrin

La corretta organizzazione del sistema nervoso si realizza tramite eventi programmati durante lo sviluppo neuronale. Questi eventi includono neurogenesi, migrazione cellulare e formazione di sinapsi e sottostanno all'espressione di molecole chiave dipendenti dallo stadio di sviluppo e specifiche del tipo cellulare. Drebrin è una di queste molecole e può infatti contribuire, almeno in parte, ai meccanismi molecolari dello sviluppo neurale. La crescita dei processi cellulari neuronali, assoni e dendriti, è il primo passo nella formazione di una rete neuronale cerebrale e diversi studi hanno indicato Drebrin come uno dei regolatori intracellulari della morfogenesi neuronale (T. Shirao, 2017).

Drebrin è stata scoperta dal tetto ottico di pollo da Shirao e collaboratori nel 1985 (T. Shirao, 1985) ed indicata come "proteina cerebrale regolata dallo sviluppo". Ad oggi Drebrin è classificata in 3 isoforme (E1, E2, A) generate dallo splicing alternativo a partire da un singolo gene *DBN1* (N. Kojima, 1993). Si noti che nei mammiferi esiste solo una isoforma embrionale Drebrin E, mentre i polli hanno due isoforme embrionali. L'espressione di ciascuna isoforma dipende dallo stadio di sviluppo. Infatti nel 1996, lo stesso gruppo di ricerca ha scoperto che Drebrin A è altamente concentrata nelle spine dendritiche del cervello di ratto adulto ed è quindi specifica delle cellule neuronali (T. Shirao, 2017).

È stato suggerito che il citoscheletro di actina sia uno dei fattori endogeni più importanti che controllano la morfogenesi neuronale ed esso, a sua volta, è modulato da proteine che legano l'actina e che di conseguenza regolano le strutture cellulari. Drebrin è stata riconosciuta come modulatore dell'actina in quanto le diverse isoforme dalla Drebrin A sono ampiamente distribuite sia nei tessuti non nervosi che in quelli nervosi (T. Shirao, 1994). Inoltre, è stata trovata sul lato ricevente di vari sistemi di comunicazione intercellulare, come giunzioni gap, giunzioni di aderenza, sinapsi immunologiche e neuronali. È importante considerare che tutte le isoforme di Drebrin sono proteine acide e altamente fosforilate, quindi nel complesso Drebrin è una fosfoproteina strettamente correlata al citoscheletro di actina (K. Tanabe, 2014).

1.4.1. DBN1 Struttura e isoforme

Le drebrine di tutte le specie sono classificate in una forma embrionale che manca della sequenza Ins 2 e in una forma adulta che contiene la sequenza Ins 2. Il pollo possiede due isoforme embrionali, le drebrine E1 ed E2, e un'isoforma adulta, Drebrin A. Nei mammiferi, invece, sono state segnalate solo un'isoforma embrionale, Drebrin E, e un'isoforma adulta, Drebrin A. I pesi molecolari apparenti delle drebrine E1, E2 e A del pollo sono rispettivamente di 95, 100 e 110 kDa, anche se il clonaggio molecolare delle drebrine del pollo ha rivelato che i loro pesi molecolari, secondo le sequenze aminoacidiche dedotte, sono rispettivamente di 62.165, 66.553 e 71.532 kDa. Questa discrepanza tra il peso molecolare apparente in SDS-PAGE e il peso molecolare degli aminoacidi dedotti

è conservata tra le specie ed è probabilmente dovuta alla natura acida delle drebrine. Ad esempio, il peso molecolare dedotto di Drebrin A nel ratto è 77.471, inferiore al suo peso molecolare apparente determinato su SDS-PAGE (140 kDa) (Shirao, 2017).

Tra le isoforme di Drebrin (Figura 8), Drebrin E1 è costituita da 564 aminoacidi ed è espressa nelle prime fasi dello sviluppo. Drebrin E2, composta da607 amminoacidi ha, al centro, un'ulteriore sequenza di inserimento di 43 amminoacidi (Ins1) rispetto a Drebrin E1. Drebrin A, denominata così in seguito alla scoperta della sua maggiore espressione in età adulta, è complessivamente formata da 653 amminoacidi e presenta un'ulteriore sequenza di 46 amminoacidi (Ins2) a monte dell'inserzione Ins1. È stato confermato che Ins 1 e Ins 2 sono esoni separati e indipendenti del gene di Drebrin e che i tre mRNA sono trascritti da un singolo gene attraverso meccanismi di splicing alternativo (Kojima, 1988).

La previsione della struttura secondaria di Drebrin (Figura 9) con il metodo di Kyte e Doolittle (1982) (J. Kyte, 1982) ha suggerito che il dominio N-terminale (C1) può essere suddiviso in tre: il dominio più N-terminale (C1a) è relativamente idrofobo e ha il potenziale per formare tratti ripetuti di β-foglietti separati da brevi tratti di α-elica. Questa regione è seguita da una regione ad α-elica allungata e idrofila (dominio C1b) contenente due regioni che legano l'actina (AB1 e AB2). La sequenza Ins2 è inclusa nel dominio C1c, in cui sono concentrati i β-turn. Il dominio C1a può formare un nucleo globulare relativamente stabile, chiamato dominio dell'omologia del fattore depolimerizzante l'actina (ADF-H) (M. Poukkula, 2011). La sequenza di 85 aminoacidi all'interno del dominio C1b (chiamato anche dominio coiled-coil) contribuisce al legame e al rimodellamento dell'F-actina (EE. Grintsevich, 2010).

Il dominio C-terminale è costituito da due domini V1 e V2 separati da un breve dominio conservato, C2. Il dominio V1, oltre a includere la sequenza di Ins1 nel pollo, presenta una ripetizione di dieci residui di prolina che può contribuire all'interazione con altre proteine (A. Mammoto, 1998), quindi i domini conservati nella regione C-terminale svolgono una funzione nell'interazione con proteine intracellulari diverse dall' F-actina. Un'altra scoperta importante è stata che Drebrin a tutta lunghezza e il suo costrutto troncato C-terminale Drb1-300 causano gli stessi cambiamenti morfologici sull'F-actina. Ciò significa che i cambiamenti morfologici indotti da Drebrin sull' F-actina sono mediati attraverso i suoi domini N-terminali piuttosto che la sua parte C-terminale intrinsecamente disordinata. Questo permette di ipotizzare che isoforme di Drebrin più corte (Drebrin E e s-Drebrin A) indurranno gli stessi cambiamenti nella morfologia dell'actina di Drebrin A neuronale (S. Sharma, 2011).

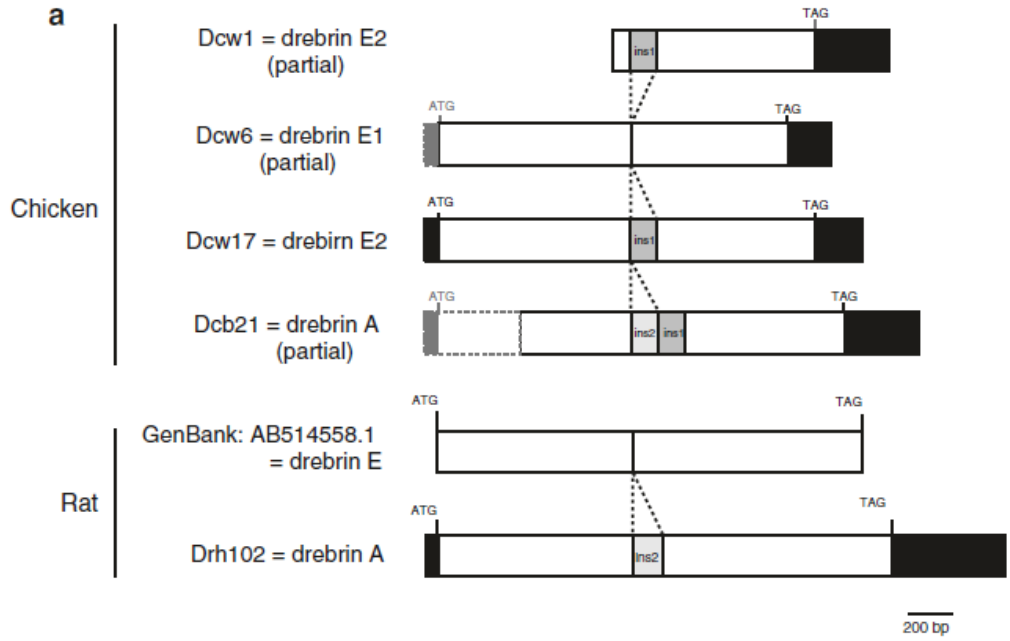
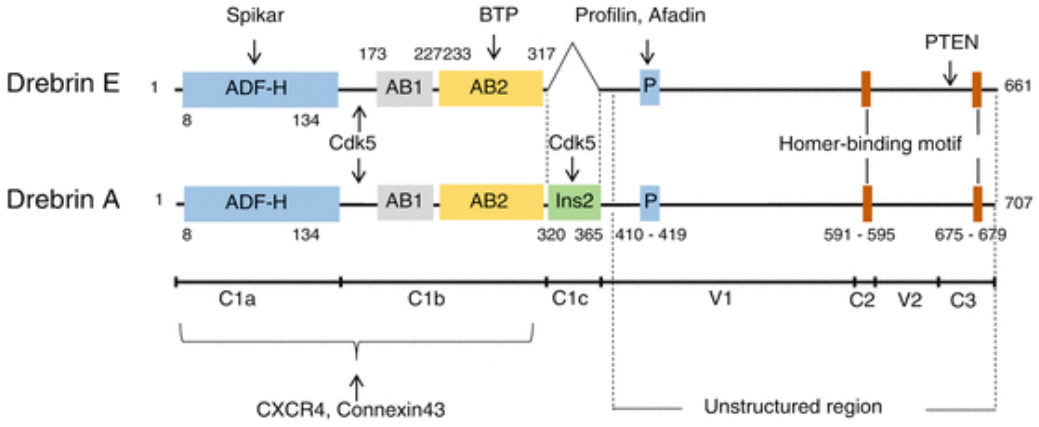


Figura 8 ***Struttura dei cDNA di Drebrin e struttura del dominio delle proteine dedotte.*** Allineamento delle sequenze di cDNA di Drebrin di pollo e di ratto. I rettangoli tratteggiati e neri indicano rispettivamente le regioni codificanti e non codificanti. I rettangoli ombreggiati indicano le sequenze di inserzione (Ins1 e Ins2) **(T. Shirao, 2017)**.



ADF-H : ADF homology domain (drADF-hd)
AB1 : Actin-binding region 1 (CC, HCM)
AB2 : Actin-binding region 2 (Hel, drABD, MAR)
Ins2 : Ins 2 (Drebrin-A-specific sequence)
P : Proline-rich region
H : Homer-binding motif

Figura 9 ***Rappresentazione schematica delle strutture dei domini di Drebrin nel ratto.*** Drebrin A presenta un'inserzione "Ins2" che non è presente in Drebrin E. Drebrin E di ratto corrisponde a Drebrin E2 di pollo. È indicato un diagramma dei domini conservati (C1a, C1b, C1c, C2 e C3) e variabili (V1 e V2) nella sequenza amminoacidica dedotta. **(T. Shirao, 2017)**

1.4.2. DBN1: Funzione ed espressione

La conversione di Drebrin dall' isoforma E all'isoforma A avviene in parallelo con la sinaptogenesi. Drebrin A è, infatti, altamente concentrata nelle spine dendritiche e il suo livello di accumulo è regolato dall'attività sinaptica. Al contrario, Drebrin E, che manca di Ins2, si trova in altri tipi cellulari diffusi in vari tessuti. Andando più nel dettaglio, si è visto che Drebrin E1 è abbondante nello stadio di sviluppo in cui i neuroni migrano, mentre l'isoforma E2 è abbondante nello stadio in cui i neuroni estendono i loro processi cellulari, mentre l'aumento dell'espressione di Drebrin A inizia con l'inizio della maturazione della rete neuronale, che segna la differenziazione terminale delle connessioni sinaptiche tra assoni e dendriti (N. Kojima, 1993).

L'isoforma Drebrin E è distribuita uniformemente in tutto il cervello con una bassa espressione, mentre Drebrin A è abbondante nel proencefalo, ma presente solo a bassi livelli nella corteccia cerebellare. L'elevata concentrazione di Drebrin A nel proencefalo suggerisce che il suo ruolo nel cervello adulto è correlato all'apprendimento e alla memoria, funzioni caratteristiche di queste aree cerebrali. Inoltre, attraverso microscopia elettronica si è visto che questa proteina è localizzata nei siti postsinaptici (T. Shirao, 2017).

Nel 1999 Shirao e collaboratori hanno dimostrato con successo che Drebrin A, oltre a promuovere la crescita in modo specifico delle spine dendritiche, forma un complesso con l'actina e la miosina inibendo l'attività ATPasi della miosina II attivata dall'actina, suggerendo che Drebrin regola l'interazione actina-miosina attraverso il legame con l'actina (K. Hayashi, 1999). Ciò evidenzia il ruolo centrale di Drebrin nella formazione delle spine (C. Aoki, 2005) e nella plasticità sinaptica attraverso il controllo dell'interazione actina-miosina nelle spine dendritiche (H. Takahashi, 2006) (T. Mizui, 2014).

Nel 2006, è stata avanzata l'ipotesi che il cambiamento di localizzazione di Drebrin, dipendente dall'attività del recettore N-metil-d-aspartato (NMDA), modifichi l'associazione dell'F-actina con altre proteine delle spine dendritiche leganti l'actina, portando di conseguenza a cambiamenti nella morfologia delle spine dendritiche durante la plasticità sinaptica (Y. Sekino, Activation of N-methyl-D-aspartate receptor induces a shift of drebrin distribution: disappearance from dendritic spines and appearance in dendritic shafts., 2006). Ishikawa e collaboratori hanno riportato che la Drebrin E di ratto si lega ai filamenti di actina con una stechiometria di 1:5 e una costante di dissociazione (Kd) di 1,2 x 10^{-7} M ed è stato dimostrato che inibisce l'attività di legame della tropomiosina con l'actina. La costante di dissociazione della tropomiosina cerebrale è 5 x 10^{-6} M, inferiore a quella di Drebrin E (R. Ishikawa, 1994). In seguito a diversi studi si è notato che, la sovraespressione di Drebrin, causa l'esclusione della tropomiosina dai filamenti di actina determinando la comparsa di fasci spessi e curvi di filamenti di actina, diversi dalle fibre di stress dritte leganti la tropomiosina.

Questi risultati possono riflettere l'affinità maggiore di Drebrin per l'actina, tuttavia anche il legame tra Drebrin e l'actina subisce una riduzione del 70% in presenza di tropomiosina. Pertanto è stata proposta l'ipotesi che Drebrin abbia due siti di legame con l'actina, uno dei quali è sensibile alla tropomiosina e l'altro è un sito di legame con l'actina insensibile alla tropomiosina. Inoltre sembra che Drebrin possa legarsi ai lati dei filamenti di actina come la tropomiosina. Questi risultati suggeriscono che Drebrin e la tropomiosina si legano in modo competitivo ai filamenti di actina attraverso siti di legame con l'actina simili tra loro. La tropomiosina è coinvolta nella stabilità dei filamenti di actina. Pertanto, l'espressione di Drebrin provoca la dissociazione della tropomiosina dai filamenti di actina, competendo per i suoi siti di legame e formando spessi fasci ricurvi. Questo di conseguenza porta ad una riduzione della stabilità dei filamenti di actina.

Pertanto, l'ambiente cellulare potrebbe diventare più plastico. Tuttavia, molte linee cellulari esprimono Derbrin senza formare fasci curvi e mantenendo le fibre diritte per questo è stato suggerito che Drebrin abbia un'attività di aggregazione dell'actina in condizioni specifiche. Ad esempio si è visto che in cellule trasfettate la sovra-espressione della regione di Drebrin AB2 può consentire a Drebrin il raggruppamento delle F-actine legate a Drebrin. Complessivamente l'F-actina legata a drebrin mostra un crossover elicoidale più lungo (40nm), una maggiore stabilità al calore e una velocità di depolimerizzazione più lenta (Shirao, 2017). Un'altra importante caratteristica dell'interazione di Drebrin con l'F-actina è la sua cooperatività vincolante (S. Sharma, 2011), ovvero il legame di una molecola drebrin al polimero F-actina influenza l'affinità per la molecola successiva.

Durante lo sviluppo, Drebrin A si localizza sulle membrane dei dendriti, nei siti di contatto iniziale tra questi e gli assoni (C. Aoki, 2005). Più nello specifico, l'attività sinaptica ne determina l'accumulo in questi siti postsinaptici. Ad esempio, l'attività del recettore AMPA promuove la stabilizzazione di Drebrin A nei siti sinaptici. I filamenti di F-actina stabili e dinamici si localizzano rispettivamente al centro e alla periferia delle spine dendritiche (N. Honkura, 2008). Come accennato, l'F-actina legata a Drebrin è stabile con un crossover elicoidale più lungo. Inoltre Drebrin si trova al centro delle spine dendritiche, il che indica che l'F-actina stabile al centro delle spine dendritiche è costituita da F-actina legata a Drebrin. In aggiunta a ciò è bene evidenziare che l'afflusso di Ca^{2+} dipendente dall'attivazione dei recettori NMDA stimola l'attività l'ATPasica della miosina II e di conseguenza induce l'esodo dell'F-actina legata a Drebrin dalle spine dendritiche, con conseguente inizio della plasticità sinaptica morfologica. Una volta che le spine sono andate incontro a cambiamenti morfologici, la progressiva diminuzione di AMPAR e l'inibizione del riaccumulo di Drebrin determinano l'inibizione di NMDA, di conseguenza drebrin potrà rilegarsi all'F-actina nella regione centrale conferendo stabilità morfologica alle spine (Figura 10) (N. Kojima, 2016). È bene evidenziare che con l'invecchiamento l'espressione di Drebrin A diminuisce, conseguentemente si verifica un'inibizione della

conversione dell'isoforma E nella isoforma A, per di più in parallelo si degrada l'actina. Questo causa una compromissione della plasticità sinaptica, che porta a sinapsi aberranti e possibile insorgenza di deficit cognitivo.

