



**Dipartimento di Psicologia
Dipartimento di Biologia**

**Corso di Laurea Triennale in Scienze
Psicologiche Cognitive e Psicobiologiche**

Elaborato finale

**Toll-like Receptors e alfa-sinucleinopatie:
studi comportamentali in *Drosophila melanogaster***

**Toll-like receptors and alpha-synucleinopathies:
behavioral studies in *Drosophila melanogaster***

Relatrice:

Professoressa Gabriella Margherita Mazzotta

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova

Laureanda:

Giorgia Zilio

Matricola:1192245

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

1. ABSTRACT.....	2
2. INTRODUZIONE.....	3
2.1. Stato dell'arte.....	3
2.2. α -sinucleina.....	4
2.3. Toll-Like Receptors.....	8
2.4. Scopo della ricerca.....	10
3. METODI.....	13
3.1. Descrizione linee.....	13
3.2. Sistema binarioUAS-GAL4.....	14
3.3. RNA interference.....	14
3.4. Esperimenti.....	15
3.5. Bilanciamento linee.....	17
4. RISULTATI.....	18
5. CONCLUSIONE.....	24
6. APPENDICE.....	25
6.1. Incroci.....	25
6.2. Descrizione Linee bilanciatore.....	26
6.3. Bilanciamento linee.....	28
6.4. PCR.....	31
7. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	33

ABSTRACT

Nonostante il ruolo funzionale della proteina α -sinucleina non sia ancora del tutto chiarito, ci sono evidenze del coinvolgimento di forme patogeniche di α -sinucleina (SNCA) nell'insorgenza e nel decorso di malattie neuro-degenerative nell'uomo. Le isoforme mutanti SNCA-A30P e SNCA-A53T, a causa di errato ripiegamento, conducono alla formazione di aggregati proteici che causano la morte dei neuroni dopaminergici. Le sinucleinopatie prevedono infatti la presenza di accumuli di α -sinucleina in forma di oligomeri o neurofibrille come causa del deterioramento e della morte delle cellule neuronali. Gli accumuli di α -sinucleina sono un marker del morbo di Parkinson e sono tra i principali costituenti dei corpi di Lewy. Questa tesi tratta di uno studio comportamentale preliminare, condotto in un modello di *Drosophila melanogaster*, nel quale, oltre a confermare i dati presenti in letteratura riguardanti gli effetti patogenici dell'espressione di α -sinucleine mutanti in neuroni dopaminergici, si amplia l'indagine ai sintomi non motori delle sinucleinopatie, quali attività, periodicità e sonno. È stata condotta anche un'analisi preliminare volta a individuare un possibile coinvolgimento dei Toll-like receptors, noti per essere implicati nella risposta immunitaria a patogeni e danni tissutali e nella plasticità cerebrale sia durante lo sviluppo che in età adulta, nella progressione delle α -sinucleinopatie anche nel modello *Drosophila*. I risultati preliminari relativi alla manipolazione del gene per il Toll receptor *18-wheeler* (sovra-espressione o down-regolazione) nei neuroni dopaminergici, suggeriscono il possibile coinvolgimento di questo gene nella modulazione degli effetti patogenici delle sinucleopatie, così come osservato nei mammiferi. I Toll-like receptors sembrano essere una valida via da percorrere per la comprensione e cura delle malattie neurodegenerative.

INTRODUZIONE

Stato dell'arte: ruolo di α -sinucleina e Toll-like receptors nel Morbo di Parkinson

Il Morbo di Parkinson è la più comune tra le sinucleinopatie, ovvero malattie causate da accumulo di α -sinucleina amiloide (Mhyre et al. 2012). Si tratta di una malattia neurodegenerativa i cui sintomi più considerati, nonché gli unici per i quali sia disponibile una terapia farmacologica, sono di natura neuromotoria. Tuttavia, questa sindrome presenta anche compromissioni intestinali, del Sistema nervoso Autonomo e del funzionamento cognitivo, oltre ai sintomi legati a disturbi del sonno e del ritmo circadiano ai quali è principalmente dedicato questo elaborato.

Il Morbo di Parkinson è caratterizzato dall'accumulo di aggregati proteici all'interno delle cellule cerebrali dopaminergiche, nella substantia nigra, nel nucleo caudato e nel putamen, (Spillantini et al. 1998) con la conseguente carenza del neurotrasmettitore dopamina dovuta alla degenerazione selettiva dei neuroni dopaminergici identificabile come marker dei malati di Parkinson. Tali accumuli sono detti Corpi di Lewy e sono costituiti principalmente dalla proteina α -sinucleina. La presenza di questi aggregati è dovuta a isoforme tossiche di questa proteina, la quale nella sua forma adattiva sembra essere coinvolta in aspetti di trasporto di membrana (membrane trafficking dynamics) con ruoli nella neurotrasmissione e nel mantenimento delle sinapsi.

Diverse specie oligomeriche e instabili della proteina α -sinucleina sono state identificate a monte di cascate di eventi che conducono a neurotossicità, quali la deregolazione autofagica/lisosomiale e disfunzioni sinaptiche che causano a valle la neuro-degenerazione. Si crea inoltre un rapporto non ottimale tra l'eliminazione e la formazione di nuove forme tossiche di α -sinucleina, che innesca un circolo vizioso che conduce alla velocizzazione della neuro-degenerazione.

Nonostante la barriera fisica che separa il sistema nervoso centrale (SNC) dal sistema immunitario, diversi studi hanno confermato la presenza di cooperazione tra essi (Ransohoff Et al. 2003; Chavan et al. 2017). Classicamente, infatti, data l'assenza di drenaggio linfatico e la presenza della Barriera Ematoencefalica (blood brain barrier, BBB) il sistema nervoso centrale è stato considerato una sede immunologicamente indipendente, considerazione messa in discussione dal coinvolgimento dei Toll-Like Receptors (TLRs) nella risposta neuro-infiammatoria provocata dal Parkinson.

Le valutazioni riguardanti la connessione tra Parkinson, infiammazione sistemica e neuro-infiammazione dovute alla malattia, hanno evidenziato un ruolo significativo dei TLRs, in modo particolare TLR2 e TLR4, nella patogenesi del Morbo di Parkinson in quanto promotori di risposte immunitarie con conseguenze neuro-infiammatorie precedenti alla comparsa sia dei sintomi motori che di quelli non motori (Hirsch et al. 2021; Riederer et al. 2019; Jellinger 2019; Sian-Hulsmann 2021; Kumar 2019).

Oltre a rispondere ad acidi nucleici virali e microrganismi invasori, infatti, nei mammiferi i TLRs rilevano anche danni endogeni ai tessuti, detti Schemi Molecolari di Pericolo (DAMP), tra i quali anche il rilascio di α -sinucleine rilevato tramite il danno che esse provocano ai tessuti e alle cellule nervose (Frederiksen et al. 2019). Sembra che il rilascio di TLRs a seguito dei danni provocati da α -sinucleina esacerbi il meccanismo di apoptosi tramite l'avvio di un ciclo di segnalazione a cascata che coinvolge diversi mediatori infiammatori (May et al. 1998; Ramesh et al. 2013; Piccinini et al. 2010). I TLRs saranno successivamente descritti in dettaglio in un paragrafo successivo di questo documento.

La sintomatologia del Parkinson è ampiamente riproducibile in *Drosophila melanogaster*, ragion per cui essa è diventata il modello animale di elezione per lo studio di questa sinucleinopatia. Benché la specie *Drosophila* non possieda un gene per α -sinucleina, l'espressione ectopica di tale proteina umana nel sistema nervoso ricapitola le caratteristiche principali del morbo di Parkinson, quali perdite area-specifiche ed età-dipendenti di neuroni dopaminergici, e formazione di corpi e neuriti di Lewy (Feany et al. 2000).

L'accumularsi di prove che collegano TLRs e meccanismi di immunità innata ai disturbi neurodegenerativi offrono una prospettiva incoraggiante sul possibile trattamento di questa malattia, anche se i meccanismi specifici necessitano di essere ulteriormente indagati.

α -sinucleina

Risale al 1997 (Polymeropoulos et al. 1997) la scoperta di lesioni filamentose dovute alla mutazione della proteina α -sinucleina in forme di Parkinson familiare. Questa scoperta suggerisce l'influsso di una componente genetica in questa malattia neurodegenerativa molto diffusa, indicando la consequenzialità tra la presenza di una lesione genetica e l'accumulo di filamenti di α -sinucleina nel citoplasma di cellule nervose (Spillantini et al. 1998).

Le forme di Parkinson inizialmente considerate dovute a fattori genetici riguardano una forma della patologia a trasmissione autosomica dominante e ad esordio precoce attorno ai 40 anni, dovuta ad una mutazione che causa la sostituzione di G209A (sostituzione del nucleotide 209 da G, Guanina ad A, Adenina) nel gene SNCA codificante per la proteina presinaptica α -sinucleina, con il risultato di un cambiamento nell'amminoacido A53T (Polymeropoulos et al. 1997 ; Wang et al. 1998). Sono state successivamente identificate altre due mutazioni puntiformi a carico del gene SNCA, le quali conducono a variazioni rispettivamente negli amminoacidi A30P e A53T, sempre risultanti in forme del Morbo di Parkinson ad ereditarietà autosomica dominante (Kruger et al. 1998, Zarranz et al. 2004).

Un'altra pista percorribile per spiegare l'insorgenza del morbo di Parkinson a livello genetico prende in considerazione una gain-of-function tossica del gene SNCA (Stefanis 2012). Quest'ipotesi ha origine da studi che identificano duplicazioni e triplicazioni del

locus SNCA in famiglie che presentano anch'esse la patologia in forma autosomica dominante, con conseguente duplicazione del quantitativo totale di α -sinucleina nella cellula. Si evidenzia in questo assetto patologico un effetto dose-dipendente, in quanto i pazienti che presentavano triplicazione del locus soffrivano di Parkinson con insorgenza più precoce e sintomatologia più grave rispetto ai pazienti nei quali il locus era duplicato (Singleton et al. 2003; Fuchs et al. 2007). L'ipotesi che prevede una "gain-of-function" tossica di α -sinucleina è supportata anche dall'accumulo di α -sinucleina rilevato in studi post-mortem nei cervelli dei pazienti affetti da sinucleinopatie, e simulazioni in delle caratteristiche di questo cluster di malattie in diversi modelli animali, nei quali la patologia è innescata dalla sovra-espressione di α -sinucleina wild type (WT) (Stefanis 2012), nonché dall'aumento del quantitativo di α -sinucleina che si manifesta nella substantia nigra con il procedere dell'invecchiamento (Chu and Kordower 2007).

Tale possibilità necessita però di essere indagata ulteriormente, in quanto alcuni studi rivelano tendenze contrarie a quelle sopraindicate (Stefanis 2012), discrepanze tuttavia che possono essere attribuibili ad una maggiore vulnerabilità dei neuroni sovra-esprimenti α -sinucleina, che tendono a morire precocemente lasciando il posto a cellule gliali, confondendo così il decorso cronologico della patologia (Grüdemann et al. 2008, Tong et al. 2010).

La proteina α -sinucleina, codificata dal gene SNCA, si compone di 140 aminoacidi ed è considerabile una "proteina nitidamente dispiegata", in quanto se posta in soluzione acquosa non presenta una morfologia stabile e definita. È da notare però che essa ha la capacità di assumere una struttura a α -elica legandosi ai lipidi carichi negativamente quali sono i fosfolipidi delle membrane cellulari e può inoltre assumere una forma caratterizzata da strutture β -foglietto a seguito di un prolungato periodo di incubazione. La proteina α -sinucleina è composta di tre regioni differenziabili: presenta un terminale amminico (residui 1-60), il quale contiene motivi di legame ai lipidi delle apolipoproteine che conferiscono alla proteina la propensione a creare le sopraccitate strutture α -elica sui legami di membrana; questa sezione amminica della proteina è ripresa da ripetizioni imperfette di aminoacidi, con la sequenza consensuale Lys-Thr-Lys-Glu-Gly-Val (Spillantini et al. 1998). La regione amminica è seguita da una regione idrofoba centrale (residui 61-95) denominata NAC (Non A- β Component), la quale conferisce alla proteina la capacità di creare le strutture a β -foglietto. L'ultima parte della proteina è un terminale carbossilico, altamente carico negativamente e tendenzialmente non strutturato.

L' α -sinucleina è una proteina prevalentemente neuronale, ampiamente espressa nel sistema nervoso in particolare nei terminali presinaptici, in stretta prossimità delle vescicole sinaptiche ma non all'interno di esse; è tuttavia presente anche in eritrociti e piastrine, anche se non è ancora noto quale sia la sua funzione (Stefanis 2012).

I livelli di α -sinucleina subiscono variazioni significative in condizioni in cui vi è un'alterazione della plasticità neuronale o danneggiamento del sistema nervoso (George et al. 1995; Kholodilov et al. 1999; Vila et al. 2000); esami sulle proprietà

neurofisiologiche di topi nei quali era alterata l'espressione di α -sinucleina hanno rivelato alterazioni nel rilascio di neurotrasmettitori, permettendo di ipotizzare un possibile coinvolgimento di questa proteina nella modulazione della trasmissione sinaptica (Abieliovich et al. 2000; Murphy et al. 2000; Cabin et al. 2002; Larsen et al. 2006).

Vi sono evidenze di comportamenti dell' α -sinucleina congruenti con l'ipotesi che questa agisca creando delle sottili crepe nelle vescicole, che fungono da punti di rilascio del neurotrasmettitore, allontanandosi dalle vescicole durante il firing neuronale, per poi tornare gradualmente in prossimità (Fortin et al. 2005); ciò suggerisce la formazione di legami transitori tra α -sinucleine e vescicole, e i risultati pubblicati (Murphy et al. 2000) indicano che questa proteina potrebbe essere coinvolta nella biogenesi vescicolare e nella compartimentazione tra vescicole a riposo e vescicole pronte al rilascio.

La funzione principale dell' α -sinucleina sembra quindi essere legata al controllo del rilascio di neurotrasmettitori; questa ipotesi è coerente con i sintomi presentati in condizione di sinucleinopatie.

Come detto precedentemente, l' α -sinucleina sembra acquisire capacità neurotossiche in seguito alla sua aggregazione in oligomeri, corpi di Lewy e forme filamentose; l'analisi dei filamenti estratti dalla corteccia cingolata di pazienti con demenza da corpi di Lewy, rivela la presenza di filamenti di diametro di 5-10 nm (Spillantini et al. 1998).

Le strutture identificate da questo studio si presentano con morfologie differenti, con filamenti dritti di 5nm e una maggioranza di filamenti, sia dritti che ritorti, di 10 nm: sembra quindi che l' α -sinucleina passi per un primo stadio aggregativo che prevede la formazione di filamenti di 5nm, i quali poi hanno la tendenza a fondersi tra loro creando filamenti da 10 nm. Questa varietà di forme lascia spazio all'ipotesi che le molecole non strutturate di α -sinucleina siano in grado di aggregarsi posizionandosi parallelamente ai filamenti già formati (Spillantini et al. 1998).

Questi filamenti, anche detti fibrille, si comportano analogamente a proteine amiloidi, conferendo all' α -sinucleina un forte potere aggregativo, costituendosi come base per i corpi di Lewy e i neuriti di Lewy che caratterizzano le sinucleinopatie.

La capacità dimostrata da α -sinucleina di formare strutture β -foglietto, crea un parallelismo tra il Parkinson e le altre sinucleinopatie con le strutture β -foglietto che costituiscono le placche β -amiloidi della malattia di Alzheimer, evidenziando quindi una caratteristica comune tra le malattie neurodegenerative più diffuse.

Il processo di aggregazione dell' α -sinucleina consiste di un susseguirsi di eventi che iniziano dalla proteina in forma nitidamente dispiegata e si concludono con la fibrilla matura. L' α -sinucleina viene infatti espressa come forma oligomerica solubile, che si aggrega in forma di stringa, sfera o anello allo stadio di proto-fibrille, per poi fondersi nuovamente e raggiungere lo stadio insolubile di fibrille mature.

Le mutazioni puntiformi che si ritengono responsabili degli effetti neurodegenerativi di α -sinucleina sono A53T, A30P e E46K. Tra queste, A30P e A53T formano un numero maggiore di proto-fibrille rispetto alla forma WT, mentre, contrariamente alle aspettative E46K produce meno proto-fibrille di WT, invalidando di fatto parzialmente

la tesi basata sulle capacità aggregative di α -sinucleina come unico meccanismo patogenetico (Conway et al. 2000; Fredenburg et al. 2007).

L'aumentata sensibilità dei neuroni dopaminergici nel decorso del morbo di Parkinson offre una possibile spiegazione in controtendenza all'ipotesi della neurotossicità dovuta prevalentemente alle fibrille, in quanto la dopamina e suoi metaboliti agiscono ostacolando la conversione delle proto-fibrille in fibrille mature, formando aggregati dopamina/ α -sinucleina (Conway et al. 2001; Mazzulli et al. 2006; Tiska et al. 2010). È necessario comunque tenere presente che vi è variabilità tra le forme di neurofibrille, quindi, può essere che solo alcune di queste diverse forme abbiano effetti neurotossici, come va tenuta presente l'azione neurotossica sul lungo tempo delle inclusioni fibrillari mature di α -sinucleina, che accumulandosi possono ostruire e bloccare il traffico assonale.

Altra caratteristica molto rilevante negli aspetti patologici di α -sinucleina è la tendenza dimostrata da questa proteina alla propagazione delle aggregazioni. Inizialmente considerata una proteina intracellulare, dosi significative di α -sinucleina sono state rilevate anche nei fluidi extracellulari quali plasma e liquido cefalorachidiano (El-Agnaf et al. 2003; Lee et al. 2005). È stato dimostrato che tale proteina secreta a livello cerebrale in una delle sue forme patogeniche, può impattare sull'omeostasi dei neuroni anche in concentrazioni relativamente basse (Emmanouilidou et al. 2010; Danzer et al. 2011), e la concentrazione extracellulare di α -sinucleina può esacerbare la neurodegenerazione tramite l'infiammazione che essa causa nelle cellule gliali (Zhang et al. 2005; Klegeris et al. 2008; Lee et al. 2010).

La fibrillizzazione, ovvero l'aggregazione di α -sinucleina endogena attorno a conglomerati oligomericici di tale proteina in forma patologica, sembra essere una valida spiegazione della rapida propagazione del morbo di Parkinson, che si espande a causa della degenerazione di neuroni tra loro adiacenti; gli aggregati oligomericici sembrano infatti avere la capacità di essere assorbiti da altre cellule, e fare da seeding per la formazione delle fibrille che causeranno in seguito la morte della cellula cerebrale (Stefanis 2012; Danzer et al. 2007, 2009, 2011; Waxman and Giasson 2010; Nonaka et al. 2010; Hansen et al. 2011).

Non è del tutto chiaro come venga secreta l' α -sinucleina; un'ipotesi quotata, che si integrerebbe coerentemente con effetti patogenici dell' α -sinucleina a livello sinaptico, è la possibilità che questa proteina si avvalga per il rilascio di esosomi, ovvero vescicole endocitotiche contenute entro corpi multi-vescicolari che vengono rilasciate sotto l'influsso di calcio (Emmanouilidou et al. 2010).

Data l'attività funzionale del Calcio nei neuroni, ne quali agisce da signaling presinaptico, è d'uopo considerare la possibilità che nella degenerazione dei neuriti indotta da α -sinucleina vi sia un coinvolgimento dello squilibrio omeostatico del Calcio. Sembra che gli oligomeri di α -sinucleina abbiano la capacità di formare dei pori nelle membrane cellulari, causando un eccessivo influsso di calcio mediante l'alterazione della funzionalità dei recettori voltaggio-dipendenti (Volles e Lansbury 2002; Danzer et al. 2007; Hettiarachchi et al. 2009). Tale meccanismo che prevede la formazione di pori

da parte degli oligomeri di α -sinucleina potrebbe causare perdite di neurotrasmettitore nel citosol, attaccando le vescicole sinaptiche; l'eccesso di dopamina nel citosol può condurre la cellula a morte per stress ossidativo (Mosharov et al. 2006). L'interazione tra eccesso di calcio intracellulare, dopamina nel citosol e aggregazione di α -sinucleina sembra formare un circolo vizioso che si autoalimenta, perpetrando la neuro-degenerazione (Mosharov et al. 2009).