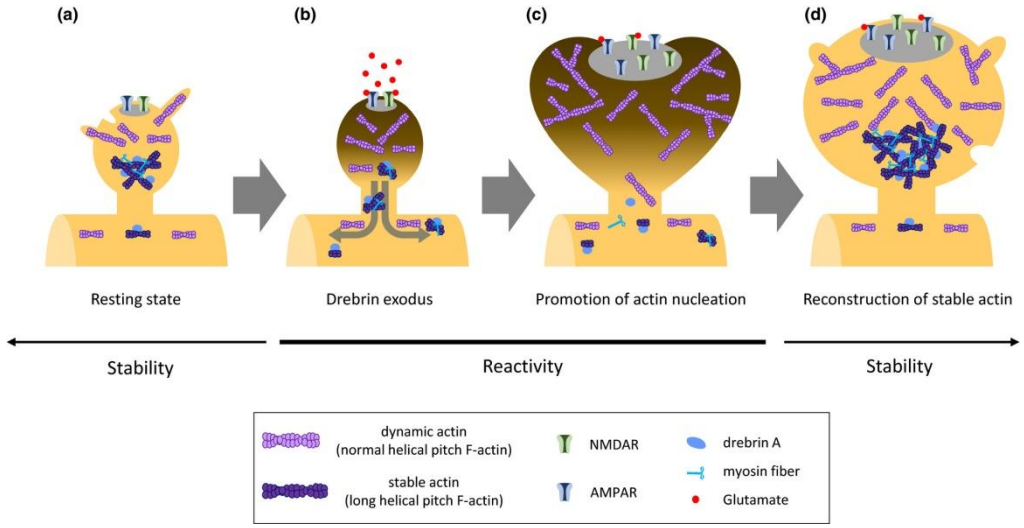


Figura 10 ***Rappresentazione schematica del citoscheletro di actina durante la plasticità sinaptica.*** (a) Le spine dendritiche allo stato stazionario contengono F-actina dinamica (F-actina a passo elicoidale normale) e F-actina stabile (F-actina a passo elicoidale lungo). (b) Quando il Ca2+ entra attraverso i recettori NMDA, attiva la miosina II ATPasi e induce l'esodo di Drebrin. (c) La G-actina riempie la spina dendritica e viene promossa la nucleazione dell'actina. Di conseguenza, la polimerizzazione della F-actina dinamica è facilitata e la spina si allarga. (d) La concentrazione di Ca2+ torna a un livello normale e il recettore AMPA si accumula. (e) Il prolungato aumento del Ca2+ intracellulare inibisce il riaccumulo di Drebrin. Quindi, un basso livello di Drebrin facilita l'endocitosi di AMPAR, con conseguente diminuzione della densità di AMPAR sulla membrana postsinaptica. Poiché l'attività di AMPAR è necessaria per il riaccumulo di Drebrin, la diminuzione di AMPAR e l'inibizione del riaccumulo di Drebrin formano un circuito di feedback positivo **(Y. Sekino, 2017)**.

Drebrin induce cambiamenti morfologici nelle spine dendritiche

Le spine dendritiche sono strutture ricche di actina capaci di cambiare forma durante la maturazione o in risposta agli stimoli sinaptici. Il cambiamento di forma delle spine influenza l'attività postsinaptica, perché altera la forma delle zone attive postsinaptiche o la distribuzione dei recettori. Si ritiene che il dinamismo dei filamenti di actina sia responsabile del cambiamento di forma delle spine. Poiché Drebrin è localizzata nelle spine dendritiche, si suppone che abbia un ruolo nella regolazione dell'organizzazione citoscheletrica e quindi nella regolazione della morfologia e della funzione fisiologica delle spine. L'effetto di Drebrin sulla forma delle spine dendritiche è stato esaminato per la prima volta in colture di neuroni dissociati da corteccia cerebrale di ratto, trasfettati con il costrutto GFP-Drebrin (K. Hayashi, 1999). Dai risultati si è notato che la fluorescenza verde è molto intensa nel corpo cellulare e negli alberi dendritici quando viene trasfettato il costrutto esprimente solo la GFP. Al contrario, quando viene trasfettato il costrutto esprimente Drebrin in fusione con la GFP, la

fluorescenza è rilevata nelle teste delle spine. Inoltre le spine marcate con GFP-drebrin erano significativamente più lunghe di quelle marcate con GFP. È interessante notare che la GFP-Drebrin priva del dominio di legame con l'actina non si localizzava nelle spine e non induceva l'allungamento, indicando che la localizzazione di Drebrin nelle spine è dovuta al suo legame con l'actina e che l'allungamento è dovuto al rimodellamento dei filamenti di actina da parte di Drebrin (V. Biou, 2008). Queste osservazioni indicano che Drebrin è un regolatore della forma delle spine. È stata esaminata anche la regolazione da parte di Drebrin dei recettori dei neurotrasmettitori. La deplezione di Drebrin riduce i livelli dei recettori NMDA e del recettore della dopamina D1 nelle spine dendritiche dei neuroni dell'ippocampo (H. Takahashi, 2006) (G. Jung, 2015), mentre la sovraespressione di Drebrin A causa un aumento della trasmissione sinaptica glutamatercica, probabilmente attraverso un aumento della densità dei siti sinaptici attivi. La diminuzione dell'espressione di Drebrin A, invece, porta ad una diminuzione dell'attività sinaptica sia glutammatergica sia GABAergica. Complessivamente questi studi hanno dimostrato che Drebrin presenta attività di induzione delle spine, di regolazione della loro morfologia, di assemblaggio delle proteine postsinaptiche e di modulazione della trasmissione sinaptica (A. Ivanov, 2009).

1.4.3. DBN1 conservazione filogenetica

Le drebrine sono state rilevate nel cervello di varie specie mediante tecniche di immunoistochimica e di immunoblotting, mentrei cDNA di Drebrin sono stati clonati nel pollo, nel ratto e nell'uomo. Dal confronto dei cDNA è emerso che l'identità aminoacidica complessiva delle sequenze ottimali allineate di Drebrin A tra pollo e ratto è del 68%. In particolare, l'omologia della metà N-terminale comprendente la sequenza Ins2 (denominata dominio C1) e di due brevi regioni nella regione C-terminale (domini C2 e C3) è maggiore dell'85%. Queste regioni sono conservate anche nell'uomo (M. Toda, 1993). Inoltre è stato dimostrato che la sequenza Ins2 di ratto, topo e umano è quasi identica. Oltre a ciò, si ritiene che Drebrin E dei mammiferi sia omologa a Drebrin E2 di pollo, ma non alla isoforma E1 a causa della mancanza di Ins1 in questa isoforma. La ricerca di omologia computerizzata nei due database di sequenze proteiche disponibili (NBRF-PDB e Swiss-PROT) ha rivelato che le sequenze amminoacidiche dedotte delle diverse isoforme di drebrin non presentano alcuna omologia significativa con altre sequenze proteiche note (M. Jin, 2002).

Nel ricercare l'origine di Drebrin, la prima proteina che ha mostrato di avere una significativa similarità con Drebrin è SH3P7, una proteina legante l'actina identificata come proteina contenente il dominio SH3. La metà N-terminale di SH3P7 ha un'elevata omologia con l'N-terminale di Drebrin, conosciuta come dominio ADF-H. Il dominio ADF-H è un modulo che lega l'actina, che è presente nei membri di una famiglia di proteine che consiste di cinque classi

filogeneticamente distinte: ADF/cofilins, twinfilins, coactosins, fattori di maturazione della glia (GMFs), e Drebrin/Abp1 (Figura 11) (M. Poukkula, 2011). È stato proposto che queste cinque classi di proteine del dominio ADF-H si siano evolute da una comune proteina ancestrale. Per di più sembra che Drebrin/Abp1 mostri una maggiore omologia con ciascun membro appartenente alla famiglia di proteine del dominio ADF-H (H. Yamazaki, 2001).

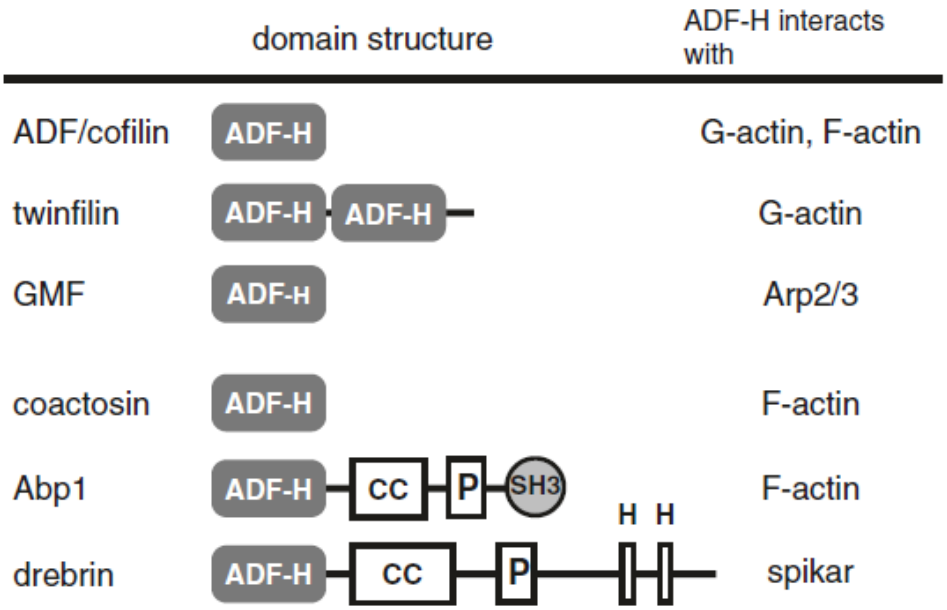


Figura 11 ***Diagramma che confronta le strutture dei domini delle proteine con il dominio ADF-H e la loro capacità di legare altre proteine***. Le ADF/cofilins, il fattore di maturazione della glia (GMF) e la coactosin sono costituite da un singolo dominio ADF-H. La Twinfilin è composta da due ripetizioni in tandem del dominio ADF-H. Abp1 e Drebrin sono proteine multidominio che presentano un singolo dominio ADF-H oltre a un dominio coiled-coil (CC), un dominio ricco di proline (P), un dominio SH3 (SH3) e siti di legame Homer (H) **(M. Poukkula, 2011)**.

2. Scopo dello studio

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di indagare nel dettaglio l'interazione tra LRRK2 e Drebrin.

LRRK2 è una proteina dinamica, molto importante nella patogenesi del PD. È stata definita un "hub molecolare" in quanto, grazie alla presenza di diversi domini enzimatici e di interazione proteina-proteina, è in grado di formare complessi con diversi substrati, influenzandone anche l'attività (R. Wallings, 2015). Dati precedentemente raccolti nel nostro gruppo di ricerca e in altri laboratori, suggeriscono chiaramente un ruolo chiave di LRRK2 nella sinapsi e, in particolare, nel compartimento presinaptico.

LRRK2 interagisce fisicamente con le SV e il citoscheletro di actina, fornendo l'impalcatura per l'esecuzione della segnalazione locale e l'espletamento delle

principali funzioni sinaptiche (L.Civiero, 2018). L'associazione fisica e funzionale tra LRRK2 e alcune proteine del citoscheletro è stata evidenziata da numerosi studi (L. Parisiadou, 2010). I principali componenti del citoscheletro, actina e microtubuli, contribuiscono allo sviluppo e al mantenimento del sistema nervoso; non a caso l'assemblaggio di elementi citoscheletrici anormali è annoverata tra i fattori implicati nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, come ad esempio il PD. È stato visto che LRRK2 interagisce con la tubulina attraverso il dominio ROC e regola l'attività delle proteine ERM e la dinamica dell'actina, influenzando la crescita dei neuriti durante lo sviluppo (A. Meixner, 2011). Mutazioni in LRRK2 possono, quindi, comportare una deregolazione della dinamica dei microtubuli compromettendo la corretta funzione neuronale (B. M. H. Law, 2014). È stato dimostrato che l'assenza di LRRK2 promuove il reclutamento della PKA all'interno delle spine dendritiche. Questa a sua volta fosforila il recettore del glutammato GluR1, fondamentale nella maturazione e plasticità di queste strutture specializzate (J. A. Esteban, 2003).
Le spine dendritiche, essendo elementi molto dinamici e ricchi di actina, sono capaci di cambiare la loro morfologia durante la maturazione o in risposta a stimoli, collocandosi alla base della plasticità sinaptica (S. B. Chidambaram, 2019). Il cambiamento di forma delle spine influenza l'attività postsinaptica perché altera la struttura delle zone attive postsinaptiche e/o la distribuzione dei recettori. Ne consegue che danni a tali strutture e alla sinapsi più in generale possono ledere il trasferimento di informazioni e la capacità del sistema nervoso di modificare la propria organizzazione, portando allo sviluppo di una condizione patologica. A questo proposito, nel corso degli anni sempre più evidenze indicano che la perdita e la vulnerabilità sinaptica, tra cui alterazioni delle spine dendritiche, costituiscono eventi patologici precoci in diverse malattie neurodegenerative (J. C. Fiala, 2002).

Il razionale di questo studio si basa su alcuni dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio volti a comprendere se e come LRRK2 influenzi il processo di formazione delle spine detritiche, nonché la loro maturazione e dinamica. Nello specifico è stata condotta un'analisi *unbiased* volta a studiare l'interattoma di LRRK2 e come questo cambi in seguito al trattamento con il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF), usato come modello per studiare questo processo in vitro, dato il suo ruolo consolidato nella plasticità delle spine dendritiche e nel potenziamento a lungo termine. A questo scopo, sono state utilizzate linee cellulari immortalizzate di SH-SY5Y, già presenti nel nostro laboratorio, che sovraesprimono stabilmente LRRK2 "taggata"con GFP (*green fluorescent protein*) all'N-terminale o oppure linee esprimenti stabilmente solo la GFP (controllo negativo). Queste due linee sono state differenziate con acido retinoico (RA) per ottenere cellule simil-neuronali che esprimono un profilo proteico simile a quello dei neuroni e, dopo aver purificato la proteina di interesse, sono state eseguite analisi di spettrometria di massa (MS) che hanno rilevato i potenziali

interattori di LRRK2 (Figura 12 A). I dati ottenuti mostrano che LRRK2 interagisce con proteine coinvolte nella dinamica del citoscheletro di actina (Figura 12 B).

Ancora più interessante è che attraverso un'analisi di gene ontology (GO) condotta con la piattaforma SynGO specificatamente a livello della sinapsi è emerso che una parte consistente di questi interattori si localizza a livello della postsinapsi (Figura 13).

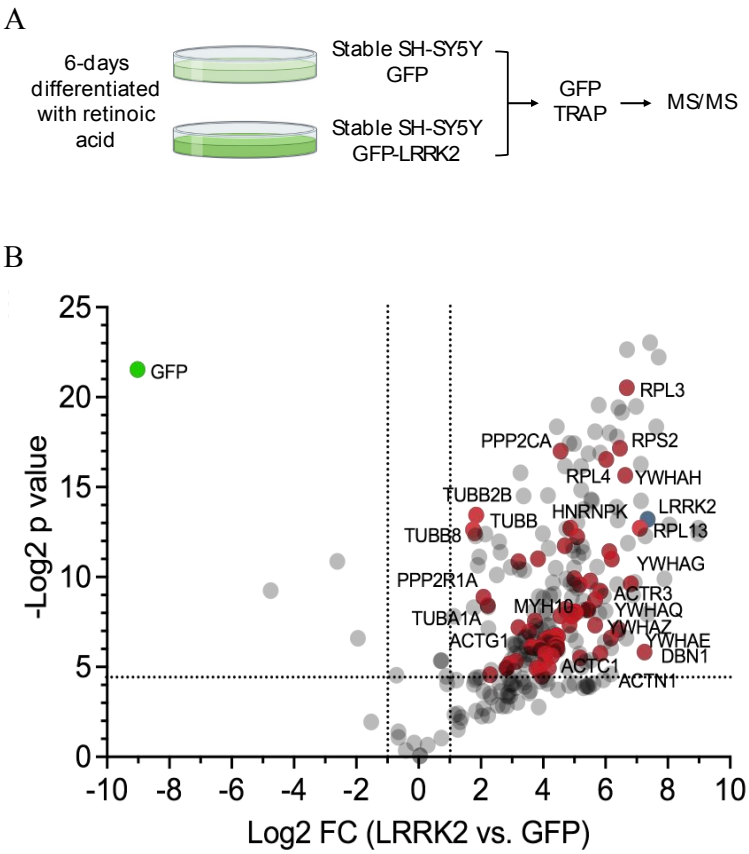


Figura 12 ***LRRK2 interagisce con proteine coinvolte nella dinamica del citoscheletro di actina***. (A) schema dell'esperimento. (B) Scatter plot dell'analisi di MS che mostra l'interattoma di LRRK2. L'asse x riporta l'entità del cambiamento nelle interazioni proteina-proteina dei tre replicati biologici. L'asse y riporta la significatività statistica. Le proteine che interagiscono con LRRK2 in tutte le tre repliche biologiche sono visibili nella parte destra del grafico. In rosso sono marcati gli interattori coinvolti nella dinamica del citoscheletro di actina.