Data la collocazione presinaptica di α -sinucleina e il ruolo di regolatore del rilascio di neurotrasmettitore che questa proteina svolge in stato fisiologico, gli effetti neurotossici indotti da mutazioni nel gene SNCA sono preponderanti a livello sinaptico. In ultima analisi la degenerazione neuronale dovuta alle sinucleinopatie conduce ad una serie di danni sinaptici quali perdita di proteine sinaptiche, alterazioni nel rilascio dei neurotrasmettitori, dilatazione e incapacità di riciclaggio delle vescicole sinaptiche (Chung et al. 2009; Scott et al. 2010; Ne mani et al. 2010).

Questa serie di deficit che minano su diversi fronti alla funzionalità del neurone e delle sue capacità di trasmissione, sembrano essere precursori immediati del morbo di Parkinson e delle altre sinucleinopatie, determinando la degenerazione di sinapsi e neuriti che conduce in seguito ad una diffusa morte dei neuroni dopaminergici.

Toll e Toll-like receptors

Toll Like Receptors (TLRs) sono recettori di membrana posti sulla superficie della cellula, la cui funzione più nota è associata al signaling che innesca le risposte immunitarie di un organismo in seguito ad aggressione da parte di patogeni e forme virali (Lind et al. 2022; Conte 2021) o anche in risposta a danneggiamenti tessutali (Kawai et al. 2011), come nel caso del Morbo di Parkinson. Spesso in analisi post-mortem del cervello di pazienti affetti da sinucleinopatie viene riscontrato anche un quantitativo ingente di TLRs (Dzamko et al. 2017).

In diversi studi pubblicati è stata evidenziata una connessione tra i TLRs e il meccanismo molecolare che sottostà alla plasticità neuronale (Lu et al. 2005, 2013; Okun et al. 2011; Park and Poo 2013). In *Drosophila*, grazie ai molteplici pattern di espressione i TLRs possono regolare un ventaglio di differenti reazioni e modifiche funzionali e strutturali del sistema nervoso centrale, anche opposte tra loro e innescate da svariati contesti differenti. In particolare, i diversi possibili esiti della reazione a catena innescata dai geni Toll, in combinazione con la loro peculiare espressione topografica relata alle specifiche aree del sistema nervoso, contribuiscono alla formazione dei molteplici moduli di funzionamento integrati, i quali sono presenti nel cervello di differenti organismi di complessità variabile (Li et al. 2020). Le evidenze sopracitate rendono possibile ipotizzare che questi geni siano coinvolti nel meccanismo alla base della diversificazione strutturale e funzionale che ha permesso di adattare il cervello di ogni organismo allo specifico pattern di stimoli ambientali che esso riceve

nel corso della propria storia filogenetica, grazie alla possibilità che ne deriva di regolare la plasticità strutturale in modo dominio-specifico.

Nei mammiferi ci sono 12 Toll like receptors, i quali formano omodimeri o eterodimeri con altri membri della famiglia dei TLRs. I TLRs sono implicati in molte patologie del sistema nervoso centrale, tra cui ischemie, neuro-degenerazioni indotte da accumulo di proteine e depressione (Okun et al. 2011).

Nel topo, organismo modello preso principalmente in considerazione per indagare la localizzazione dei TLRs nel SNC, la microglia è la popolazione di cellule nervose che esprime i più alti livelli di TLRs, in particolare di TLR-2, TLR-7 e TLR-9 e anche se in concentrazione più bassa, TLR-13. Gli astrociti esprimono in modo specifico il TLR-3 a bassi livelli, mentre i neuroni corticali non esprimono alcun TLR. Le cellule precursori degli oligodendrociti esprimono un quantitativo moderato di TLR-7, mentre gli oligodendrociti non esprimono TLRs. Le cellule endoteliali hanno bassi livelli di TLR-3 e TLR-12 (Shmueli et. al. 2018).

Le analisi dei trascritti dei Toll-pathways nel sistema nervoso centrale delle mosche e del topo hanno evidenziato differenze e similarità: mentre l'analisi dell'espressione di geni Toll in *Drosophila* ha evidenziato l'espressione di diversi geni Toll in tutte le popolazioni di neuroni testate e nella glia, alti livelli di espressione dei TLRs nei roditori erano limitati a pochi TLRs (2, 7, 9) nella microglia e bassi livelli di TLR-3 e TLR-7 in astrociti e tessuto endoteliale (Shmueli A. et al. 2018).

I Toll-like receptors e i Toll receptors, ovvero il corrispettivo dei TLRs receptors riscontrati in *Drosophila* prima ancora che nei mammiferi, oltre a condividere la ben nota e studiata funzione di attivazione immunitaria, presentano altre funzioni comuni conservatesi indipendentemente dal differenziamento degli organismi a seguito dell'evoluzione.

In *Drosophila*, i Toll receptors sono stati identificati come fattori fondamentali del corretto sviluppo delle mosche durante l'embriogenesi e in fasi successive, del riconoscimento di patogeni e lesioni e del conseguente innesco della risposta immunitaria (Li and Hidalgo 2021). A questi recettori posti nella membrana plasmatica e ai geni che li codificano è stato attribuito anche un ruolo nell'omeostasi del sistema nervoso centrale.

Drosophila presenta nove Toll receptors, alcuni dei quali coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso e nella plasticità neurale, almeno nelle prime fasi di sviluppo delle mosche. Nello specifico, i Toll receptors sembrano partecipare alla regolazione della connettività neurale e del numero di cellule cerebrali e alla strutturazione delle sinapsi (Zhu et al. 2008; McIlroy et al. 2013; Ballard et al. 2014; Ward et al. 2015; McLaughlin et al. 2016; Foldi et al. 2017; Ulian-Benitez et al. 2017; Li et al. 2020). I *Toll-1,-2,-3,-5,-6-7* e *8* sono espressi però anche nel cervello di mosche adulte, in pattern solo parzialmente sovrapposti, con una divisione nella distribuzione dell'espressione dei diversi Toll relata ad espressione specifica in diverse aree anatomico-funzionali del cervello (Li et al. 2020).

Nelle cellule gliali e neuroni di *Drosophila melanogaster* sono espressi principalmente 4 geni Toll: *Toll-1*, *Toll-2*, *Toll-6* e *Toll-7*; nella glia e nei neuroni dopaminergici sono espressi anche i *Toll-8*. *Toll-4*; *Toll-5* e *Toll-9* non sono espressi nel sistema nervoso centrale (Shmueli A. Et. Al. 2018).

Da un'analisi complessiva di diversi studi risulta che *Toll-1* sia coinvolto principalmente in funzioni relative alla risposta immunitaria in condizioni omeostatiche, mentre altri membri della famiglia dei Toll come *Toll-6*, *Toll-7* e *Toll-8* partecipano allo sviluppo e al mantenimento dell'omeostasi nel sistema nervoso centrale (Shmueli A. et al. 2018).

Il gene che codifica per *Toll-2*, anche conosciuto come “*18 wheeler*” è stato preso in considerazione nel lavoro presentato in questa tesi, dato il suo ruolo regolativo nella sopravvivenza dei neuroni e delle cellule cerebrali. In studi precedenti è stato dimostrato che la perdita del gene *Toll-2* causa la degenerazione di assoni e dendriti (Li et al. 2020).

Toll-2 inoltre regola la proliferazione delle cellule nervose durante lo sviluppo, mentre in generale il silenziamento di diversi Toll durante le prime fasi critiche della vita dell'organismo porta ad una significativa riduzione nelle dimensioni del cervello, una ridotta proliferazione cellulare ed un aumento di mortalità delle cellule (Li et al. 2020). Anche se le funzioni dei geni Toll risultano spesso ridondanti, conducono a risultati differenti sul piano cellulare.

Toll-2 è responsabile per il processo sottostante la plasticità strutturale nel cervello di mosche adulte, in quanto se espresso specificamente in mosche adulte comporta la proliferazione cellulare, aumenta il numero di cellule cerebrali e le dimensioni del cervello (Li et al. 2020). È inoltre un fattore neuro-protettivo, e il Knock-down di *18-wheeler* causa la deviazione assonale, la perdita di neuroni e conseguenti difetti rilevabili a livello comportamentale (Li et al. 2020).

Scopo della ricerca

Questo studio si focalizza in modo particolare su quelle che sono le caratteristiche non motorie del Morbo di Parkinson, ovvero l'alterazione dei ritmi circadiani provocata da questa malattia. I ritmi circadiani sono oscillazioni biologiche interne all'organismo, quali cicli sonno/veglia e rilascio di diversi ormoni; tali cicli sono, come suggerisce il nome, caratterizzati da periodicità di approssimativamente 24 ore, tendenzialmente concomitante con l'ora solare. Il sistema circadiano subisce variazioni significative con l'invecchiamento, e tali alterazioni risultano coincidenti ad alcune delle modificazioni che questa ritmicità biologica subisce in diverse malattie neurodegenerative, tra le quali il Morbo di Parkinson e altre sinucleinopatie.

Non vi è ancora chiarezza sui meccanismi che collegano le sinucleinopatie alla mancata regolazione del sistema circadiano, tuttavia, vi sono copiose evidenze dell'associazione tra sistema immunitario e orologio circadiano (Cusumano et al. 2018; Abele et al. 2019; Hergenhan et al. 2020; Labrecque et al. 2015; Waggoner 2020; Arjona et al. 2012), e

tale coinvolgimento interessa anche i TLRs (Fan XL et al., 2021). Più specificatamente, è stato rilevato il legame della risposta immunitaria di TLR4 e TLR9 con i ritmi circadiani (Silver et al. 2012; Yang et al. 2015).

Benché il coinvolgimento dei TLRs nella regolazione su base circadiana della risposta immunitaria in modelli *Drosophila* non sia ancora stato accertato, anche nelle mosche vi sono evidenze di variazioni della risposta all'infezione da patogeni che presentano ritmicità circadiana (Lee et al. 2008; McDonald et al. 2001; Stone et al. 2012; Damulewicz et al. 2018).

Questi esperimenti mirano ad analizzare gli effetti di interazione tra Toll-Like Receptors e α -sinucleina, per approfondire e completare conoscenze acquisite in altri studi, che indicano un coinvolgimento dei Toll-Like Receptors nella più nota delle sinucleinopatie, il Morbo di Parkinson. È infatti stata riscontrata una errata regolazione di TLR2, TLR4 e TLR9 nei pazienti Parkinson; il Toll Like Receptor 2 è stato riscontrato in quantità significativamente superiori alla norma in analisi post-mortem di cervelli di pazienti affetti da Morbo di Parkinson, e il suo quantitativo è correlato ai livelli di α -sinucleina presenti nei cervelli analizzati (Dzamko et al. 2017). TLR4 risulta sovra-espresso in varie regioni del cervello, nonché nelle cellule immunitarie periferiche dei pazienti Parkinson (Shin et al. 2015) mentre, sempre in questo tipo di pazienti, il TLR9 risulta sovra-espresso nello striato (Ros-Bernal et al. 2011).

Il connubio tra i dati riscontrati in merito alla presenza di TLRs in analisi post-mortem di cervelli Parkinson e la confermata espressione di parte dei Toll-Like Receptors nel cervello umano adulto (Shmueli et al. 2018), rende obiettivo di questo studio comprendere come la deregolazione di tali geni in compresenza di forme mutanti di α -sinucleina possa giocare un ruolo nella risposta immunitaria alla neuro-degenerazione. In luce delle analisi precedentemente citate in questo paragrafo, questa ricerca si pone lo scopo di svolgere un'approfondita analisi sui legami tra TLRs e sinucleinopatie, indagando sul possibile coinvolgimento di Toll Like Receptors nei sintomi non motori associati ai ritmi circadiani che si manifestano nel Morbo di Parkinson. Ulteriori indagini dovranno essere svolte in successivi esperimenti, per verificare e comprendere i pattern dell'espressione ritmica dei TLRs nel modello *Drosophila*.

Uno degli aspetti maggiormente approfonditi nell'esperimento corrente, per quanto riguarda il legame dei TLRs con la sintomatologia non motoria a carattere circadiano del Parkinson, è il comportamento di sonno.

A tale scopo verranno create mosche mutanti nelle quali i TLRs verranno espressi o silenziati in modo specifico nei neuroni dopaminergici, dato che sono i neuroni dopaminergici nella substantia nigra ad essere maggiormente coinvolti nel decorso del morbo di Parkinson. Analizzando gli effetti di tali manipolazioni genetiche sarà possibile comprendere se vi è un coinvolgimento dei TLRs nelle sinucleinopatie.

Essendo tra i Toll-receptors maggiormente espressi nei neuroni dopaminergici (Shmueli et al. 2018), prenderemo inizialmente in esame solo *18 Wheeler*.

Viene infatti in questo esperimento svolta un'approfondita analisi sul comportamento circadiano durante il periodo di sonno di mosche sovra-esprimenti α -sinucleina wild

type (WT) o mutata e di mosche che sovra-esprimono TRLs o al contrario, nelle quali i TRLs sono silenziati.

Una stima che va dal 60 al 90% dei malati di Parkinson presenta una varietà di disfunzioni del sonno debilitanti e fortemente impattanti sulla qualità della vita, quali sonno frammentato, disturbi del comportamento del sonno REM (Rapid Eye Movement) e sindrome delle gambe senza riposo; questi sintomi hanno carattere prodromico, ma si protraggono però per tutto il decorso della malattia (Barone et al. 2009; Raggi et al. 2013).

Anche i sintomi motori, le prestazioni visive, e la risposta ai classici trattamenti dopaminergici quali la somministrazione di Levo-dopa risultano avere influenze circadiane (Struck et al. 1990; Bonuccelli et al. 2000).

La misura degli effetti di squilibrio circadiani può offrire una nuova prospettiva sulla quantificazione in vivo della tossicità di α -sinucleina, e l'indagine di tali aspetti può essere svolta sul modello *Drosophila* di α -sinucleina nel quale si riscontrano difetti circadiani coerenti con la sintomatologia delle sinucleinopatie (Gajula Baliya et al. 2011).

Per indagare i difetti circadiani in *Drosophila*, questo esperimento prevede una pedissequa caratterizzazione delle configurazioni di attività locomotoria e dei profili di sonno delle mosche che esprimono le diverse forme di α -sinucleina nei neuroni dopaminergici e delle mosche nelle quali il TLR2 è sovra-espresso o down-regolato.

METODI

Descrizione delle linee

Per la conduzione di questo esperimento sono state fornite *Drosophila* transgeniche dagli stock centers di due differenti laboratori.

Linee con α -sinucleina (Bloomington *Drosophila* Stock Center BDSC, Indiana):

- #BL8146 esprime α -sinucleina umana wild type (WT) sotto il controllo di UAS
- #BL8147 esprime α -sinucleina umana nella forma mutante A30P sotto il controllo di UAS
- #BL8148 esprime α -sinucleina umana in forma mutante A53T sotto il controllo di UAS
- #BL51375 esprime α -sinucleina umana WT con codoni ottimizzati per insetti sotto il controllo di UAS
- #BL80043 esprime α -sinucleina umana con mutazione EK46 responsabile di forme di Parkinson familiare sotto il controllo di UAS
-

Linee con TLRs sovra-espressi o down-regolati:

- #BL92996 *18wheeler* a lunghezza intera con un tag EGFP C-terminale espresso sotto il controllo di UAS (BDSC)
- #44387 *18-wheeler* down-regolato espresso sotto il controllo di UAS (Vienna *Drosophila* Resource Center VDRC)
- #965 *18-wheeler* down-regolato espresso sotto il controllo di UAS (Vienna *Drosophila* Resource Center VDRC).

Linee driver:

- driver *Th-Gal4* permette l'espressione dei costrutti controllati da UAS in modo tessuto-specifico, ha come target i neuroni dopaminergici. (già in utilizzo nel dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova).

Linea bilanciatore:

- doppio bilanciatore per i cromosomi 2° e 3°; sul 2° cromosoma le mosche sono eterozigoti per *Cyo* e *Sco*, mentre il 3° cromosoma è in eterozigosi per i geni *MKRS* e *TM6b* (già in utilizzo nel dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova).

Sistema binario UAS-GAL4

Il sistema binario UAS-GAL4 è una tecnica che permette di sovra-esprimere o di silenziare i geni target in modo tessuto-specifico.

Agendo su un determinato gene e andando a regolarne l'espressione, è possibile infatti valutare il coinvolgimento delle proteine da esso codificate nel comportamento di una cellula o nell'espressione di un fenotipo.

Altro vantaggio di questo sistema è la possibilità, trattandosi appunto un sistema binario, di far sovra-esprimere o silenziare ad uno stesso driver diverse forme del gene target, e viceversa.

Per quanto riguarda l'applicazione di questo sistema all'organismo modello *Drosophila melanogaster*, sono necessarie due linee genetiche di mosche: una linea il cui genoma contenga il driver, ed una detta linea "responder", che porti il costrutto Upstream Activation Sequence (UAS, sequenza di attivazione a monte) seguito dal gene da sovra-esprimere o il costrutto RNA-interference (RNAi).

La linea Driver presenterà il transgene GAL4, preceduto da un promotore per uno specifico tessuto, che nel caso degli esperimenti qui descritti è *Th* (*Tyrosine hydroxylase*, *TH-Gal4*), che permette l'espressione del costrutto specificatamente nelle cellule neuronali dopaminergiche.

La linea driver è una linea transgenica, in quanto contenete il gene GAL4 che non è endogeno della specie *Drosophila melanogaster*, ma proviene dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*, nel quale è coinvolto nel metabolismo del galattosio.

Il gene GAL4 è clonato sotto un promotore tessuto-specifico, e viene integrato tramite P-element nella linea driver.

La linea responder presenterà, sotto il controllo della sequenza UAS, il gene da sovra-esprimere o un costrutto RNA-interference costruito allo scopo di silenziare un gene. nell'interazione tra le due linee, GAL4 si comporta come un fattore di trascrizione, legandosi a UAS e guidandone l'espressione, portando così ad una progenie che esprime il costrutto che succede UAS, espresso esclusivamente nel tessuto target.

RNA interference

Un costrutto RNA-interference è lo strumento genetico che, in associazione con il transgene GAL4 permette di silenziare o down-regolare un gene preposto alla produzione di una specifica proteina. Questa applicazione permette di determinare, in base al fenotipo presentato da linee filiali, la funzione della proteina il cui gene è stato silenziato.

Per la produzione di un costrutto RNAi è necessario clonare il gene per la proteina da silenziare in una direzione, porre al centro una regione spacer o linker, seguita nuovamente dal clone del medesimo gene target, solo orientato nella direzione opposta. Il costrutto deve essere inserito in un vettore P-element, a sua volta integrato nel genoma della linea responder. Questo complesso sarà posto a valle della regione di

attivazione UAS, e non sarà quindi espresso previo incrocio con mosche della linea che porta GAL4 preceduto da un promotore per uno specifico tessuto.

Quando nella generazione F1 si sviluppano sia il costrutto RNAi che il driver che ne guida la specifica espressione in un determinato tipo di cellule somatiche, GAL4 si lega alla regione UAS che precede il costrutto nel nucleo della cellula per la quale GAL4 ha un promotore, permettendone l'espressione.

Esperimenti

Grazie all'utilizzo del sistema binario UAS-Gal4 precedentemente descritto in questo elaborato, sono stati creati degli organismi modello per lo svolgimento di esperimenti preliminari che evidenziassero effetti dell'espressione di mutageni per Toll-like Receptors e per α -sinucleine in *Drosophila*.

Ognuna delle linee portatrici dei costrutti per le α -sinucleine prese in considerazione, ovvero mutazioni puntiformi sugli amminoacidi A30P, A53T, EK46 e le due α -sinucleine wild-type delle quali una con codoni ottimizzati per gli insetti, sono state incrociate con il driver *Th-GAL4* per poter esprimere il costrutto di cui erano portatrici nei neuroni dopaminergici delle mosche sperimentali.

Analogamente, anche le linee nelle quali UAS precedeva geni per la sovra-espressione o per la down-regolazione di TLR-2 (anche detto *18-Wheeler* in *Drosophila*) sono state incrociate con il driver *Th-GAL4*, permettendo la sovra-espressione del TLR o il suo Knock-Down nei neuroni dopaminergici degli organismi modello.

Tutte le linee portatrici di α -sinucleine e di *Toll-2* sono state incrociate anche con mosche wild-type, per ottenere degli organismi che potessero svolgere il ruolo di controlli per le linee impiegate nello svolgimento dell'esperimento.

Anche il driver *Th-Gal4* è stato incrociato con la linea wild-type per avere un controllo sperimentale dei potenziali effetti del driver sui parametri valutati.