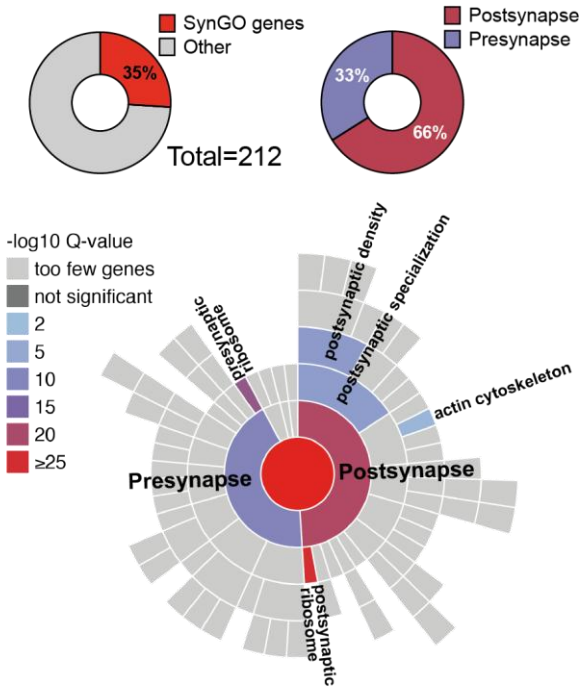


Figura 13 ***Molti degli interattori di LRRK2 sono proteine postsinaptiche conivolte nella dinamica del citoscheletro di actina.*** Rappresentazione grafica dell'analisi di arricchimento GO per le funzioni biologiche condotta sugli interattori della spettrometria di massa attraverso la piattaforma SynGO.

Successivamente LRRK2 è stata purificata da queste linee cellulari in presenza o assenza di BDNF e i campioni sono stati sottoposti all'analisi di MS (Figura 14 A). Quello che è emerso è che l'interattoma di LRRK2 è rimodellato in presenza di BDNF, con alcune proteine che aumentano la loro interazione con LRRK2 ed altre che la diminuiscono (Figura 14 B). Eseguendo un'analisi di arricchimento GO per le funzioni biologiche è stato dimostrato che la maggior parte dei partner di LRRK2 che aumentano la loro interazione con quest'ultima in seguito alla stimolazione di BDNF sono ancora una volta coinvolti nella dinamica del citoscheletro di actina, suggerendo che il trattamento con BDNF aumenta il legame di LRRK2 con le proteine regolatrici dell'actina (Figura 15 A). Inoltre, tali interattori formano una rete altamente interconnessa, come dimostrato dall'analisi condotta con String, una piattaforma online per visualizzare la rete di interazioni costituita da proteine di interesse (Figura 15 B). È interessante notare come la centro di questa rete sia posizionata Drebrin (Figura 15 B).

Drebrin è uno dei regolatori intracellulari della morfogenesi neuronale (T. Shirao, 2017). È una fosfoproteina strettamente correlata al citoscheletro di actina (K. Tanabe, 2014). Infatti, l'isoforma adulta di Drebrin, oltre a formare un complesso con l'actina e la miosina, promuove la maturazione delle spine dendritiche (K. Hayashi, 1999). Risulta avere quindi, un ruolo centrale nella formazione delle spine e nella plasticità sinaptica attraverso il controllo dell'interazione actina-miosina nelle spine dendritiche (T. Mizui, 2014).

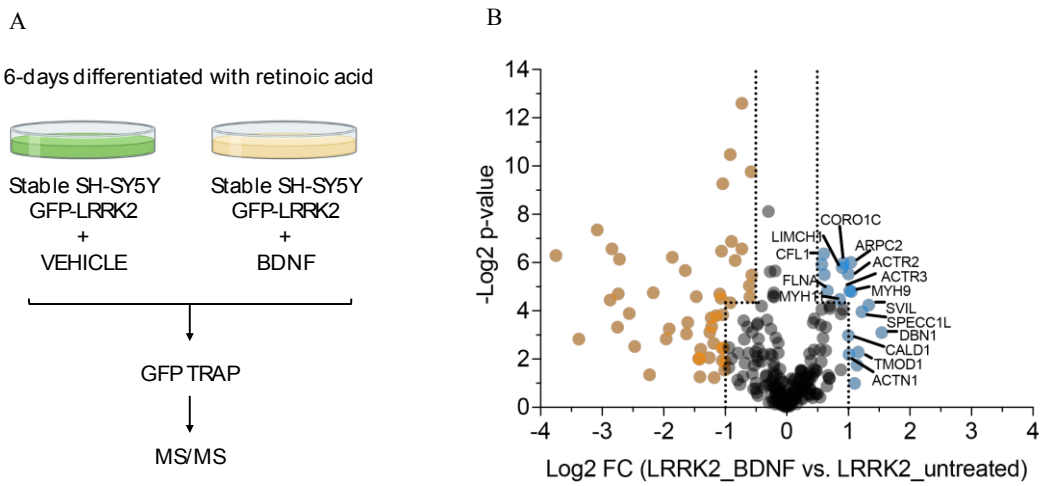


Figura 14 ***Scatter plot dell'analisi di MS che mostra le alterazioni dell'interattoma di LRRK2 dopo 15 minuti di stimolazione con BDNF.*** Le proteine che mostrano una diminuzione dell'interazione con LRRK2 in entrambe le repliche biologiche sono riportate nel quadrante in basso a sinistra. Le proteine che mostrano una maggiore interazione con LRRK2, dopo trattamento con BDNF, in entrambe le repliche biologiche sono riportate nel quadrante superiore destra. La maggior parte dei partner di LRRK2 aumentati dopo la stimolazione con BDNF sono coinvolti nella dinamica del citoscheletro di actina

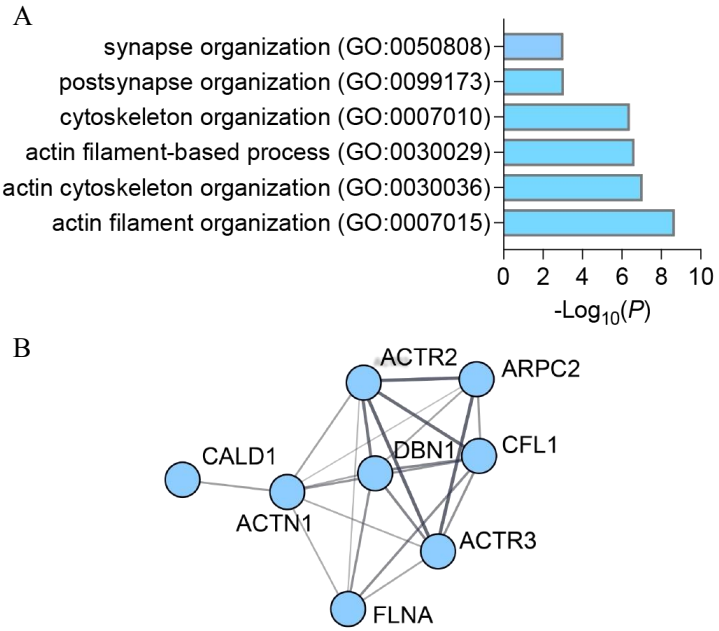


Figura 15 (A) Rappresentazione grafica dell'analisi di arricchimento GO per le funzioni biologiche condotta sugli interattori della spettrometria di massa con aumento dell'interazione con Lrrk2 dopo trattamento con BDNF. La maggior parte dei partner di LRRK2 aumentati dopo la stimolazione con BDNF sono coinvolti nella dinamica del citoscheletro di actina. (B) Drebrin forma l'interazione più significativa upregolata in presenza di BDNF posizionandosi al centro del network.

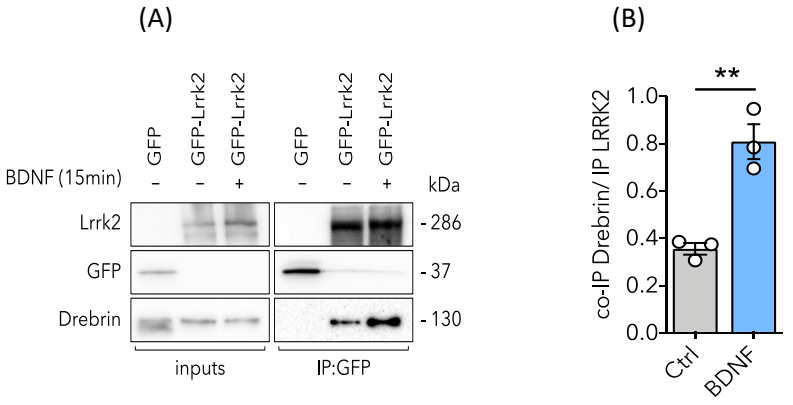


Figura 16 (A) Analisi Western blot della purificazione di Lrrk2-GFP. (B) La quantità di Drebrin che interagisce con Lrrk2 aumenta significativamente in seguito al trattamento con BDNF rispetto allo stato di controllo. Le differenze tra le due condizioni sono state valutate utilizzando il t-test di Student (significatività **p<0,01), n=3 repliche biologiche.

Sulla base dell'arricchimento sostanziale e riproducibile (in 3 esperimenti indipendenti) dell'interazione LRRK2-Drebrin in seguito alla stimolazione con BDNF, abbiamo deciso di caratterizzare il legame tra queste due proteine.

Il primo obiettivo è stato quello di indagare quale dominio di LRRK2 lega Drebrin, attraverso tecniche di immunoprecipitazione (IP). Abbiamo poi analizzato, attraverso coimmunoprecipitazione (co-IP), i domini di Drebrin coinvolti nel'interazione con LRRK2. Parallelamente abbiamo eseguito un saggio di competizione per indagare se LRRK2 e actina competano nel legame con Drebrin. Infine, tramite immunocitochimica (ICC) abbiamo valutato l'effetto di Drebrin sulle crescita dei dendriti in cellule SH-SY5Y LRRK2 WT differenziate e in cellule SH- SY5Y LRRK2 KO. In ultima analisi abbiamo ricostruito la storia evolutiva del gene DBN1 codificante per la proteina Drebrin creando un albero filogenetico.

3. Materiali e metodi

3.1. Costrutti

La GFP-LRRK2 WT e i diversi costrutti di LRRK2 contenenti un tag N-terminale sono stati precedentemente descritti (Greggio et al., 2008) (Figura 17).

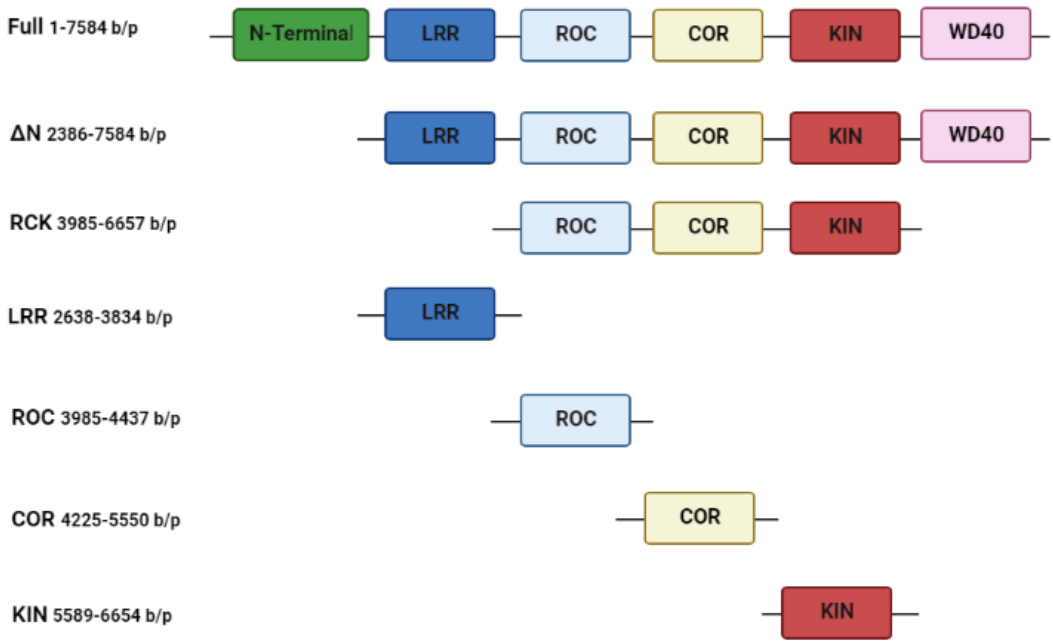
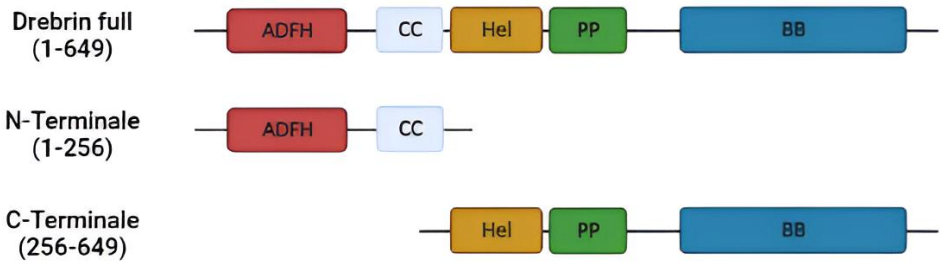


Figura 17 Diagrammi dei domini di LRRK2 e dei costrutti utilizzati per l'analisi.

L'isoforma umana di Drebrina E (disponibile in GenBank con accession no. D17530; GeneCopoeia) e i rispettivi costrutti di delezione sono stati amplificati mediante PCR, come descritto in precedenza (Worth et al., 2013) (Figura 18).

(A)



(B)

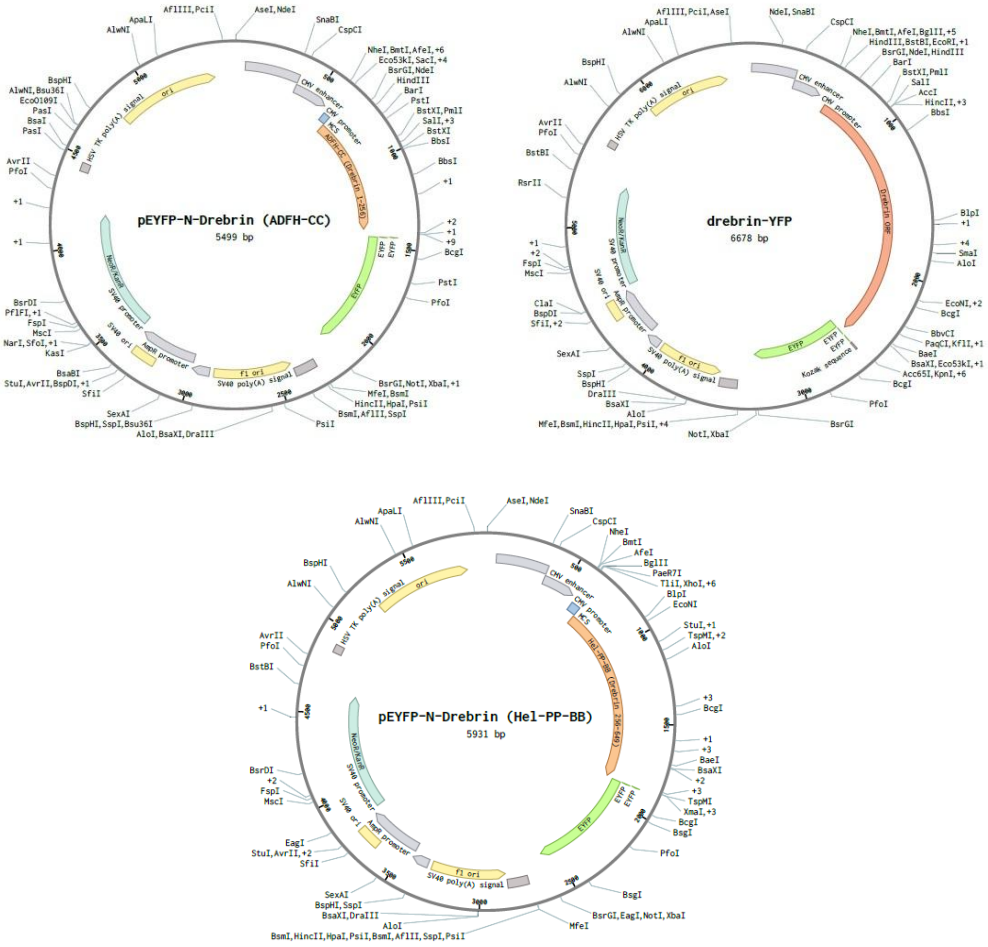


Figura 18 (A) Diagrammi dei domini di Drebrin e dei costrutti usati per le analisi **(Worth et al., 2013).** (B) Rappresentazione grafica della struttura dei plasmidi usati nella trasfezione. I costrutti sono taggati nel C-terminale con YFP.