Con le mosche nate da questi incroci sono stati svolti quattro esperimenti utilizzando DAMSystem© (*Drosophila* Activity Monitor System©, Trikinetics Inc, Waltham, MA, USA).

Questo sistema, integrato dal proprio software di raccolta dati DAMFileScan consiste in una serie di monitor grazie ai quali è possibile misurare l'attività, i periodi di sonno e la periodicità di *Drosophila*. Questi dati, tramite l'apposito software, vengono registrati come file di testo nel computer a cui i monitor sono collegati, per essere poi utilizzati per lo svolgimento di analisi statistiche.

Per ottenere i dati grezzi sui quali svolgere le analisi, è stato necessario prelevare singolarmente il numero di mosche di genere maschile necessario a riempire i monitor. Ogni monitor ha 32 fori, nei quali inserire 32 tubini in vetro precedentemente riempiti ad un'estremità di nutrimento sufficiente a mantenere in vita gli organismi modello per la durata dell'esperimento. Le mosche risultanti dagli incroci di costrutti e driver vengono addormentate con la CO₂, e con degli appositi pennellini sterilizzati vengono spinte dentro ai tubicini in vetro, i quali sono successivamente tappati con un piccolo

pezzo di spugna per permettere comunque alla mosca di respirare e posizionati nello scanner.

La metà della lunghezza del tubino deve essere il punto in cui esso è attraversato dallo scanner, perciò è necessario avere cura che il nutrimento delle mosche non arrivi nel punto in cui il tubino in vetro interseca l'apparecchiatura, e che in generale non vi siano ostruzioni, in quanto il funzionamento di questo apparecchio consiste nell'emissione di un raggio infrarossi che attraversa perpendicolarmente il tubino nel quale sono collocati i moscerini; ogni qualvolta il raggio viene interrotto, il sensore registra attività. L'attività è registrata ogni minuto per i singoli canali, potendo così rilevare movimenti delle singole mosche, e congruentemente con i peculiari pattern di sonno di *Drosophila melanogaster*, ogni qualvolta lo scanner non registra movimenti della mosca per 5 minuti consecutivi o più, tale comportamento viene interpretato e registrato nei dati come periodo di sonno.

Gli esperimenti svolti hanno avuto una durata complessiva di 10 giorni cadauno, 11 nel caso in cui le mosche non fossero state tenute precedentemente in incubatore a 23°, e dovessero quindi adattarsi alle nuove condizioni di stabilità di temperatura e di ratio di luce e buio.

I primi 3 giorni prevedevano un susseguirsi di 12 ore di luce e 12 ore di buio (condizione L/D), i 7 giorni restanti prevedevano invece buio totale (DD). Tutti gli esperimenti sono stati svolti in una cella di controllo ambientale mantenuta alla temperatura stabile di 23°.

Sono stati svolti 4 esperimenti, con mosche di età intermedia compresa tra 10 e 20 giorni.

Il quantitativo di soggetti analizzati sia attesta attorno ad un minimo di 64 mosche per genotipo, vi sono delle differenze di numerosità in quanto, per lo svolgimento della fase successiva della ricerca, si è deciso durante il corso degli esperimenti di continuare a testare solo 3 linee di α -sinucleina e 3 di Toll-like receptors.

Per svolgere le analisi statistiche sui dati, si è proceduto all'eliminazione dei canali riguardanti mosche morte durante gli esperimenti, e mosche non ritmiche, ovvero che non presentano un pattern periodico di attività.

Benché in alcuni genotipi sovra-esprimenti forme patologiche di α -sinucleina abbiano dimostrato trend di mortalità più elevata dei controlli, non è stato possibile saggiare sperimentalmente quest'ipotesi, in quanto sarebbe stata necessaria una differente impostazione degli esperimenti stessi.

I dati grezzi sono stati clusterizzati in bin da 1 minuto per le analisi sul sonno, in bin da 30 minuti per le analisi sulla periodicità e in bin da 1 ora per le analisi sull'attività.

Le analisi sul sonno sono state svolte con R-studio, utilizzando degli script formulati dal Laboratorio di Cronobiologia dell'Università di Padova (ANOVA-one way, α 0,05), le analisi sulla periodicità sono state svolte con il software Faas (media, scarto dell'errore medio), le analisi sull'attività sono state svolte con il programma Prism (ANOVA-one way, α 0,05).

Bilanciamento linee

Una seconda parte del lavoro preliminare svolto per poter realizzare esperimenti più completi che indaghino il possibile effetto modulatore dei Toll-like receptors sulle sinucleinopatie è consistito nella preparazione di organismi modello che portassero i costrutti target in omozigosi; le linee bilanciatore e il procedimento seguito sono descritte in appendice.

RISULTATI

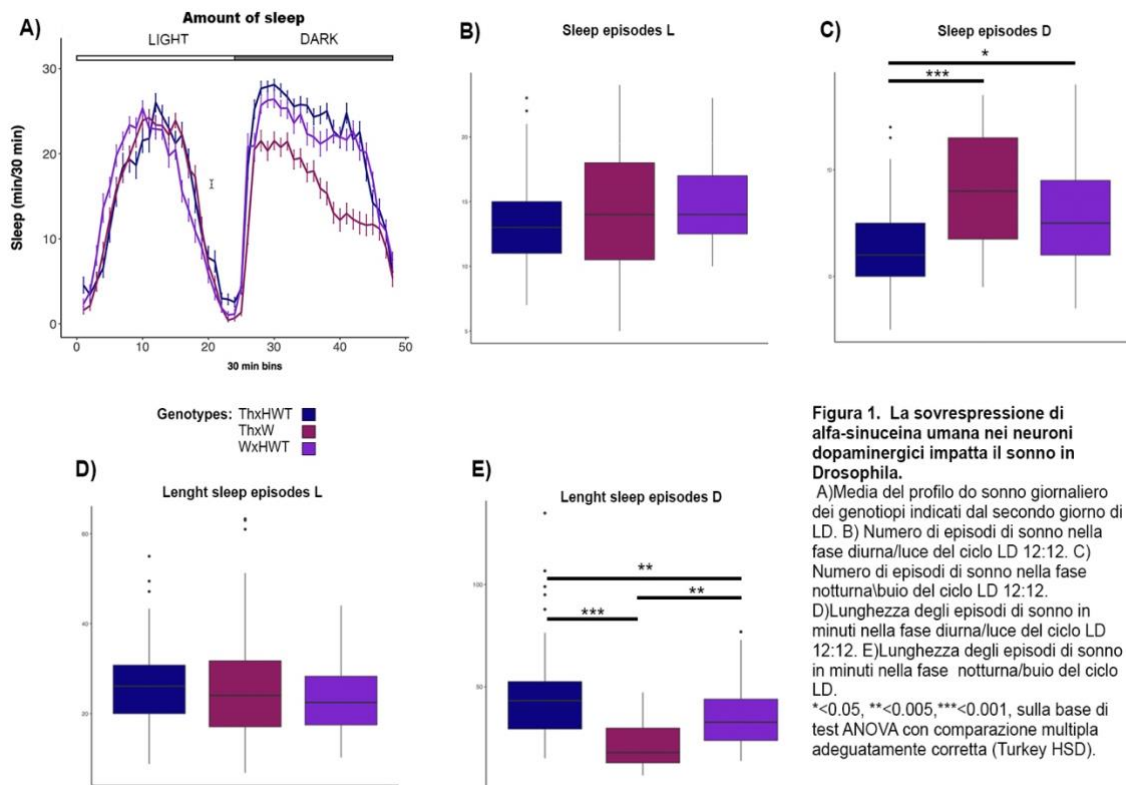
Le analisi svolte per indagare il comportamento di attività e periodicità di mosche con mutazioni per α -sinucleina e per Toll-like receptors non hanno dimostrato differenze comportamentali significative tra gli organismi modello con mutazioni e i controlli, forse anche a causa della giovane età delle mosche analizzate in quanto eventuali effetti di accumulo di α -sinucleina mutata nei neuroni diventano comprensibilmente più evidenti con l'invecchiamento del soggetto sperimentale.

Per lo svolgimento delle analisi sulla periodicità è stato necessario rimuovere dal dataset le mosche morte durante il corso dell'esperimento o che sono risultate essere aritmiche, potendo così notare una moderata tendenza alla mortalità e all'aritmicità circadiana delle mosche con mutazioni di α -sinucleina A30P e A53T sovra-esprese nei neuroni dopaminergici. Essendo queste mutazioni state da diversi studi indicate come responsabili del deterioramento cerebrale nel morbo di Parkinson, potrebbe rivelarsi proficuo tenere in considerazione questa tendenza e svolgere test specifici per valutare tali aspetti in esperimenti successivi.

La tabella sottostante rappresenta l'analisi di periodicità dei genotipi in questione, e dei relativi controlli. È indicato il quantitativo totale di mosche testate, il numero di mosche sopravvissute e il numero e la percentuale di mosche che dimostrano pattern di attività ritmici; è inoltre indicato il periodo medio delle mosche testate.

genotipo	mosche tot.	mosche vive	mosche ritmiche	Periodo
ThxW	64	61	59 96.72%	23.79h
α -synWTxW	57	56	43 76.78%	23.44h
Th>α-synWT	64	59	45 76.27%	23.43h
α -synA30PxW	68	62	55 88.71%	27.38h
Th>α-synA30P	83	79	55 69.62%	27.03h
α -synA53TxW	128	116	96 82.76%	26.60h
Th>α-synA53T	99	84	63 75.00%	27.07h
α -synWTinsectsxW	63	53	51 96.23%	23.57h
Th>α-synWTinsects	44	42	41 97.62%	23.82h
α -synEK46xW	64	59	53 89.83%	24.42h
Th>α-synEK46	64	62	58 93.55%	23.93h
18wOExW	128	120	116 96.66%	23.67h
Th>18wOE	118	112	108 96.43%	23.50h
18wRNAi44387xW	77	76	75 98.68%	23.73h
Th>18wRNAi44387	149	140	136 97.14%	23.61h
18wRNAi965xW	51	49	42 85.71%	23.88h
Th>18wRNAi965	47	44	38 86.36%	23.62h

Risultati significativi sono invece stati evidenziati negli studi preliminari sul sonno: dallo studio descritto in questa tesi infatti risulta che moscerini giovani nei quali α -sinucleina WT è espressa nei neuroni dopaminergici tramite il driver *Th-Gal4*, presentino un aumento del sonno totale durante il periodo diurno, e, pur non presentando differenze nel quantitativo di sonno totale nel periodo notturno, in questa fase presentino episodi di sonno in numero minore ma di durata maggiore (figura 1), in accordo con analisi precedenti (Gajula Baliija et al. 2011). È presumibile che utilizzando mosche in età avanzata si riscontrino ulteriori e più ingenti effetti a carico delle α -sinucleine sul sonno e sulla regolazione dei ritmi circadiani.



I risultati riscontrati sui test di confronto statistico tra α -sinucleine mutanti e controlli mostrano invece dei pattern meno interpretabili; nel caso di α -sinucleina A30P (figura 2) si riscontra un aumento del quantitativo di sonno durante la fase notturna del ciclo ed una maggiore lunghezza degli episodi di sonno notturni, senza però che vi sia un aumento significativo del quantitativo di sonno totale. In mosche sovra-esprimenti la forma di α -sinucleina mutata A53T (figura 3) si riscontra comunque un aumento del quantitativo di sonno durante la fase notturna del ciclo LD 12:12, accompagnato però da un aumento significativo della lunghezza degli episodi di sonno in fase diurna, sempre in assenza di differenze rispetto al quantitativo di sonno totale delle mosche sperimentali confrontate con i controlli.

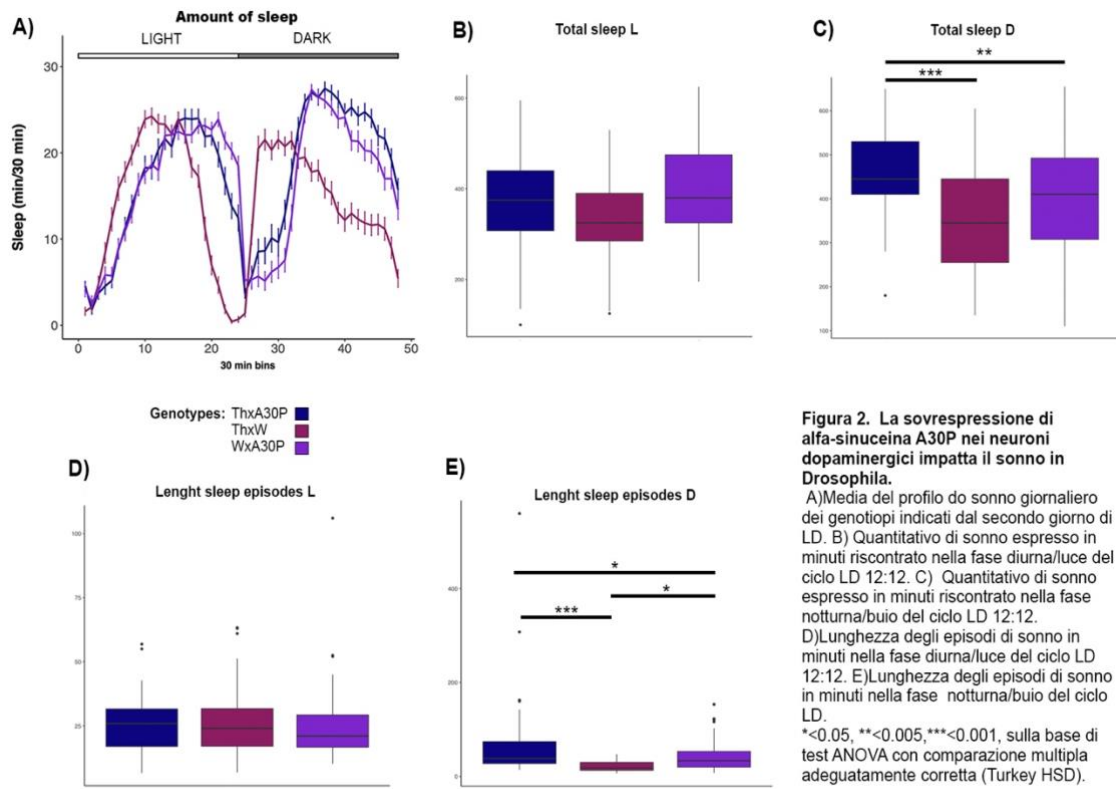


Figura 2. La sovrpressione di alfa-sinuceina A30P nei neuroni dopaminergici impatta il sonno in *Drosophila*.
 A) Media del profilo di sonno giornaliero dei genotipi indicati dal secondo giorno di LD. B) Quantitativo di sonno espresso in minuti riscontrato nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12. C) Quantitativo di sonno espresso in minuti riscontrato nella fase notturna/buio del ciclo LD 12:12. D) Lunghezza degli episodi di sonno in minuti nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12. E) Lunghezza degli episodi di sonno in minuti nella fase notturna/buio del ciclo LD.
 * <0.05 , ** <0.005 , *** <0.001 , sulla base di test ANOVA con comparazione multipla adeguatamente corretta (Turkey HSD).

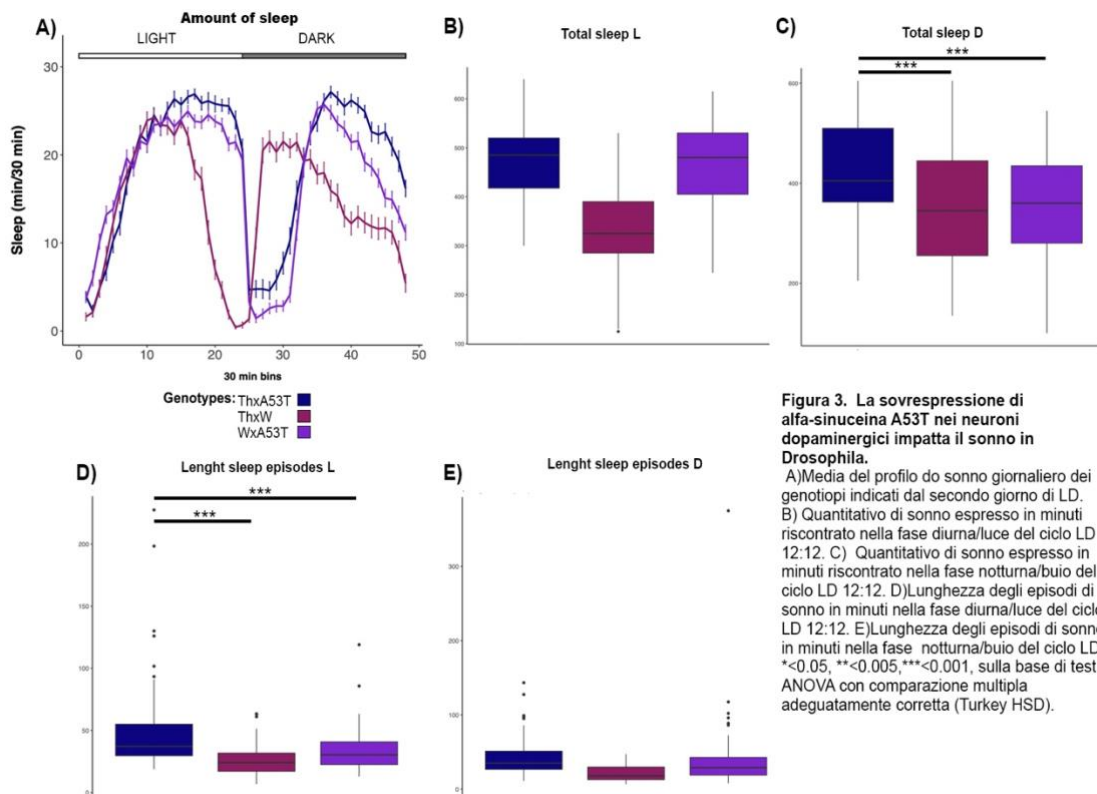


Figura 3. La sovrpressione di alfa-sinuceina A53T nei neuroni dopaminergici impatta il sonno in *Drosophila*.
 A) Media del profilo di sonno giornaliero dei genotipi indicati dal secondo giorno di LD. B) Quantitativo di sonno espresso in minuti riscontrato nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12. C) Quantitativo di sonno espresso in minuti riscontrato nella fase notturna/buio del ciclo LD 12:12. D) Lunghezza degli episodi di sonno in minuti nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12. E) Lunghezza degli episodi di sonno in minuti nella fase notturna/buio del ciclo LD.
 * <0.05 , ** <0.005 , *** <0.001 , sulla base di test ANOVA con comparazione multipla adeguatamente corretta (Turkey HSD).

Questo studio preliminare ha tuttavia rilevato anche dei possibili coinvolgimenti dei TLRs nel sonno di *Drosophila melanogaster*: le mosche che presentano mutazioni Knock Down per il gene *18-Wheeler* (figura 4) mostrano una diminuzione del quantitativo di sonno, in particolar modo nelle fasi notturne e coerentemente con tale risultato le mosche che sovra-esprimono nei neuroni dopaminergici *18-Wheeler* (figura 5) mostrano un pattern sonno meno frammentato, caratterizzato da meno episodi di sonno ma di maggiore durata nelle ore giornaliere.