3.1.1. Amplificazione dei plasmidi

I plasmidi di LRRK2 sono stati utilizzati per trasformare cellule batteriche Top 10, mentre per i plasmidi di DBN1 sono state utilizzate le cellule DHEα: le cellule Top 10 sono state incubate con 10ng di DNA plasmidico, mentre le DHEα sono state trasformate con 50ng di DNA plasmidico. Dopo 30 minuti in ghiaccio sono stati aggiunti 200µL di terreno *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC) (ThermoFisher ScientificTM), quindi le cellule sono state lasciate per 40 minuti a 37°C in agitazione, in modo da far avvenire la trasformazione. In seguito le cellule Top10 sono state seminate in terreno agar solido supplementato con 100µg/mL di carbenicillina (CARB), mentre le DHEα con 100µg/mL di kanamicina (KAN) e incubate per una notte a 37°C. Il giorno seguente da ciascuna piastra sono state prelevate 3 coloniele quali sono state seminate in 5mL di agar liquido supplementato rispettivamente con 5µL di CARB e KAN; tutti gli

inoculi sono stati lasciati crescere in agitatore a 37°C per una notte. Il giorno dopo, prima di procedere con i maxi-inoculi, il DNA plasmidico di LRRK2 è stato estratto utilizzando il kit NucleoSpin Plasmid Transfection-Grade miniprep (ThermoFisher ScientificTM), secondo le istruzioni del produttore allo scopo di controllare che non avesse subito ricombinazioni. Dopo una prima centrifuga di 5 minuti a 11.000rcf, il surnatante è stato rimosso e 150µL di Resuspension Buffer A1 sono stati aggiunti al pellet cellulare. Dopo aver agitato al vortex per ottenere una sospensione omogenea, sono stati aggiunti 250µL di tampone di lisi A2 e mescolati delicatamente capovolgendo le provette per 5 volte; quindi sono stati aggiunti 350µL di tampone di neutralizzazione A3 e mescolati accuratamente capovolgendo le provette fino alla completa scomparsa del colore blu e alla formazione di un precipitato bianco sporco. I campioni sono stati centrifugati per 3 minuti alla massima velocità e questa fase è stata ripetuta fino alla chiarificazione dei lisati. Successivamente, i surnatanti sono stati decantati sulla colonna NucleoSpin Plasmid TG posta in una provetta di raccolta da 2 ml e sono stati sottoposti a centrifugazione per 1 minuto a 11.000 g al minuto per consentire il legame del DNA. Dopo aver scartato il flow-through, la membrana di silice è stata lavata prima con 450µL di Wash Buffer AQ seguita da un'altra identica centrifugazione. Infine, la membrana è stata asciugata centrifugando nuovamente e, dopo aver spostato la colonna in provette da 1,5 mL, sono stati aggiunti 50µL di tampone di eluizione AE, le provette sono state incubate per 1 minuto a RT e centrifugate per 1 minuto a 11.000 g per eluire il DNA. È stata fatta una digestione di controllo sul DNA con gli enzimi Sal1 (ThermoFisher ScientificTM) ed EcoRI (ThermoFisher ScientificTM): a 10µL di DNA sono stati aggiunti 1µL di enzima, 2µL di buffer (Buffer D e Buffer H) e il tutto è stato portato a volume (10uL)di H2OmQ; le mix sono state incubate per 1 ora a 37°C insieme al controllo positivo, ovvero il DNA digerito precedentemente validato, e al controllo non digerito**.** La digestione enzimatica è stata poi verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio, ovvero una tecnica che consente di separare le molecole biologiche in base alla loro dimensione e carica. La percentuale di agarosio che si utilizza determina la grandezza dei pori attraverso i quali le molecole migrano a velocità diverse dal polo negativo (anodo) al polo positivo (catodo). Per la preparazione del gel è stato usato l'agarosio all'1,5% (PanReac AppliChem, Darmstadt, Germania) sciolto in tampone TAE 1X (40mM Tris Base, 1,14mL/L acido acetico, 1mM EDTA) mediante riscaldamento. Dopo la solidificazione del gel, ai campioni è stato aggiunto 1 µL di loading Buffer blu 6X con DNA stain (Jena Bioscience, Jena, Germany), quindi i campioni sono stati caricati nel gel. L'elettroforesi è stata eseguita a 60 V e per determinare le dimensioni delle molecole di DNA è stato utilizzato un DNA ladder da 1kb (Promega, Madison, WI, USA). Come previsto da Benchling, si è osservato un pattern a 5 bande per la digestione con EcoRI e un pattern a 4 bande con l'enzima Sal1. Una volta verificata l'integrità del DNA, si è proseguito con la preparazione di DNA plasmidico su media scala (MIDI)**.** In beute da 1L sono stati inseriti

250mL di terreno agar liquido, 250µL di CARB per LRRK2 e KAN per Drebrin e 100µL di inoculo; le beute sono state incubate in agitatore per una notte a 37°C. È stata eguita un'ulteriore digestione di controllo sul DNA LRRK2 per confermare che i plasmidi non fossero contaminati e non fossero andati incontro a riarrangiamenti. Il DNA plasmidico, infine, è stato estratto utilizzando il kit "*NucleoBond Xtra plasmid purification"*, per l'estrazione di LRRK2 è stato eseguito il protocollo low-copy plasmid purification, mentre per l'estrazione di drebrin il protocollo hight-copy plasmid purificatiton. Le cellule sono state pallettate mediante centrifuga a 6,000 g per 15 minuti a 4°C per eliminare il terreno. Il pellet è stato poi risospeso completamente con Resuspension Buffer (RES) contenente l'RNaseA mediante l'utilizzo del vortex. I batteri sono poi stati lisati con il Buffer di lisi (LYS): dopo aver aggiunto il buffer di lisi, il tubo è stato invertito delicatamente per cinque volte e poi incubato a temperatura ambiente per cinque minuti. Nel frattempo è stata equilibrata la colonna (NucleoBond Xtra Column) contenente un filtro con l'Equilibration Buffer EQU. È stato infine aggiunto il Neutralization Buffer (NEU) alla miscela ed il tutto è stato invertito delicatamente fino a quando il colore blu non è scomparso completamente. Il lisato è stato, quindi, trasferito sulla colonna e, dopo aver eseguito un lavaggio con l'Equilibration Buffer (EQU), il filtro è stato tolto dalla colonna. Un secondo lavaggio è stato realizzato con il Wash Buffer (WASH) ed infine il DNA plasmidico è stato eluito in una falcon da 15 mL utilizzando l'Elution Buffer (ELU) ed è stato raccolto. È stato aggiunto l'isopropanolo a RT e, dopo aver vortexato vigorosamente, il DNA plasmidico è stato fatto precipitare attraverso una centrifuga di 30 minuti a 4°C a 15000 g. Dopo aver rimosso l'isopropanolo è stato aggiunto etanolo e fatta un'ulteriore centrifuga a RT per 5min a 15000 g. Dopo aver rimosso l'etanolo si è lasciato asciugare il DNA plasmidico a RT e infine quest'ultimo è stato risospeso in H2OmQ.
Il DNA è stato quantificato allo spettrofotometro. Le quantità sono riportate nella tabella di seguito:

	Low-copy **plasmid purification**	Hight-copy **plasmid purificatiton**
Buffer RES	16 mL	8 mL
Buffer LYS	16 mL	8 mL
Buffer EQU	12 mL	12 mL
Buffer NEU	16 mL	8 mL
Buffer EQU	5 mL	5 mL
Buffer WASH	8 mL	8 mL
Buffer ELU	5 mL	5 mL
Isopronanol	3,5 mL	3,5 mL
Ethanol	2 mL	2 mL

(Tabella 1)

3.2. Colture cellulari

3.2.1. Cellule HEK293T

Le cellule HEK293T (Life Technologies) sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ThermoFisher ScientificTM, Waltham, MA, USA) supplementato con il 10% di fetal bovine serum (FBS, ThermoFisherScientificTM) e l'1% Penicillin-Streptomycin (PS, ThermoFisher ScientificTM). Le cellule sono state mantenute a 37°C in un'atmosfera umidificata con il 5% di CO_2. Una volta raggiunto l'80% di confluenza, le cellule sono state splittate o piastrate per eseguire gli esperimenti. Il terreno è stato rimosso e le cellule sono state staccate con terreno fresco. Dopo una centrifuga di 5 minuti a 1500 rpm le cellule sono state risospese e contate. Circa 4.000.000 cellule sono state piastrate in dishes di coltura da 100 mm (Sarstedt Limited) in 10 mL di DMEM supplementato, mentre per l'immunocitochimica (sezione 3.4) 80.000 cellule sono state seminate in piastre di coltura cellulare con 24 pozzetti (Sarstedt Limited) contenenti vetrini da 12 mm (Avantor®, Milano, Italia) in 500µl di DMEM supplementato. Le piastre di coltura sono state mantenute a 37°C in un'atmosfera umidificata con il 5% di CO_2. Dopo 24 ore, una volta raggiunto l'80% di confluenza sono state sottoposte a trasfezione.

3.2.2. Cellule SH-SY5Y

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state coltivate in un terreno completo composto da DMEM e Ham's F-12 Nutrient Mixture (F12, ThermoFisher ScientificTM) in rapporto 1:1, supplementato con il 10% di FBS e l'1% PS. Le cellule sono state mantenute a 37°C in un'atmosfera umidificata con il 5% di CO_2. Quando è stato raggiunto l'80-100% di confluenza, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule SH-SY5Y sono state lavate con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, ThermoFisher ScientificTM). Le cellule quindi sono state incubate con tripsina 0.1X (ThermoFisher ScientificTM) per promuoverne il distacco. È stato quindi aggiunto del terreno fresco per inattivare l'enzima proteolitico e, una volta centrifugato per 5 minuti a1500 rpm, il surnatante è stato scartato e le cellule sono state risospese e contate. Circa 80.000 cellule sono state poste in piastre di coltura cellulare da 24 pozzetti (Sarstedt Limited) contenenti vetrini da 12 mm (Avantor®, Milano, Italia) in 500µl di DMEM/F12 addizionato con 1% FBS, 1% PS e 10µM acido all-trans-retinoico (RA, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) per indurre il differenziamento delle cellule di tipo N (cellule simil-neuronali). I vetrini coprioggetto sono stati pretrattati con poli-Lisina 1X (Sigma-Aldrich®) per migliorare l'adesione cellulare: questo componente di attaccamento non specifico aumenta l'interazione elettrostatica tra gli ioni a carica negativa della membrana cellulare e i siti a carica positiva della superficie di coltura disponibili per il legame cellulare. Le cellule sono state successivamente incubate a 37°C in 5% CO_2 (giorno di differenziazione 1). A intervalli regolari di 48 ore, alle cellule in via di differenziamento è stato fornito nuovo RA: il giorno di differenziamento 3, il RA

è stato aggiunto direttamente al terreno di coltura, mentre il giorno di differenziamento 5, il terreno di coltura (integrato con RA) è stato rinfrescato. Le cellule sono state reincubate a 37°C in 5% di CO2 e il processo di differenziamento è stato portato avanti fino al 7° giorno (paragrafo 3.4).

3.2.3. Trasfezione

Per il saggio di purificazione e la successiva analisi di western blot (WB), le HEK293T sono state trasfettate in modo transiente con DNA plasmidico attraverso l'agente tresfettante polietilenimina (PEI, Polysciences), utilizzando un rapporto DNA:PEI di 1:2. Una quantità totale di 20µg di DNA è stata disciolta in 250µl di opti-MEM per i costrutti LRRK2, ROC, COR, RCK, ΔN taggati GFP, mentre per i costrutti LRR e KIN sono stati impiegati 13µg di plasmide; per gli esperimenti di co-immunoprecipitazione sono stati utilizzati 8µg di DNA plasmidico dei costrutti di Drebrin taggati YFP insieme a 12µg di FLAG-LRRK2 in 250µl di opti-MEM. La rispettiva quantità di PEI è stata aggiunta a 250µl di opti-MEM. Dopo 5 minuti le due soluzioni sono state mescolate e incubate per 20 minuti per consentire la formazione di complessi DNA/PEI. Nel frattempo il terreno DMEM contenuto nelle piastre da 100 mm è stato sostituito con 5mL di opti-MEM. La miscela è stata quindi aggiunta alle cellule precedentemente piastrate e dopo 3 ore il terreno è stato cambiato con DMEM supplementato fresco. Trascorse 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate. Per il saggio di competizione e la successiva analisi di WB, le HEK293T sono state trasfettate utilizzando un rapporto DNA:PEI di 1:2. Sono state disciolte in 250 di opti-MEM quantità differenti per il DNA FLAG-LRR2 (0µg, 4µg, 8µg, 12µg) insieme a 8µg di DNA Drebrin full; le diverse quantità di DNA sono state portate tutte a 20µg aggiungendo un DNA Mic-empty. La rispettiva quantità di PEI è stata aggiunta a 250µl di opti-MEM. Dopo 5 minuti le due soluzioni sono state mescolate e incubate per 20 minuti per consentire la formazione di complessi DNA/PEI. Nel frattempo il terreno DMEM contenuto nelle piastre da 100 mm è stato sostituito con 5mL di opti-MEM. La miscela è stata quindi aggiunta alle cellule precedentemente piastrate, dopo 3 ore il terreno è stato cambiato con DMEM supplementato fresco.

Per gli esperimenti di immunoistochimica, le cellule SH-SY5Y WT ed SH-SY5Y KO sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti e trasfettate con DNA il giorno dopo la semina. La trasfezione è stata eseguita utilizzando come agente di trasfezione il PEI, utilizzando un rapporto DNA:PEI di 1:2. Una quantità totale di 1µg di DNA Drebrin full è stata sciolta in 100µl di opti-MEM (Life Technologies) e la rispettiva quantità di PEI è stata aggiunta a 100µl di opti-MEM. Le soluzioni sono state mescolate dopo cinque minuti e incubate per 20 minuti per consentire la formazione di complessi DNA/PEI. La miscela è stata quindi aggiunta goccia a goccia sulle cellule, il cui terreno di coltura era stato precedentemente cambiato

con opti-MEM. Dopo 3 ore il terreno delle cellule è stato sostituito con DMEM/F12 fresco addizionato con 1% FBS, 1% PS e 0,1% di RA.

3.3. Purificazione di proteine

3.3.1. Lisi e quantificazione della proteine

Il terreno di coltura è stato rimosso dalle piastre e le cellule sono state lavate con DPBS. Successivamente sono state lisate in un volume appropriato di buffer di lisi per immunoprecipitazione 1X completo (50 mM Tris base, 0.27 M Saccarosio, 1 mM EGTA (pH 8.0), 10 mM di acido β-glicerol fosforico (sale pentaidrato disodio), 5 mM sodio pirofosfato decaidrato) supplementato con 1 mM di sodio ortovanadato fresco, 0,5% NP-40 e 150 mM NaCl. Dopo la raschiatura, le cellule risospese sono state trasferite in provette da 1,5 mL, incubate in ghiaccio per 30 minuti per ottimizzare il processo di lisi e, quindi, centrifugate per 30 minuti alla massima velocità (>12.000 giri/min) a 4°C. Il pellet è stato scartato, mentre il surnatante è stato raccolto in nuove provette da 1,5 mL e utilizzato per l'immunoprecipitazione (paragrafo 3.3.2). Una piccola quantità di surnatante è stato usato per determinare la concentrazione proteica eseguendo il saggio proteico con acido bicinchoninico (BCA), un metodo colorimetrico basato sulla riduzione di Cu^{2+} a Cu^{1+} da parte dei legami peptidici in un mezzo alcalino e sulla rilevazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva di Cu1+ da parte del BCA. Nella prima fase, i peptidi contenenti tre o più residui aminoacidici formano un complesso chelato di colore azzurro con gli ioni rameici in ambiente alcalino; nella seconda fase, due molecole di BCA reagiscono con una molecola del catione rameico ridotto, che funge da chelante, dando origine a un prodotto di colore viola. Questo complesso BCA/ $Cu1^{+}$ mostra il suo massimo assorbimento di luce a una lunghezza d'onda di 562 nm: l'intensità del colore del prodotto è proporzionale alla quantità di $Cu1^{+}$ formatasi durante la reazione, che a sua volta è direttamente proporzionale alla quantità di proteine presenti nei lisati. La quantificazione si è basata su una curva standard ottenuta utilizzando una concentrazione nota di sieroalbumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich®) ed è stata effettuata con il Kit "*PierceTM BCA Protein Assay*" (ThermoFisher ScientificTM) e utilizzando il lettore di piastre VICTORTM X3 Multilabel (PerkinElmer®, Waltham, MA, USA).

3.3.2. Immunoprecipitazione

I supernatanti sono stati incubati con 15µl di resina di agarosio GFP-Trap R (ChromoTek, Planegg-Martinsried, Germany) per 2 ore a 4°C. La resina era stata precedentemente equilibrata con 2 lavaggi in lysis buffer 1X. Trascorse le 2 ore le resine sono state lavate 3 volte con lysis buffer 1X supplementato con 500 mM NaCl. Tra un lavaggio e l'altro sono state eseguite fasi di centrifugazione (7500g x

2 minuti) per pellettare la resina. Le proteine sono state eluite in 35µl di sample Buffer (SB) 2X (SB, 200mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 400mM DTT, 40% glicerolo, Bromophenol Blu di Bromofenolo, Sigma-Aldrich®, nella quantità necessaria a raggiungere l'intensità di colore desiderata) in modo da avere una concentrazione finale di 1X. I campioni sono stati scaldati una prima volta a 70°C per 15 minuti e centrifugati a 7500g per 2 minuti, la seconda volta sono stati scaldati a 90°C per 5 minuti e nuovamente centrifugati prima di procedere con le analisi di immunoblot quantitativo.

3.3.3. Elettroforesi su gel (SDS-PAGE) e immunoblotting quantitativo

L'immunoblotting quantitativo (western blot), è una tecnica utilizzata per rilevare una proteina in un determinato campione contenente un'ampia gamma di proteine. Questa tecnica prevede la separazione delle proteine presenti nel campione in base al loro peso molecolare attraverso un gel di sodio dodecil solfato e poliacrilammide (SDS-PAGE): l'elettroforesi è il processo mediante il quale le particelle cariche vengono trasportate attraverso un solvente da un campo elettrico. Questa tecnica analitica sfrutta l'azione denaturante dell' SDS che conferisce una carica negativa uniforme a tutte le proteine e interrompe le loro strutture secondarie e terziare consentendone la separazione in base al loro peso molecolare, quindi le proteine denaturate passano attraverso una rete di polimeri reticolati formata dall'acrilammide polimerizzata, la cui dimensione diminuisce all'aumentare della concentrazione di acrilammide; le proteine più grandi hanno maggiori difficoltà a muoversi attraverso questo gel e quindi migrano più lentamente delle proteine piccole. Le proteine a basso peso molecolare si risolvono meglio su gel ad alta percentuale, mentre le proteine di grandi dimensioni richiedono gel a percentuale più bassa per una risoluzione sufficiente. Di conseguenza, la percentuale di acrilammide è stata scelta in base alle dimensioni della proteina da rilevare. Per tutti i campioni ottenuti nei diversi esperimenti è stato utilizzato un gel di poliacrilammide all'8%. L'elettroforesi è stata eseguita a 140V in tampone di corsa Tris-Glicina-SDS (25mM Tris Base, 250mM Glicina, 0,1% SDS) per circa 2 ore. Alla fine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su membrane di polivinilidifluoruro (PVDF), precedentemente attivate in metanolo: il trasferimento è stato effettuato con il Trans-Blot® TurboTM Transfer Buffer (5X Trans-Blot® TurboTM Transfer Buffer, Bio-Rad, 20% etanolo in dH2O) diluito a una concentrazione finale di 1X, utilizzando un sistema Trans-Blot® TurboTM Transfer (Bio-Rad) impostato sul protocollo di trasferimento di proteine ad alto peso molecolare (HMW), a una tensione di 25V per 20 minuti. Al termine del trasferimento, le membrane PVDF sono state riattivate in metanolo e lavate in tampone 1X Tris-Buffered Saline with Tween® 20 (TBST, 20mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 0,1% Tween® 20, Sigma-Aldrich®, in dH2O). Quindi, i siti di legame non specifici sono stati bloccati incubando le membrane con latte scremato al 5% diluito in TBST per 1

ora a temperatura ambiente e in agitazione. Le membrane in PVDF sono state successivamente incubate per tutta la notte a 4°C con gli anticorpi primari. Le membrane sono state poi lavate in TBS-T (3 lavaggi di 5 minuti ciascuno) a temperatura ambiente (RT) per rimuovere l'eccesso di anticorpo primaro e sono state incubate, con anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano (HRP) per 1 ora a RT in agitazione. A seconda del tipo di anticorpo utilizzato, gli anticorpi primari sono stati diluiti in latte al 5% o in BSA al 5% in TBST, mentre tutti gli anticorpi secondari sono stati diluiti in latte al 5% disciolto in TBST. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari e secondari:

Antibody target	**Company**	**Catalog number**	**Dilution**
α-LRRK2	abcam®	ab133475	1:300
α-Flag® M2-HRP	Sigma-Aldrich®	A8592	1:50000
β-tubulin	abcam®	Ab6046	1:50000
α-DREBRIN	Thermo-Fisher	MA1-20377	1:500
α –GFP	Roche (Sigma)	11814460001	1:500
α- actin	Sigma	A206	1:20000
α-mouse IgG-HRP	Sigma-Aldrich	A9044	1:80000
β-tubulin	abcam®	Ab6046	1:50000
α-rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich	A9169	1:16000

Dopo altri tre lavaggi delle membrane in TBS-T 1X (3 lavaggi di 5 minuti ciascuno), le membrane sono state incubate con il reagente Immobilon® Enhanced Chemiluminescence (ECL) Ultra Western HRP Substrate (EMD Millipore): questo contiene un substrato dell'HRP (il luminolo) che, una volta ossidato dall'HRP, entra in uno stato eccitato, quindi rilascia una quantità di fotoni proporzionale alla proteine rilevate dai complessi di anticorpi. Il segnale luminoso è stato rilevato attraverso il sistema VMR® Imager CHEMI Premium (Bio-Rad).

3.4. Immunocitochimica

Dopo la differenziazione (paragrafo 3.2.2) le cellule sono state lavate con DPBS e fissate con paraformaldeide al 4% (PFA, pH 7,4) per 20 minuti a temperatura

ambiente. Successivamente, le cellule sono state lavate tre volte con DPBS e sottoposte a protocolli di colorazione. Dopo l'ultima fase di lavaggio, la fluorescenza basale delle cellule è stata ridotta incubando i vetrini con 300 µl di NH_4Cl (in 1X DPBS) per 10 minuti a RT in agitazione. Le cellule sono state lavate un'altra volta con DPBS e successivamente sono state permeabilizzate in 350µl di metanolo ghiacciato per 10 minuti a -20°C. Questo passaggio in metanolo ci ha permesso di ottimizzare la colorazione. Quindi, le cellule sono state lavate una volta con DPBS e incubate con la soluzione di blocco (5% FBS in 1X PBS) per almeno 1 ora a RT in agitazione, per favorire la fissazione. Dopo la saturazione, le cellule sono state incubate tutta la notte a 4°C con anticorpi primari diluiti nella soluzione di blocco. Il giorno successivo i vetrini coprioggetto sono stati lavati con DPBS (5 minuti x 3 volte) e quindi i nuclei delle cellule sono state colorate con Hoechst 33258 (ThermoFisher ScientificTM) diluito 1:10000 in DPBS per 5 minuti a RT in agitazione. Infine, i vetrini coprioggetto sono stati lavati nuovamente con DBPS, puliti in ddH2O e montati su vetrini da microscopio (ThermoFisher ScientificTM). Come mezzo di montaggio è stato utilizzato Mowiol (Calbiochem). Per misurare la crescita neuritica dopo la differenziazione, le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con un vettore contenente la sequenza codificante per una proteina fluorescente verde citosolica la cui espressione ha permesso di tracciare la lunghezza del neurite a livello di singola cellula. Le immagini sono state raccolte con il microscopio confocale Zeiss LSM700. La lunghezza dei neuriti è stata valutata utilizzando il software ImageJ.

3.5.Analisi filogenetiche

Un albero filogenetico è un diagramma che permette di mostrare la relazione evolutiva tra gli organismi, ma anche tra i geni e le proteine. Per la creazione dell'albero filogenetico, le sequenze codificanti (CDS) del gene DBN1 e DBN like (in organismi dove manca la sequenza DBN1) sono state ottenute da NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). L'allineamento delle sequenze è stato effettuato sfruttando l'algoritmo Muscle del software MegaX, utilizzato anche per creare l'albero filogenetico con un approccio di Maximum Likelihood. L'analisi di Maximum Likelihood si basa su un modello di evoluzione, determinato da una serie di parametri che vengono imposti durante l'analisi. Il parametro utilizzato nella ricostruzione dell'evoluzione di Drebrin è stato il modello di sostituzione *Jukes-Cantor* e per modellare le differenze di velocità evolutiva tra i siti è stata utilizzata una distribuzione Gamma discreta con 5 categorie di tasso. La qualità dell'albero è stata testata attraverso un'analisi bootstrap, inoltre sono stati generati 500 alberi dopo un nuovo campionamento del set di dati originale.

3.6. Analisi statistiche

La quantità di proteine rilevata nel WB è stata quantificata calcolando le intensità relative delle bande con il software open source ImageJ. I dati sono stati elaborati graficamente con GraphPad Prism 9 e visualizzati come media con barre di errore dell'errore standard della media (SEM).

4. Risultati

4.1. Preparazione e validazione del DNA plasmidico

LRRK2 è una proteina molto grande (286 kDa) composta da 2.527 aminoacidi la cui sequenza codificante è costituita da 7581 paia di basi. Date le grandi dimensioni della sequenza codificante, la trasformazione e amplificazione dei plasmidi esprimenti LRRK2 è nota essere ostica. Quindi per ottimizzare tale amplificazione abbiamo trasformato tre tipi cellulari differenti (StbI3, DHEα e Top10) e abbiamo testato in parallelo due temperature di crescita (30°C e 37°C). Dopo aver fatto crescere le colonie e allestito inoculi su piccola scala (da 5mL), abbiamo controllato l'integrità del DNA batterico tramite digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione Sal1 ed EcoRI. I risultati mostrano che le colture batteriche Top10 incubate a 37°C presentano un pattern a 5 bande per la digestione con EcoRI e un pattern a 4 bande con l'enzima Sal1, coerente con il pattern di digestione previsto da Benchling, indicando che il DNA si è amplificato correttamente e senza eventi di ricombinazione (Figura 19).

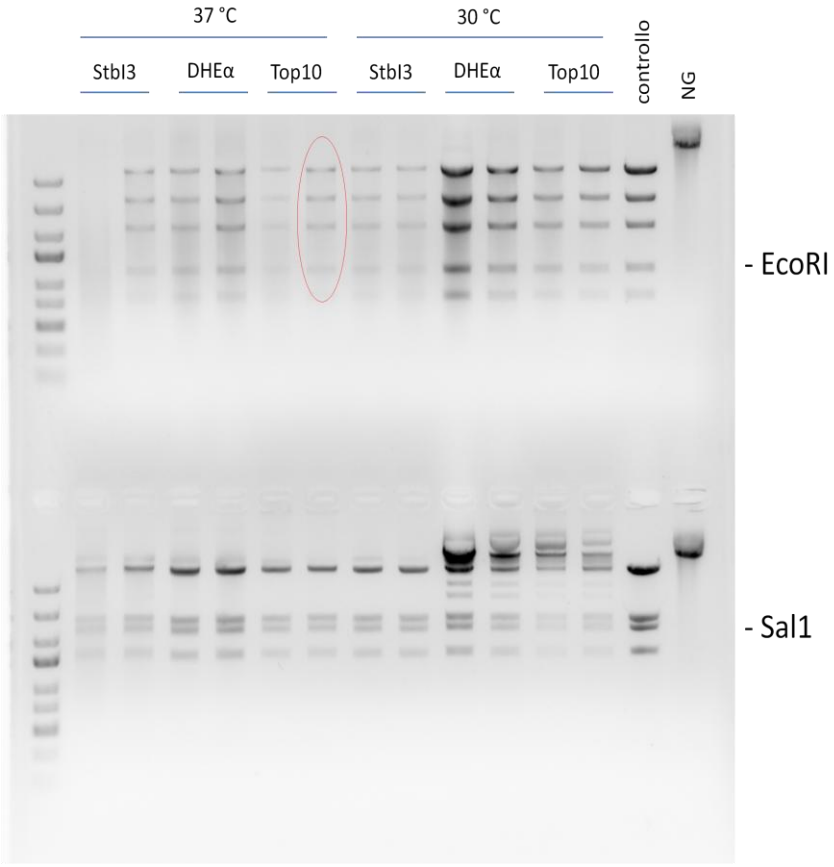


Figura 19 ***Elettroforesi su gel d'agarosio all'1,5 % per controllare l'integrità del DNA batterico mediante digestione enzimatica.*** Come previsto da Benchling, si è osservato in tutti i campioni un pattern a 5 bande per la digestione con EcoRI e un pattern a 4 bande con l'enzima Sal1. Il cerchio rosso rappresenta le cellule scelte per procedere con l'amplificazione del DNA.

Dunque, abbiamo deciso di procedere con la preparazione utilizzando il secondo inoculo delle cellule Top10 fatte crescere a 37°C. Una volta estratto e purificato il DNA GFP-LRRK2 lo abbiamo validato attraverso una prova di trasfezione su cellule HEK293T. In dettaglio abbiamo trasfettato le cellule con 1,5 µg di DNA per pozzetto e in seguito abbiamo immunoprecipitato la proteina LRRK2. I western blot hanno rilevato una banda in corrispondenza di 260 kDa, coerente con il peso molecolare previsto per Lrrk2 (Figura 20).

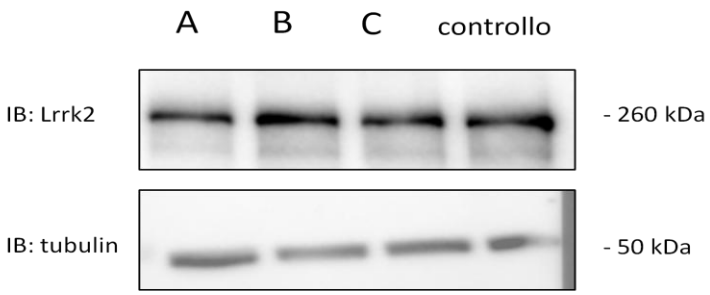


Figura 20 Analisi di Western blot. ***Validazione DNA plasmidico GFP-LRRK2.*** L'intensità delle bande è stata normalizzata sulla β-tubulin, usata come housekeeping. I campioni A, B e C

rappresentano il DNA GFP-LRRK2 proveniente da tre colonie batteriche differenti, mentre il controllo si riferisce Ad un DNA GFP-LRRK2 precedentemente validato. Il western blot ha rilevato una banda per ciascun campione in corrispondenza di 260 kDa, coerente con il peso molecolare previsto per LRRK2.

Parallelamente abbiamo validato anche i costrutti di Drebrin ottenuti dal Professore Phillip Gordon Weeks e amplificati precedentemente utilizzando cellule DHEα. Abbiamo trasfettato 3,5 µg di DNA di ogni costrutto per ogni pozzetto e, successivamente, abbiamo immunoprecipitato le proteine. Nell'analisi di WB abbiamo caricato quantità crescenti di ciascun campione (20 µg, 60 µg, 120 µg) per essere certi della corretta amplificazione. Il western blot ha rilevato la presenza di tre bande ad intensità crescente per ogni costrutto, indicando che 20µg è una quantità sufficiente di lisato proteico per rilevare la trasfezione. Inoltre, i vari costrutti mostrano un peso molecolare diverso tra loro: 150 kDa per YFP-Drebrin full, 60 kDa per l'N-terminale e 110kDa per il C-terminale (Figura 21).

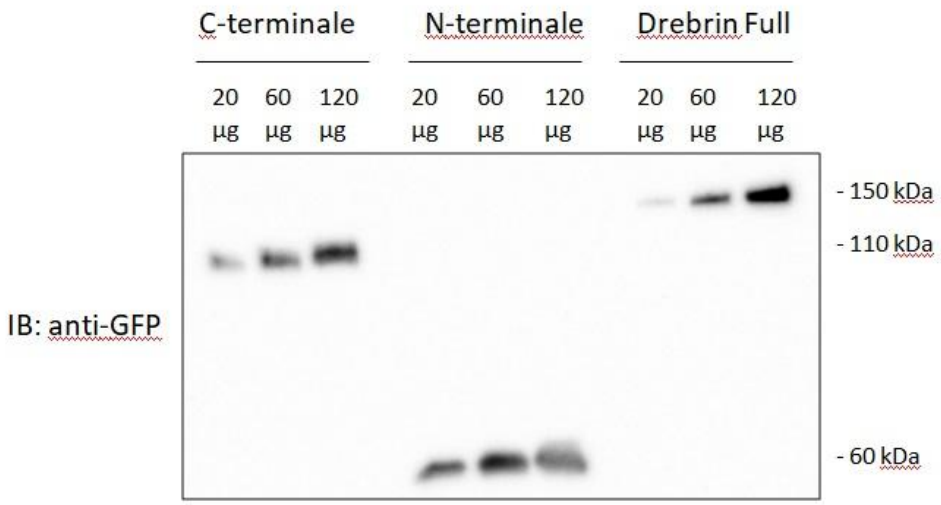
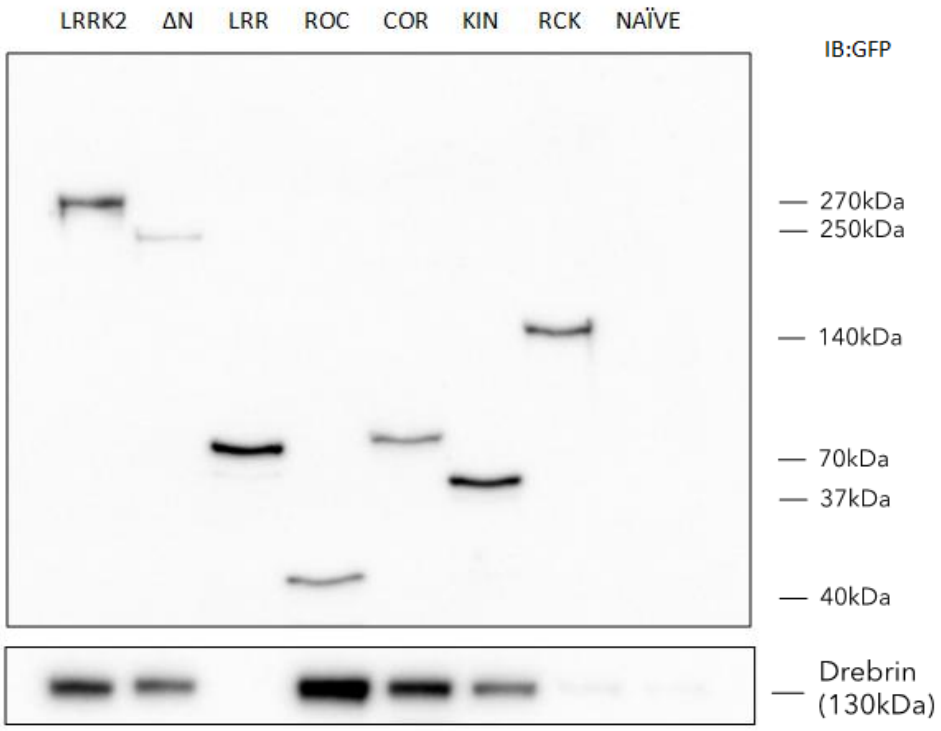


Figura 21 Analisi di Western blot. ***Validazione DNA plasmidico di Drebrin*** *e i rispettivi costrutti di delezione.* Per ogni costrutto sono state rilevate tre bande ad intensità crescente, indice di una corretta amplificazione.