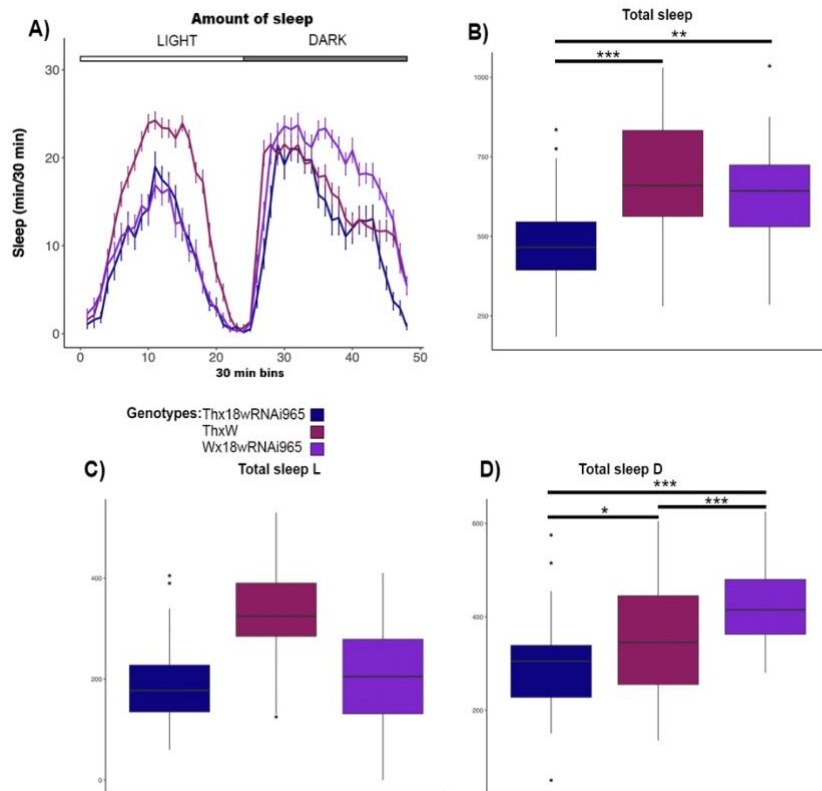


Figura 4. Knock down di TLR 18-Wheeler con RNAi965 nei neuroni dopaminergici impatta il sonno in *Drosophila*.
 A) Media del profilo di sonno giornaliero dei genotipi indicati dal secondo giorno di LD.
 B) Quantitativo di sonno totale espresso in minuti nella fase light/dark del ciclo LD 12:12.
 C) Quantitativo di sonno espresso in minuti riscontrato nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12.
 D) Quantitativo di sonno espresso in minuti riscontrato nella fase notturna/buio del ciclo LD 12:12.
 * <0.05 , ** <0.005 , *** <0.001 , sulla base di test ANOVA con comparazione multipla adeguatamente corretta (Turkey HSD).

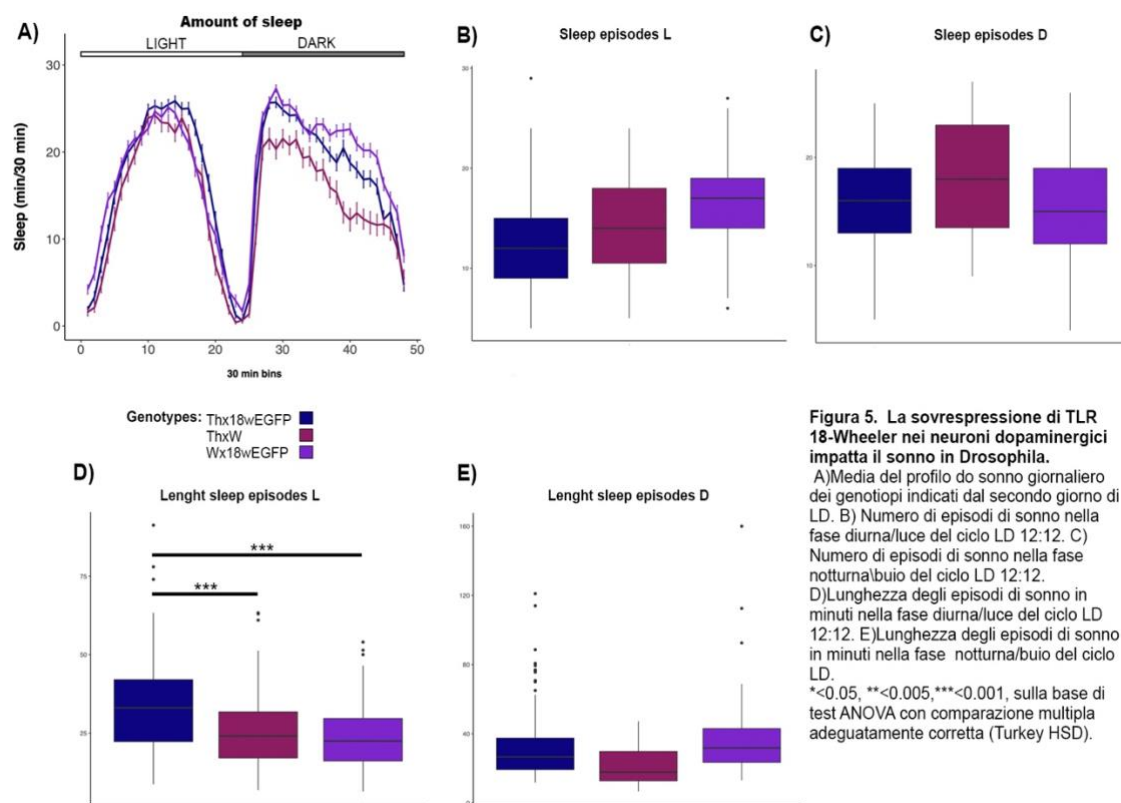


Figura 5. La sovrappresione di TLR 18-Wheeler nei neuroni dopaminergici impatta il sonno in Drosophila.
 A) Media del profilo do sonno giornaliero dei genotipi indicati dal secondo giorno di LD. B) Numero di episodi di sonno nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12. C) Numero di episodi di sonno nella fase notturna/buio del ciclo LD 12:12. D) Lunghezza degli episodi di sonno in minuti nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12. E) Lunghezza degli episodi di sonno in minuti nella fase notturna/buio del ciclo LD.
 *<0.05, **<0.005, ***<0.001, sulla base di test ANOVA con comparazione multipla adeguatamente corretta (Turkey HSD).

Inaspettatamente le mosche che nelle quali il knock down del gene per il TRL *18 Wheeler* è avvenuto per mezzo della mutazione RNAi 44387 (figura 6) dimostrano un aumento significativo nel quantitativo totale di sonno diurno, con meno episodi di sonno e di durata superiore durante le ore di luce. Presentano quindi anch'esse un pattern di sonno meno frammentato.

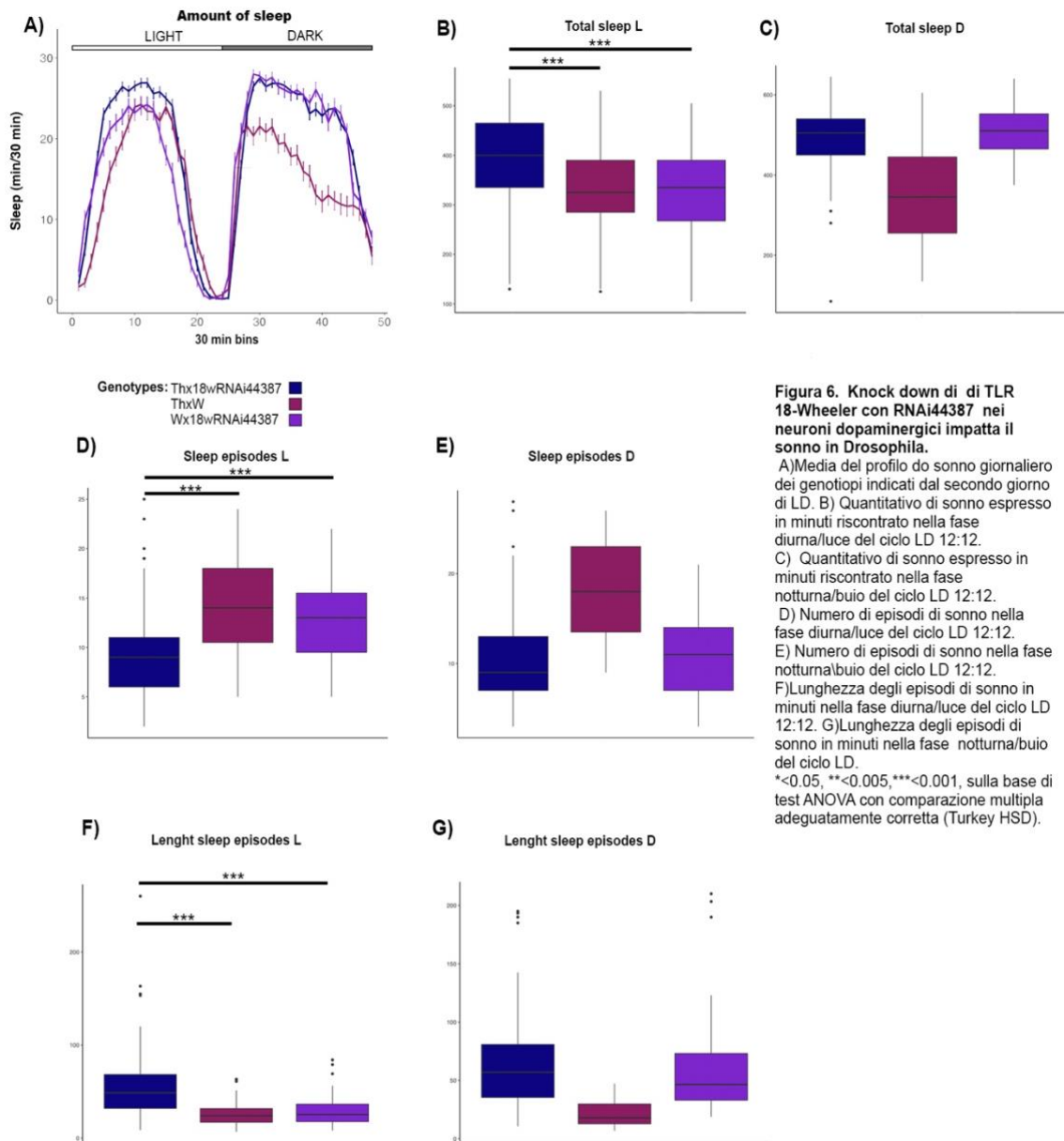


Figura 6. Knock down di di TLR 18-Wheeler con RNAi44387 nei neuroni dopaminergici impatta il sonno in Drosophila.

A) Media del profilo do sonno giornaliero dei genotipi indicati dal secondo giorno di LD.

B) Quantitativo di sonno espresso in minuti riscontrato nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12.

C) Quantitativo di sonno espresso in minuti riscontrato nella fase notturna/buio del ciclo LD 12:12.

D) Numero di episodi di sonno nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12.

E) Numero di episodi di sonno nella fase notturna/buio del ciclo LD 12:12.

F) Lunghezza degli episodi di sonno in minuti nella fase diurna/luce del ciclo LD 12:12.

G) Lunghezza degli episodi di sonno in minuti nella fase notturna/buio del ciclo LD.

*<0.05, **<0.005, ***<0.001, sulla base di test ANOVA con comparazione multipla adeguatamente corretta (Turkey HSD).