4.2. Drebrin potrebbe interagire con il dominio enzimatico di LRRK2

L'analisi di MS realizzata nel nostro laboratorio ha evidenziato l'esistenza di un'interessante interazione tra LRRK2 e Drebrin. Per caratterizzare tale interazione, nello specifico per ottenere informazioni sull'identità dei domini di LRRK2 coinvolti, abbiamo eseguito un'immunoprecipitazione accoppiata ad analisi di WB. A tale scopo, diversi costrutti di LRRK2 contententi un tag GFP

all'N-terminale sono stati trasfettati in cellule HEK293FT ed in seguito immunoprecipitati. Nel dettaglio, abbiamo trasfettato in cinque esperimenti indipendenti un costrutto LRRK2 completo, un costrutto ΔN privo della regione N-terminale, costrutti di delezione che esprimono singoli domini (LRR, ROC, COR, KIN) e un costrutto RCK che include l'intero nucleo enzimatico composto dal dominio ROC-COR GTPasico e dal dominio chinasico. I domini di LRRK2 sono stati immunoprecipitati attraverso la resina GFP-trap e l'esito dell'immunoprecipitazione è stato verificato incubando la membrana con l'anticorpo primario anti-GFP. Dopo di che abbiamo valutato se Drebrin endogena fosse co-immunoprecipitata con LRRK2 e, più nello specifico, con quali domini utilizzando un anticorpo anti-Drebrin. Anche se siamo riusciti a precipitare tutti i domini attraverso la resina GFP-trap, non siamo riusciti a purificarne la stessa quantità a causa dell'elevata variabilità legata alla tecnica. Drebrin è stata rilevata in presenza dei domini COR, KIN e soprattutto ROC (Figura 22). La mancanza del segnale atteso di Drebrin in corrispondenza del dominio RCK suggerisce che probabilmente questo dominio si ripiega in una conformazione che impedisce l'interazione con Drebrin. Tuttavia l'analisi statistica indica che le differenze non sono significative, anche per effetto della grande variabilità intersperimentale.



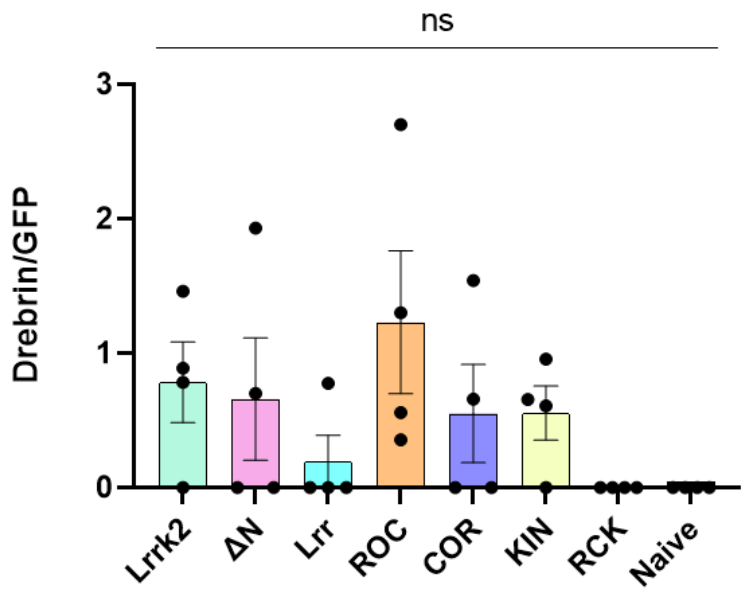


Figura 22 ***Drebrin sembra interagire preferenzialmente con il core enzimatico di LRRK2.*** In alto è rappresentata un'analisi di western blot nella quale sono rappresentati i diversi domini di LRRK2 immunoprecipitati e Debrin coimmunoprecipitata. In basso il grafico riporta l'interazione tra Drebrin (espressa come rapporto tra Drebrin e i costrutti taggati GFP) e i domini di LRRK2. I dati sono stati valutati attraverso un test ANOVA. Il grafico riporta la media ± l'errore standard (SEM).

L’assenza di segnale di Drebrin nel campione corrispondente alla resina incubata con lisati naïve conferma che Drebrin lega le proteine purificate e non la matrice della resina. Nel complesso, questi risultati denotano che Drebrin potrebbe interagire con il nucleo enzimatico di LRRK2 (KIN-ROC-COR), dunque offrono la possibilità di comprendere maggiormente i meccanismi di interazione che coinvolgono l'attività chinasica. Tuttavia sono necessarie ulteriori repliche per ottenere risultati statisticamente significativi.

4.3. LRRK2 interagisce con il dominio N-Terminale di Drebrin

Per ottenere informazioni su quale dominio di Drebrin sia coinvolto nell’interazione con LRRK2, abbiamo eseguito una co-immunoprecipitazione. A tale scopo, sono stati espressi e immunoprecipitati da cellule HEK293FT tre costrutti di drebrin contenenti un tag YFP C-terminale. In particolare, abbiamo co-trasfettato, in tre piastre differenti, un costrutto LRRK2, contenente un tag FLAG nelll’N-terminale, insieme a un costrutto di Drebrin full-length in una piastra, e due costrutti di delezione di Drebrin, N-terminale e C-terminale in fusione con YFP, nelle restanti due piastre. I domini di Drebrin sono stati immunoprecipitati attraverso la resina GFP-trap e l’esito dell’immunoprecipitazione è stato valutato attraverso un anticorpo primario anti-GFP. Successivamente abbiamo valutato la co-immunoprecipitazione di LRRK2 con un anticorpo anti-FLAG, partendo dalla considerazione che il segnale di FLAG LRRK2 sarebbe stato rilevato solo nei domini di Drebrin con i quali interagisce, dato che alla resina GFP-trap si legano i costrutti di Drebrin taggati YFP. Come mostrato in Figura 23, i domini immunoprecipitati, oltre a presentare un segnale più forte rispetto agli input, mostrano una corsa elettroforetica rallentata. La coimmunoprecipitazione di LRRK2 è stata rilevata con maggiore intensità in presenza del dominio N-terminale di Drebrin. Nel complesso, quindi, sembra che LRRK2 interagisca con maggiore affinità con il dominio N-terminale di Drebrin, il quale al suo interno presenta il dominio dell'omologia del fattore depolimerizzante l’actina (ADF-H), che contribuisce al legame e al rimodellamento dell'F-actina, suggerendo che LRRK2 potrebbe competere con l’actina per il legame con Drebrin. L’intensità delle bande è stata normalizzata sulla β-actina, usata anche per verificare l’interazione con Drebrin in presenza di LRRK2 (paragrafo 4.4). La presenza dell’actina è stata rilevata principalmente a livello di Drebrin full-length. Tuttavia, sono necessarie ulteriori repliche per confermare se il risultato è statisticamente significativo.

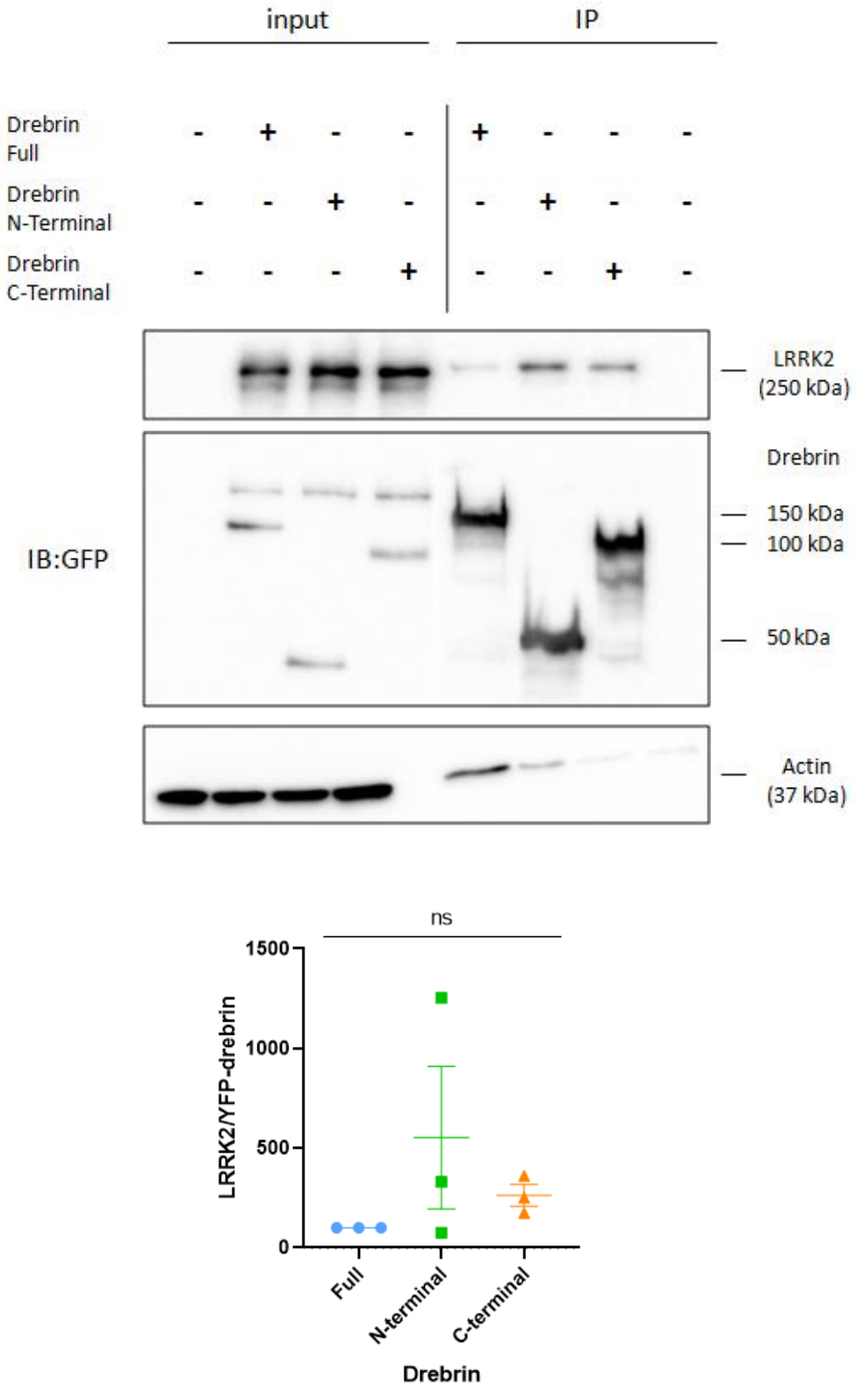


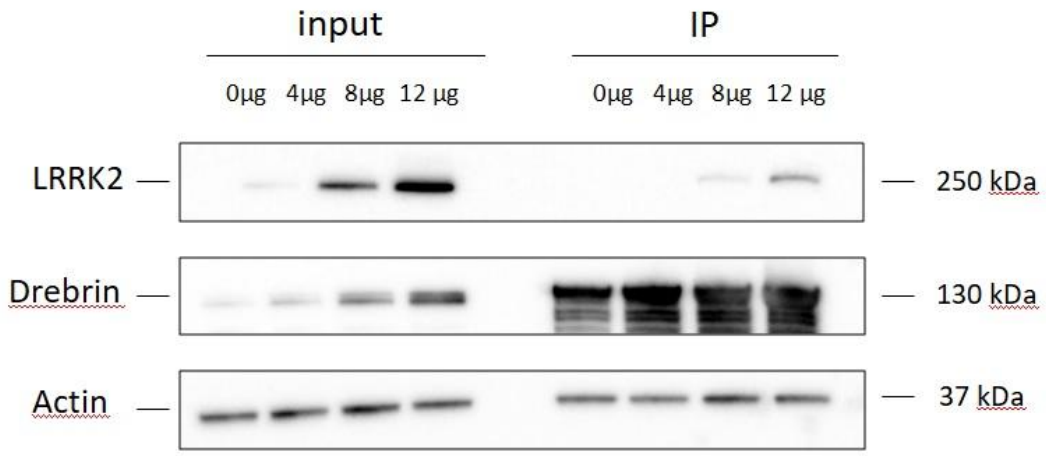
Figura 23 ***Lrrk2 interagisce maggiormente con il dominio N-terminale di Drebrin.*** Nella parte alta della figura è mostrata un'analisi di western blot nella quale sono rappresentati i diversi domini di Drebrin immunoprecipitati e FLAG LRRK2 coimmunoprecipitata. In basso il grafico riporta l'interazione tra LRRK2 (espressa come rapporto tra LRRK2 e i costrutti taggati YFP) e i domini di Drebrin. I dati sono stati normalizzati sui valori di Drebrin full e valutati attraverso un test ANOVA. Il grafico riporta la media ± l'errore standard (SEM).

4.4.Legame competitivo di Drebrin per la F-actina con LRRK2

Il dominio N-terminale di Drebrin al suo interno presenta il dominio dell'omologia del fattore depolimerizzante l'actina (ADF-H), che contribuisce al legame e al rimodellamento dell'F-actina. Abbiamo quindi deciso di procedere con un saggio di competizione per capire se ci sia un legame competitivo tra LRRK2 e l'F-actina per Drebrin. Le cellule HEK293T sono state trasfettate con 8µg di Drebrin-full-YFP e con quantità crescenti di LRRK2-FLAG su piastre diverse (0µg, 4µg, 8µg, 12µg). Attraverso la resina GFP-trap, drebrin-YFP è stata immunoprecipitata e la riuscita dell'immunoprecipitazione è stata valutata attraverso un anticorpo primario anti-GFP.

Parallelamente con un anticorpo primario anti-FLAG abbiamo analizzato il segnale di LRRK2 co-immunoprecipitato che, come atteso e come si può apprezzare dall'analisi di western blot, aumenta all'aumentare dei µg trasfettati. Da notare che nel campione trasfettato con 4µg di DNA, il segnale di interesse non è rilevabile, probabilmente a causa dell'elevata variabilità durante la fase di trafezione. Infine abbiamo esaminato il segnale dell'actina, allo scopo di valutare la presenza di un legame competitivo per Drebrin tra l'actina e LRRK2 (Figura 24).

Curiosamente abbiamo osservato che, all'aumentare di LRRK2, la quantità di actina diminuisce gradualmente suggerendo che LRRK2 potrebbe legarsi a Drebrin, impedendone quindi l'interazione con l'actina. Per quanto questi risultati siano promettenti, avendo effettuato una sola prova, risulta necessario ripetere l'esperimento per ottenere dati statisticamente rilevanti.



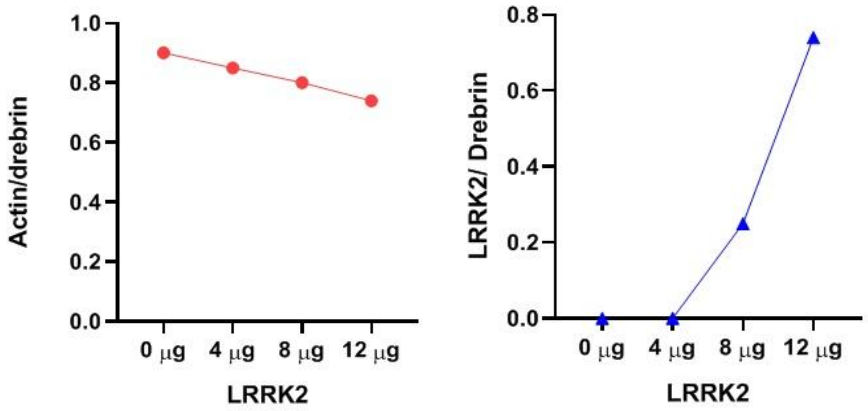


Figura 24 ***L'actina che interagisce con Drebrin diminuisce all'aumentare di LRRK2.*** In alto è mostrata un'analisi di western blot nella quale sono rappresentati Drebrin immunoprecipitata, FLAG LRRK2 coimmunoprecipitata e l'actina endogena coprecipitata. In basso a sinistra il grafico riporta la relazione tra actina (espressa come rapporto tra actina e Drebrin) e LRRK2, mentre a destra viene mostrato l'aumento di LRRK2 in presenza di concentrazioni costanti di Drebrin. I dati sono stati normalizzati sui valori di YFP Drebrin.

4.5. LRRK2 è coinvolta nella crescita dei neuriti attraverso l'interazione con Drebrin

È stato dimostrato che, in seguito a stimoli che inducono l'ingresso del calcio, Drebrin esce dalle spine dentritiche (processo noto come "esodo") e, come conseguenza si accumula nei dendtriti e nel corpo cellulare. L'esodo di Drebrin dalla testa delle spine dendritiche permette ai filamenti di actina di riacquisire il normale passo elicoidale e la successiva associazione dell'F-actina con le altre proteine che legano l'actina all'interno della testa delle spine dendritiche (Shirao, 2017). Questi eventi portano a un aumento del contenuto del pool dinamico di actina, con conseguente facilitazione della polimerizzazione della F-actina e del rimodellamento della testa delle spine dendritiche. È importante notare che, dopo l'esodo, Drebrin si riaccumula all'interno delle spine dendritiche dove ripristina il pool stabile di F-actina. Alla luce di queste considerazioni, Drebrin svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento delle dimensioni e della morfologia della spine dendritiche. Tuttavia, è stato anche visto che Drebrin promuove la crescita dei dendriti quando sovraespressa. Per investigare se la presenza di LRRK2 sia importante o necessaria per queste attività di drebrin, abbiamo eseguito un esperimento di immunocitochimica (ICC) in cellule SH-SY5Y WT e KO per LRRK2 trasfettate con YFP-Drebrin, per verificare se in assenza di LRRK2 Drebrin stimola la crescita dei neuriti. Ci siamo focalizzati sulla lunghezza dei dendriti non sulle spine perché le cellule SH-SY5Y differenziate in neuroni, nonostante rappresentino un buon modello *neuron-like*, non riescono a formare un numero di sinapsi significativo come nel caso di colture primarie di topo dopo due settimane in coltura. Prima di procedere abbiamo verificato tramite WB l'assenza di espressione di LRRK2 endogeno nelle cellule SH-SY5Y KO (precedentemente

generate in laboratorio con la tecnologia Crispr/Cas9 (Figura 25), utilizzando la b-actina come housekeeping per assicurarci che le differenze osservate non siano dovute ad errori di caricamento del gel o problemi di trasferimento. Dopo la trasfezione con YFP-Drebrin le cellule SH-SY5Y WT e KO differenziate sono state processate per l'esperimento di ICC. Dato che il tag YFP emette fluorescenza nel verde, abbiamo solo marcato il nucleo con l'Hoechst. Dopo l'acquisizione delle immagini al microscopio a fluorescenza abbiamo misurato la lunghezza dei processi attraverso il software imageJ. Sorprendentemente, i risultati hanno evidenziato che le cellule KO presentano neuriti significativamente più lunghi rispetto alle cellule WT, suggerendo che Drebrin in assenza di LRRK2 stimola il rimodellamento sinaptico (Figura 25). Tuttavia è importante sottolineare che durante il differenziamento e dopo la trasfezione le cellule SH-SY5Y WT non erano in condizioni ottimali, per cui sarebbe importante ripetere l'esperimento in futuro.

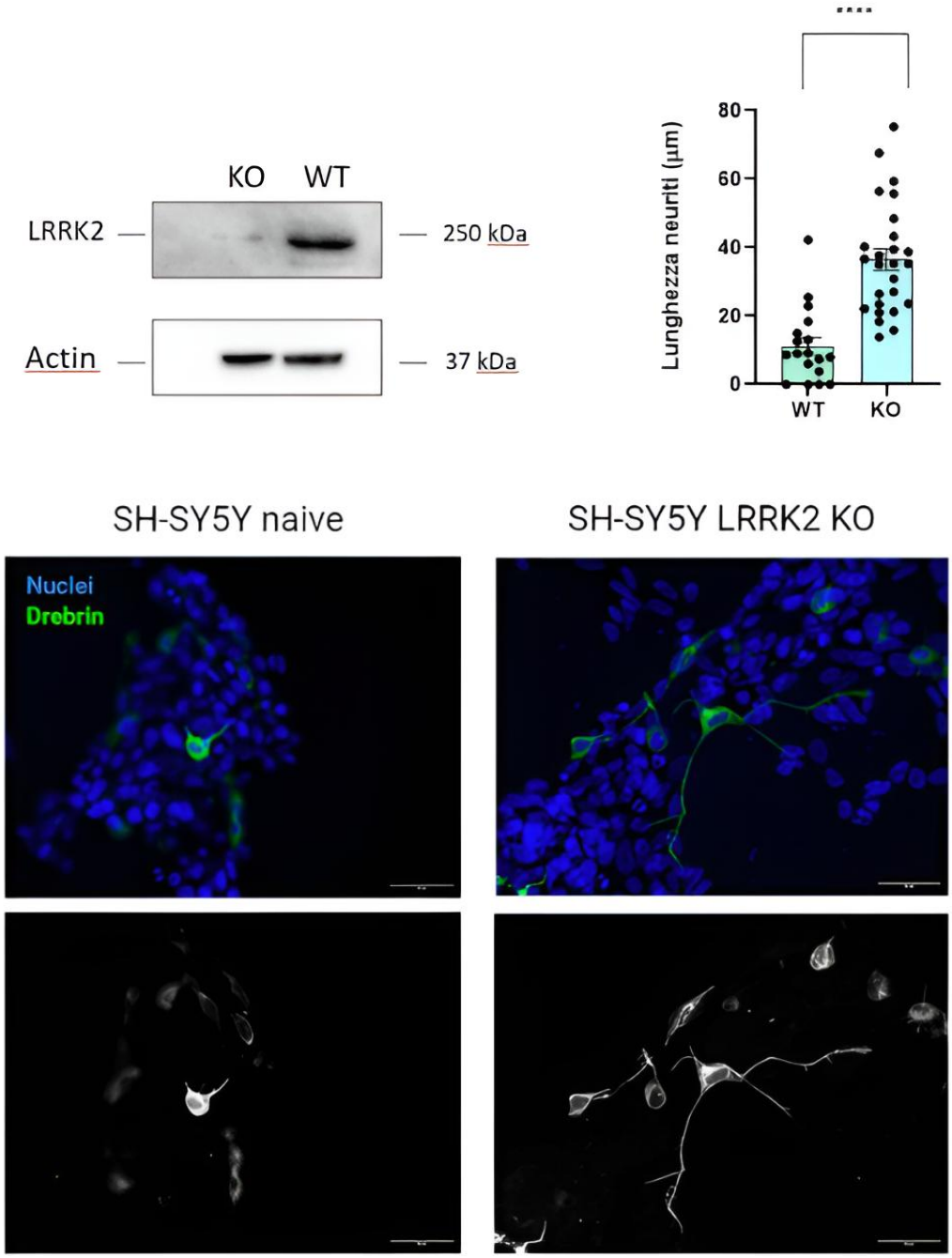


Figura 25 ***Drebrin promuove la crescita dei neuriti nelle SH-SY5Y KO.*** A sinistra è riportato un WB in cui si apprezza l'assenza di espressione di LRRK2 nelle cellule SH-SY5Y KO. l'intensità delle bande è stata confrontata con l'α-actina, usata come controllo. A destra il grafico riporta la differenza di lunghezza dei neuriti tra le cellule SH-SY5Y WT e le cellule SH-SY5Y KO. Ogni punto nel grafico rappresenta la media della lunghezza dei neuriti di una cellula. L'esperimento è stato eseguito N=1 volte indipendenti. In basso è riportata un'immagine rappresentativa illustrante la crescita dei neuriti nelle cellule SH-SY5Y KO e naive in presenza di Drebrin. La barra della scala rappresenta 30 µm. Quantificazione della lunghezza attraverso un T test (significatività****p <0,0001). Il grafico riporta la media ± l'errore standard sulla media(SEM).

4.6. Analisi filogenetica di Drebrin

Tracciare l'origine di un gene umano può contribuire notevolmente alla comprensione delle sue funzioni. Questo tipo di studi ha aiutato a delineare i migliori organismi modello in cui studiare le funzioni dei geni umani. Abbiamo, quindi, deciso di creare un albero filogenetico del gene codificante Drebrin (*DBN1*). Più in dettaglio abbiamo allineato sequenze codificanti (CDS) del gene *DBN1* e *DBN*-like, ottenute da NCBI e provenienti da diversi organismi. È importante notare che per *Danio rerio* non era disponibile in NCBI la sequenza *DBN1*, ma solamente *DBN-like*, così come per invertebrati, nematodi, funghi e protisti. I risultati hanno evidenziato che la sequenza di *DBN-like* di *Danio rerio* è più simile a *DBN-like* di *Homo sapiens* piuttosto che alla sequenza *DBN1* di *Homo sapiens* (Figura 26). Suggerendo che Drebrin potrebbe essersi evoluta in seguito alla divergenza tra pesci e anfibi. Tuttavia, risulta necessario ampliare queste analisi fornendo più repliche di alberi durante il campionamento del set di dati originale, ma anche analizzando la filogenesi delle diverse isoforme di Drebrin.

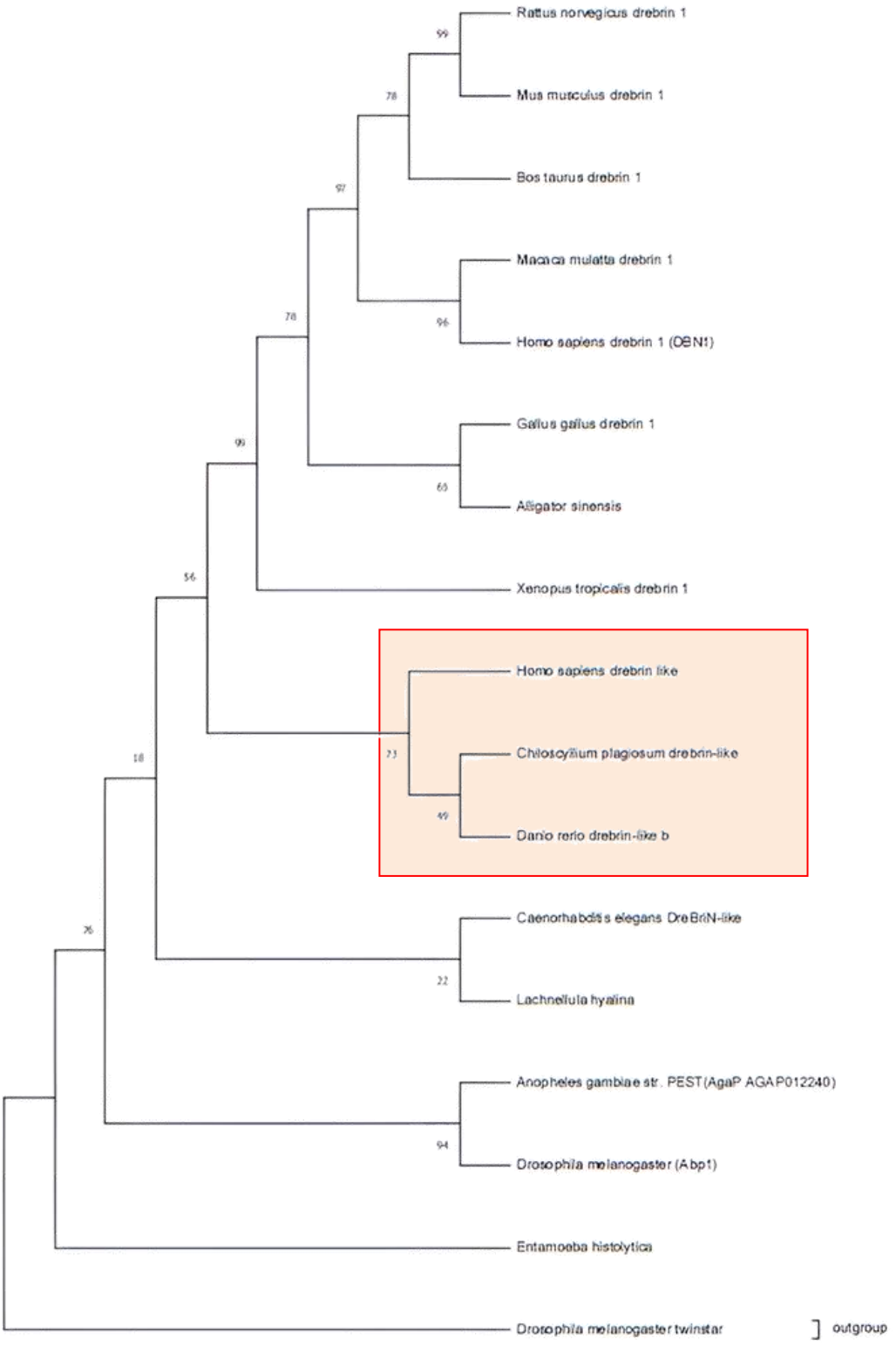


Figura 26 ***Albero filogenetico di DBN1***. Dendogramma ottenuto analizzando le sequenza di DBN1 e DBN like. La topologia mostrata è quella dedotta utilizzando ML. I numeri si riferiscono alle percentuali di repliche bootstrap che supportano i rami corrispondenti. La

sequenza Twinstar di *D. melanogaster* è stata usata come outgroup in quanto appartiene alla stessa famiglia di Drebrin contenente il dominio ADF-H.

5. Discussione e conclusione

Il cervello umano è una delle strutture più complesse esistenti in natura. I neuroni ne costituiscono la componente principale e sono fondamentali per l'elaborazione e il trasporto delle informazioni nel cervello (P. Burkhardt, 2015). Essi sono cellule elettricamente eccitabili, quindi capaci di reagire a stimoli esterni o interni producendo risposte sotto forma di potenziali d'azione. Questi, a differenza della maggior parte delle cellule, non si dividono mai e perdurano per tutta la vita. Pertanto, la perdita di neuroni equivale alla perdita di informazioni. Queste cellule formano una rete complessa di connessioni, le sinapsi, strutture estremamente plastiche, il cui numero e forza possono essere modificati in risposta agli stimoli ambientali, essenziali per la corretta attività dei circuiti cerebrali. Il loro danneggiamento o la loro perdita può compromettere il corretto trasferimento di informazioni e la capacità del sistema nervoso centrale (SNC) di modificare la propria organizzazione, portando alla patologia. Un numero crescente di evidenze sperimentali indica che la vulnerabilità sinaptica è una caratteristica comune alle malattie neurodegenerative, compreso il PD. In particolare, si ritiene che la perdita di sinapsi e la degenerazione di assoni/dendriti siano eventi patologici precoci che precedono la neurodegenerazione e la manifestazione clinica della malattia (SF. Soukup, 2018). Nel PD la manifestazione dei sintomi motori è principalmente legata alla degenerazione dei neuroni dopaminergici nella SNpc e alla presenza di inclusioni citoplasmatiche proteiche arricchite in α-sinucleina fosforilata (α-syn). La perdita di fibre dopaminergiche striatali precede la degenerazione dei corpi cellulari dopaminergici nella SNpc. La disfunzione sinaptica, documentata nei casi di malattia presenta alterazioni sia pre- che post-sinaptiche, sebbene i meccanismi molecolari e i fattori scatenanti siano sconosciuti.

Le mutazioni nel gene codificante la proteina LRRK2 sono tra le cause genetiche più comuni di PD autosomico dominante ad insorgenza tardiva. È interessante notare che il PD causato da LRRK2 è clinicamente e patologicamente quasi indistinguibile dal PD sporadico. LRRK2 è altamente espressa nello striato e la sua attività orchestra il traffico delle vescicole presinaptiche e i recettori dopaminergici postsinaptici (M. Rassu, 2017). Diversi studi hanno inoltre evidenziato un ruolo di LRRK2 nell'autofagia. Questa attività fisiologica risulta estremamente importante nelle cellule neuronali non divisibili e, quindi, suscettibili all'accumulo di depositi proteici. È importante notare che l'autofagia può regolare la formazione delle sinapsi e la neurotrasmissione sia a livello presinaptico che postsinaptico. A livello presinaptico, l'autofagia controlla la funzione mitocondriale, l'omeostasi e il rilascio di SV; nel compartimento postsinaptico, controlla la neurotrasmissione eccitatoria degradando l'AMPA e i recettori GABA. Pertanto, l'assenza di autofagia può compromettere la plasticità sinaptica. LRRK2 interagisce fisicamente con le vescicole e il citoscheletro di

actina, fornendo l'impalcatura per l'esecuzione della segnalazione locale e l'espletamento delle principali funzioni sinaptiche (L.Civiero, 2018). Diversi studi hanno rilevato l'associazione fisica e funzionale tra LRRK2 e alcune proteine del citoscheletro (L. Parisiadou, 2010). L'actina e i microtubuli, contribuiscono allo sviluppo e al mantenimento del sistema nervoso; non a caso un assemblaggio scorretto di elementi citoscheletrici è annoverata tra i fattori implicati nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, come ad esempio il PD. Mutazioni in LRRK2 possono, quindi, comportare una deregolazione della dinamica dei microtubuli compromettendo la corretta funzione neuronale (B. M. H. Law, 2014). È stato dimostrato che l'assenza di LRRK2 promuove il reclutamento della PKA all'interno delle spine dendritiche. Questa a sua volta fosforila il recettore del glutammato GluR1, fondamentale nella maturazione e plasticità di queste strutture specializzate (J. A. Esteban, 2003).
Esperimenti preliminari eseguiti nel nostro laboratorio hanno rilevato un'interazione significativa tra LRRK2 e Drebrin a livello postsinaptico. Drebrin è uno dei regolatori intracellulari della morfogenesi neuronale (T. Shirao, 2017). È una fosfoproteina strettamente correlata al citoscheletro di actina (K. Tanabe, 2014). Risulta avere un ruolo centrale nella formazione delle spine e nella plasticità sinaptica attraverso il controllo dell'interazione actina-miosina nelle spine dendritiche (T. Mizui, 2014). L'attività del recettore AMPA promuove la stabilizzazione dell'F-actina legata a Drebrin. Per di più l'afflusso di Ca^{2+} dipendente dall'attivazione del recettore NMDA attiva l'attività ATPasica della miosina II e di conseguenza induce l'esodo dell'F-actina legata a Drebrin dalle spine dendritiche, con conseguente inizio della plasticità sinaptica morfologica. Nel momento in cui le spine dendritiche hanno attuato cambiamenti morfologici, la progressiva diminuzione di AMPAR e l'inibizione del riaccumulo di Drebrin determinano l'inibizione di NMDA, questo permetterà a Drebrin di rilegarsi all'F-actina conferendo stabilità morfologica alle spine (N. Kojima, 2016).
Sulla base di questi convincenti dati preliminari, con questo lavoro di tesi abbiamo voluto caratterizzare l'interazione tra LRRK2 e Drebrin. Gli esperimenti di immunoprecipitazione da noi eseguiti hanno evidenziato in tutte le repliche sperimentali l'interazione di Drebrin con il dominio ROC di LRRK2 e in più repliche l'interazione con i domini COR e KIN, suggerendo che questa interazione potrebbe coinvolgere con buona probabilità il nucleo enzimatico di LRRK2, offrendo così la possibilità di avere un quadro più completo sui meccanismi che coinvolgono l'attività chinasica. Sarà interessante indagare in futuro se il legame di Drebrin stimoli o reprima l'attività chinasica o GTPasica di LRRK2.
Inoltre, dai risultati ottenuti LRRK2 sembra interagire con il dominio N-terminale di Drebrin, il quale contiene al suo interno il dominio dell'omologia del fattore depolimerizzante l'actina (ADF-H), che contribuisce al legame e al rimodellamento dell'F-actina, suggerendo la possibilità che LRRK2 possa competere con l'actina per il legame con Drebrin. A supporto di questi risultati,

eseguendo un saggio di competizione, abbiamo notato che, l'actina legata a Drebrin tende a diminuire all'aumentare della quantità di LRRK2, suggerendo un'affinità relativamente maggiore di Drebrin per LRRK2. Una possibile interpretazione è che LRRK2 possa formare un legame più forte con Drebrin rispetto all'F-actina, di conseguenza la sua espressione potrebbe causare il distacco dell'actina legata a Drebrin permettendo così all'actina di interagire con altre proteine, con conseguente rimodellamento delle spine dendritiche e plasticità sinaptica. Un'ulteriore conferma di come l'interazione Drebrin-LRRK2 possa influenzare la dinamica dell'actina emerge dall'esperimento di ICC attraverso il quale abbiamo rilevato una maggior crescita dei neuriti in cellule SH-SY5Y KO per LRRK2 trasfettate con Drebrin. La capacità di LRRK2 di inibire il legame tra Drebrin e actina (esperimento di co-IP) assieme alla propensità di Drebrin a favorire la crescita dei processi neuronali in assenza di LRRK2 (esperimento di ICC in cellule LRRK2 KO) portano ad ipotizzare che LRRK2 sia un regolatore negativo della polimerizzazione dell'actina attraverso l'inibizione del legame drebrin-actina.

Nel prossimo futuro, eseguiremo lo stesso esperimento di ICC in presenza di inibizione di LRRK2 per ottenere dei risultati più attendibili e per capire se l'effetto dipenda dall'attività chinasica della proteina.

Successivamente, rifaremo l'esperimento di immunoprecipitazione per comprendere al meglio quali domini sono coinvolti nell'interazione Drebrin-LRRK2. Infine, trasfetteremo le cellule SH-SY5Y LRRK2 WT con FLAG LRRK2 e i diversi domini di drebrin taggati YFP e tramite ICC valuteremo se le due proteine colocalizzano e se la colocalizzazione cambia in assenza di alcuni domini di Drebrin.

In conclusione, questo progetto ha contribuito ad aumentare la nostra comprensione dell'interazione tra LRRK2 e Drebrin e, in generale, alle dinamiche del citoscheletro di actina, aggiungendo un ulteriore tassello alla rete complessa della patobiologia di LRRK2.

Bibliografia

A. Alié. (2010). The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans. *BMC Evolutionary Biology* .

A. Ascherio. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology* .

A. B. West. (2014). Differential LRRK2 expression in the cortex, striatum, and substantia nigra in transgenic and nontransgenic rodents. *Journal of Comparative Neurology* .

A. Ivanov. (2009). Drebrin A regulates dendritic spine plasticity and synaptic function in mature cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci.*

A. Mammoto. (1998). Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun.*

A. Meixner. (2011). A QUICK screen for Lrrk2 interaction partners - Leucine-rich repeat kinase 2 is involved in actin cytoskeleton dynamics. *Molecular and Cellular Proteomics.*

A. Sauerbier. (2018). Impact of ethnicity on the natural history of parkinson disease. *Medical Journal of Australia* .

A. Schildt. (2019). Single inflammatory trigger leads to neuroinflammation in LRRK2 rodent model without degeneration of dopaminergic neurons. . *Journal of Parkinson's Disease.*

A.B. West, A. (2005). Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. . *Proc. Natl. Acad. Sci.* .

A.Myasnikov. (2021). Structural analysis of the full-length human LRRK2. *Cell* .

André M.M.Sousa. (2017). Evolution of the Human Nervous System Function, Structure, and Development. *Cell* .

B. Gilsbach. (2018). Regulation of LRRK2: insights from structural and biochemical analysis. . *Biol. Chem.*

B. M. H. Law. (2014). A direct interaction between leucine-rich repeat kinase 2 and specific β-Tubulin isoforms regulates tubulin acetylation. *Journal of Biological Chemistry.*

B. Picconi. (2012). Synaptic Dysfunction in Parkinson's Disease. *Synaptic Plasticity* .

C. Aoki. (2005). Drebrin A is a postsynaptic protein that localizes in vivo to the submembranous surface of dendritic sites forming excitatory synapses. . *J Comp Neurol.*

C. Blauwendraat. (2020). The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* .

C. Hammond. (2015). The chemical synapses. *Cellular and Molecular Neurophysiology* .

C. Ruíz. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *j. neuron.*

C. Ruiz. (2013). LRRK2: Cause, risk, and mechanism. *In Journal of Parkinson's Disease* .

C. Schulz. (2011). Leucine-rich repeat kinase 2 modulates retinoic acid-induced neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. . *PLoS ONE* .

CK. Deniston. (2020). Parkinson's Disease-linked LRRK2 structure and model for microtubule interaction. *bioRxiv* .

D. Cheng. (2006). Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol. Cell. Proteomics* .

DG. Drubin. (1988). Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J Cell Biol.*

Driver. (2009). Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology* .

E. Greggio. (2006). Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiology of Diseases* .

E. Robert. (2013). Axon Degeneration in Parkinson's Disease. *Exp Neurol.*

EE. Grintsevich. (2010). Mapping of drebrin binding site on F-actin. *J Mol Biol.*

F. Kalogeropulou. (2018). P62/SQSTM1 is a novel leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) substrate that enhances neuronal toxicity. *Biochem J.*

F. Kawakami. (2012). LRRK2 phosphorylates tubulin-associated tau but not the free molecule: LRRK2-mediated regulation of the tau-tubulin association and neurite outgrowth. . *PLoS ONE.*

G. Ito. (2012). Re-examination of the dimerization state of leucine-rich repeat kinase 2: predominance of the monomeric form. . *Biochem. J.*

G. Jung. (2015). Drebrin depletion alters neurotransmitter receptor levels in protein complexes, dendritic spine morphogenesis and memory-related synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *J Neurochem.*

G. Piccoli. (2014). Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Binds to Neuronal Vesicles through Protein Interactions Mediated by Its C-Terminal WD40 Domain. . *Molecular and Cellular Biology.*

Greggio et al. (2008). The Parkinson Disease-associated Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Is a Dimer That Undergoes Intramolecular Autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* .

Greggio, I. &. (2021). LRRK2 signaling in neurodegeneration: two decades of progress. *Essays in Biochemistry.*

H. Braak. (2004). Poor and protracted myelination as a contributory factor to neurodegenerative disorders. *Neurobiol Aging.*

H. Deng. (2018). The genetics of Parkinson disease. *Ageing Research Reviews* .

H. Hanafusa. (2011). Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. *Nat. Commun.*

H. L. Melrose. (2007). A comparative analysis of leucine-rich repeat kinase 2 (Lrrk2) expression in mouse brain and Lewy body disease. *Neuroscience* .

H. Philippe. (2009). Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr. Biol.*

H. Takahashi. (2006). Down-regulation of drebrin A expression suppresses synaptic targeting of NMDA receptors in developing hippocampal neurones. . *J Neurochem.*

H. Y.Heo. (2010). . Coordinate regulation of neurite outgrowth by LRRK2 and its interactor, Rab5. *Exp. Neurobiol.* .

H. Yamazaki. (2001). Molecular cloning and dendritic localization of rat SH3P7. *Eur J Neurosci.*

H. Zhang. (2019). Comparative analysis of cellular expression pattern of schizophrenia risk genes in human versus mouse cortex. *Cell Biosci.*

H.Hering. (2001). Dentritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience* .

Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience* .

I. Marìn. (2006). The Parkinson disease gene LRRK2: evolutionary and structural insights. . *Mol. Biol. Evol.* .

I. Marìn. (2008). Ancient Origin of the Parkinson Disease Gene LRRK2. *Journal of Molecular Evolution.*

I. Ruiz-Trillo. (2008). A phylogenomic investigation into the origin of metazoa. *Mol. Biol. Evol.*

I.F. Mata. (2006). LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. . *Trends Neurosci.*

J. A. Esteban. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. . *Nature Neuroscience.*

J. C. Fiala. (2002). Dendritic spine pathology: Cause or consequence of neurological disorders? *In Brain Research Reviews.*

J. H. Lee. (2019). Parkinson's disease-associated LRRK2-G2019S mutant acts through regulation of SERCA activity to control ER stress in astrocytes. . *Acta Neuropathol. Commun.*

J. Jankovic. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* .

J. Kyte. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.*

J. Parkinson. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* .

JT. Manschwetus. (2020). Binding of the human 14-3-3 isoforms to distinct sites in the leucine-rich repeat kinase 2. . *Front. Neurosci.* .

K. Habig. (2008). RNA interference of LRRK2-microarray expression analysis of a Parkinson's disease key player. . *Neurogenetics.*

K. Haebig. (2010). ARHGEF7 (Beta-PIX) acts as guanine nucleotide exchange factor for leucine-rich repeat kinase 2. *PLoS One* .

K. Hayashi. (1999). Change in the shape of dendritic spines caused by overexpression of drebrin in cultured cortical neurons. . *J Neurosci.*

K. Tanabe. (2014). Phosphorylation of drebrin by cyclin-dependent kinase 5 and its role in neuronal migration. . *PLoS One* .

Kojima, N. (1988). Nucleotide sequences of two embryonic drebrins, developmentally regulated brain proteins, and developmental change in their mRNAs. . *Mol Brain Res.*

L. Bosgraaf. (2003). Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim Biophys Acta.*

L. Civiero. (2015). Leucine-rich repeat kinase 2 interacts with p21-activated kinase 6 to control neurite complexity in mammalian brain. *J. Neurochem.*

L. Geirsdottir. (2019). Cross-Species Single-Cell Analysis Reveals Divergence of the Primate Microglia Program. *Cell.*

L. Iannotta. (2021). LRRK2 signaling in neurodegeneration: two decades of progress. *Essays in Biochemistry.*

L. Kalia. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* .

L. Parisiadou. (2010). LRRK2 function on actin and microtubule dynamics in Parkinson disease. *Communicative and Integrative Biology.*

L. Parisiadou. (2009). Phosphorylation of ezrin/radixin/moesin proteins by LRRK2 promotes the rearrangement of actin cytoskeleton in neuronal morphogenesis. *J Neurosci.*

L. Reyniers. (2014). Differential protein protein interactions of LRRK1 and LRRK2 indicate roles in distinct cellular signaling pathways. *J. Neurochem.* .

L.Civiero. (2018). The role of LRRK2 in cytoskeletal Civiero dynamics. *In Biochemical Society Transactions.*

M. A.Nalls. (2019). Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet Neurology* .

M. Akari. (2018). Physiological and pathological functions of LRRK2: implications from substrate proteins. *Neuronal Signal* .

M. Funayama. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann. Neurol.*

M. Funayama. (2005). An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol.*

M. Jin. (2002). A novel, brain-specific mouse drebrin: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization. *Genomics.*

M. McGregor. (2019). Functionally Distinct Connectivity of Developmentally Targeted Striosome Neurons. *Cell. Rep.*

M. Nguyen. (2018). LRRK2 phosphorylation of auxilin mediates synaptic defects in dopaminergic neurons from patients with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* .

M. Paus. (2013). Enhanced dendritogenesis and axogenesis in hippocampal neuroblasts of LRRK2 knockout mice. . *Brain Res.* .

M. Poukkula. (2011). Actin-depolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics. . *Cytoskeleton* .

M. Rassu. (2017). Role of LRRK2 in the regulation of dopamine receptor trafficking. *PLoS One.*

M. Steger. (2016). Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *Elife* .

M. Toda. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding human drebrin E and chromosomal mapping of its gene. *Biochem Biophys Res Commun.*

M.A.S. Baptista. (2013). Loss of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in rats leads to progressive abnormal phenotypes in peripheral organs. . *PLoS ONE* .

M.O. Collins. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem.*

MC. Raff. (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* .

MM. Kessels. (2000). Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Mol Biol Cell.*

N. Honkura. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron.*

N. Kojima. (2016). Drebrin A regulates hippocampal LTP and hippocampus-dependent fear learning in adult mice. *Neuroscience.*

N. Kojima. (1993). Molecular cloning of a developmentally regulated brain protein, chicken drebrin A and its expression by alternative splicing of the drebrin gene. . *Brain Res Mol Brain Res.*

N. Shin. (2008). LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. . *Exp Cell Res.*

N. Tambasco. (2016). A53T in una famiglia parkinsoniana: un aggiornamento clinico dei fenotipi SNCA. *J. Trasm. neurale.*

N. Thadathil. (2021). Brain Selective Estrogen Treatment Protects Dopaminergic Neurons and Preserves Behavioral Function in MPTP-induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology.*

O. Sakarya. (2007). A post-synaptic scaffold at the origin of the animal kingdom. *PLoS One.*

OJ. Lieberman. (2020). The Synaptic Autophagy Cycle. . *Journal of Molecular Biology.*

P. Bolam. (2012). Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. *Mov Disord.*

P. Burkhardt. (2015). The origin and evolution of synaptic proteins – choanoflagellates lead the way. *Experimental Biology* .

P. Calabresi. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci.*

P. Kartik. (2020). The evolution of the human brain and disease susceptibility. *ScienceDirect* .

P. Kartik. (2020). The evolution of the human brain and disease susceptibility. *ScienceDirect* .

P. Kartik. (2020). The evolution of the human brain and disease susceptibility.

P. Miklavc. (2014). Surfactant secretion in LRRK2 knock-out rats: changes in lamellar body morphology and rate of exocytosis. *PLoS ONE* .

P. S. Athanasopoulos. (2018). The role of (auto)-phosphorylation in the complex activation mechanism of LRRK2. *Biological Chemistry* .

P. Tagliaferro. (2016). Retrograde Axonal Degeneration in Parkinson Disease. *Journal of Parkinson's Disease* .

R. Chia. (2014). Phosphorylation of LRRK2 by casein kinase 1alpha regulates trans-Golgi clustering via differential interaction with ARHGEF7. *Nat. Commun.*

R. Emes. (2012). Evolution of Synapse Complexity and Diversity. *Annual Review of Neuroscience* .

R. Ishikawa. (1994). Drebrin a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments. . *J Biol Chem.*

R. J. Nichols. (2017). LRRK2 phosphorylation. . *Advances in Neurobiology* .

R. J. Nichols. (2010). 14-3-3 binding to LRRK2 is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization. *Biochemical Journal* .

R. Lichtneckert. (2009). Origin and evolution of the first nervous system. *Evolutionary neuroscience* .

R. Wallings. (2015). Cellular processes associated with LRRK2 function and dysfunction. . *FEBS Journal* .

R. Wallings. (2015). Cellular processes associated with LRRK2 function and dysfunction. *In FEBS Journal* .

S. B. Chidambaram. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.*

S. Biskup. (2007). Dynamic and redundant regulation of LRRK2 and LRRK1 expression. *BMC Neuroscience* .

S. Cogo, &. E. (2020). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) and Parkinson's disease: from genetics to pathobiology. *Genetics, Neurology, Behavior, and Diet in Parkinson's Disease.*

S. Lesage. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* .

S. Nandipati. (2016). Environmental exposures and Parkinson's disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health* .

S. Sharma. (2011). Atomic force microscopy reveals drebrin induced remodeling of F-actin with subnanometer resolution. . *Nano Lett.*

S. Soukup. (2018). Parkinson's disease: convergence on synaptic homeostasis. *The EMBO Journal* .

SF. Soukup. (2018). Parkinson’s disease: convergence on synaptic homeostasis. *The EMBO Journal.*

Shirao, T. (2017). Drebrin From Structure and Function to Physiological and Pathological Roles. *Springer.*

T. Aoki. (n.d.).

T. Mizui. (2014). Myosin II ATPase activity mediates the long-term potentiation-induced exodus of stable F-actin bound by drebrin A from dendritic spines. *PLoS One.*

T. Shirao. (1994). Formation of thick, curving bundles of actin by drebrin A expressed in fibroblasts. *Exp Cell Res.*

T. Shirao. (2017). The roles of microfilament-associated proteins, drebrins, in brain morphogenesis: a review. *Springer Japan KK.*

T. Shirao. (1985). Two acidic proteins associated with brain development in chick embryo. *J Neurochem.*

T.E. Weaver. (2002). Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin. Cell Dev. Biol.*

U. Thomas. (2002). Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J. Neurochem.*

V. Biou. (2008). Interactions between drebrin and Ras regulate dendritic spine plasticity. *Eur J Neurosci.*

W. Freeman. (2007). ICU management of patients with Parkinson's disease or Parkinsonism. *Current Anaesthesia & Critical Care* .

W. Mandemakers. (2012). LRRK2 expression is enriched in the striosomal compartment of mouse striatum. Neurobiology of. *Neurobiology of Disease.*

W. Smith. (2005). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *PNAS* .

Worth et al. (2013). Drebrin contains a cryptic F-actin–bundling activity regulated by Cdk5 phosphorylation. *The Journal of cell Biology* .

Y. Sekino. (2006). Activation of N-methyl-D-aspartate receptor induces a shift of drebrin distribution: disappearance from dendritic spines and appearance in dendritic shafts. *Mol Cell Neurosci.*

Y. Sekino. (2017). Role of Drebrin in Synaptic Plasticity. *Adv Exp Med Biol.*

Y. Tong. (2010). Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* .