CONCLUSIONI

In accordo con quanto riscontrato in studi precedenti, è possibile quindi desumere un impatto negativo della sovra-espressione di α -sinucleina sulla qualità e quantità del sonno. Tali evidenze sono risultate valide anche rispetto all' organismo modello *Drosophila melanogaster*.

Vi sono inoltre segnali di un possibile effetto di rescue perpetrato da *18-wheeler*, almeno per quanto riguarda il contrasto degli effetti patogeni che la sovra-espressione di α -sinucleina, sia wild type, sia nelle forme mutate A30P e A53T ha sul sonno.

La sovra-espressione del Toll *18-wheeler* sembra infatti produrre come risultato un effetto di protezione del sonno, che a livello sperimentale è stato riscontrato essere almeno in *Drosophila*, meno frammentato.

Ulteriori analisi saranno necessarie per confermare tali risultati mediante l'impiego di organismi modello in età più avanzata; si ritiene infatti che essendo il Morbo di Parkinson dovuto ad un accumulo di oligomeri e neurofibrille di α -sinucleina, organismi modello giovani non abbiano ancora raggiunto il carico di proteine amiloidi necessario a danneggiare significativamente il funzionamento dei neuroni.

Nuovi esperimenti con mosche più anziane saranno necessari anche per valutare gli effetti attesi ma non riscontrati che la sovra-espressione di α -sinucleina dovrebbe avere su attività e periodicità delle mosche, nonché per testare aspetti specifici suggeriti da questo studio ma non sperimentalmente approfonditi quali la maggiore mortalità e la deregolazione del ritmo circadiano in mosche nelle quali sono state espresse le forme mutanti di α -sinucleina.

Nonostante questo studio sia qui descritto solo nella sua fase preliminare, e come più volte indicato necessiti di ulteriori ricerche e approfondimenti, si delinea comunque una possibile traccia da seguire in ottica terapeutica: è ragionevole infatti considerare che la capacità di riduzione dei sintomi non motori delle sinucleinopatie dimostrata dai Toll-Like Receptors in questi esperimenti e in studi precedenti possa essere un domani sfruttata per attenuare la sintomatologia del Morbo di Parkinson e delle altre sinucleinopatie, andando ad integrare il trattamento esistente per questo tipo di patologie molto diffuse e molto impattanti sulla qualità della vita, che ad oggi possono essere trattate pressoché solo tramite farmaci volti ad alleviare unicamente i sintomi motori.

APPENDICE

Incroci

Per poter ottenere delle linee transgeniche che esprimano un costrutto in modo tessuto-specifico è necessario operare degli incroci tra le linee transgeniche portatrici del costrutto e le linee driver.

Dovendo quindi avvenire un accoppiamento tra mosche dei due sessi opposti portatrici del rispettivo transgene, è necessario prima di tutto isolare le femmine vergini di una delle linee implicate nel sistema binario dai tubi ricevuti dai due differenti stock centers. Le femmine di *Drosophila melanogaster* si distinguono dai maschi perché hanno dimensioni leggermente maggiori, con addome meno arrotondato e più chiaro. È possibile tramite l'utilizzo di microscopio bifocale distinguere anche la morfologia dei due diversi organi riproduttivi, oltre alla presenza, nei maschi, di dei pettini sulle zampe anteriori che permettono al moscerino di sesso maschile di ancorarsi alla femmina durante l'accoppiamento.

Data la possibilità delle femmine di questa specie di raccogliere lo sperma di più partner è necessario formare gli incroci con femmine vergini, che non si siano cioè ancora accoppiate.



Trascorrono circa otto ore dal momento della nascita prima che le giovani Drosophile diventino sessualmente attive, e questo intervallo di tempo consente di determinare con certezza la verginità della mosca. Le mosche subito dopo la nascita presentano delle caratteristiche peculiari, che diminuiscono progressivamente nel trascorrere delle successive otto ore. Le Drosophile neonate sono significativamente più grandi, e di colore più chiaro rispetto alle adulte, e nei primi minuti dopo la nascita le ali risultano ancora accartocciate. È inoltre evidente, nella parte ventrale dell'addome il meconio, una piccola chiazza scura che rappresenta l'ultimo pasto della mosca in stadio pupale. È necessario, per poter compiere gli incroci, isolare mosche di sesso femminile che

presentino queste caratteristiche per poterle poi incrociare con i maschi portatori dell'altro costrutto considerato.



Per poter svolgere le analisi preliminari sul sonno, l'attività e la periodicità delle mosche modello per sinucleinopatie e Toll *18-wheeler*, sono state incrociate mosche sovra-esprimenti 5 geni codificanti α -sinucleine (A30P, A53T, E46k, WT, WT con codoni ottimizzati per insetti), mosche sovra-esprimenti *Toll-2*, anche conosciuto come *18 wheeler* e mosche di due diverse linee con *18 wheeler* silenziato con mosche il cui genoma conteneva il transgene *Th-GAL4*, che mediante il sistema binario UAS-GAL4 precedentemente descritto permette l'espressione tessuto-specifica dei costrutti sopracitati nei neuroni dopaminergici della progenie derivante da questi incroci. I controlli parentali per questi esperimenti derivano dall'incrocio delle linee portatrici dei costrutti con mosche wild type, mentre il controllo per il driver è la progenie dell'incrocio tra mosche *Th-GAL4* e wild type. Si è in seguito deciso di proseguire con questa ricerca mantenendo solo 3 delle 5 linee sovra-esprimenti alfa-sinucleina (A30P, A53T e WT). Per massimizzare la progenie sono stati incrociati reciprocamente maschi e femmine di entrambe le linee coinvolte nell'incrocio.

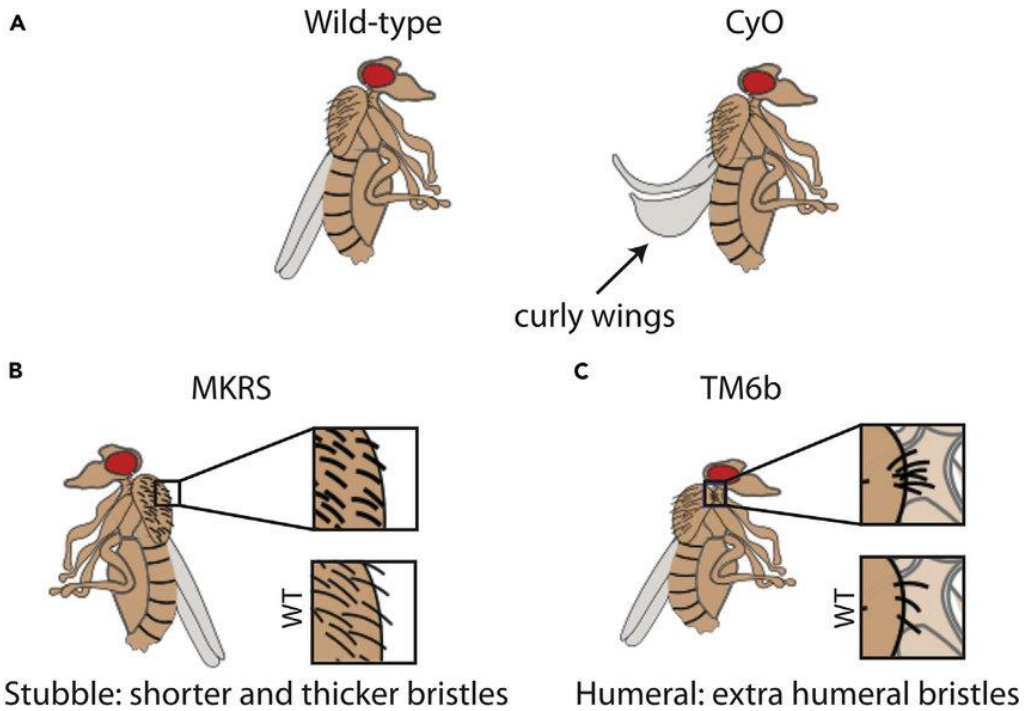
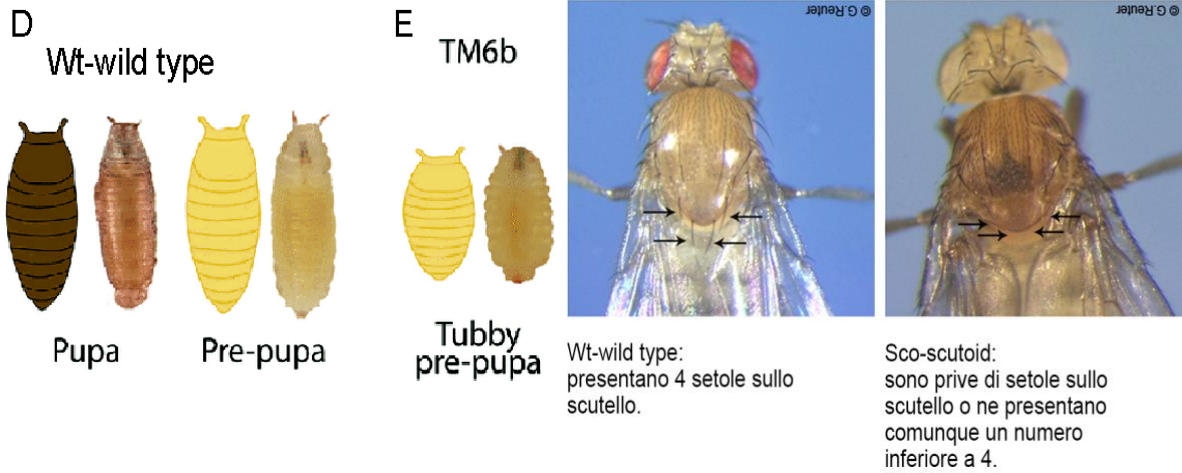
Descrizione linee bilanciatore

Linee bilanciatore

- doppio bilanciatore per i cromosomi 2° e 3°; sul 2° cromosoma le mosche sono eterozigoti per *Cyo* e *Sco*, mentre il 3° cromosoma è in eterozigosi per i geni *MKRS* e *TM6b* (già in utilizzo nel dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova).

Questi bilanciatori, oltre ad evitare la ricombinazione tramite crossing-over dei geni di interesse per la corrente ricerca, presentano anche fenotipi facilmente riconoscibili, che nel bilanciamento delle linee descritto in seguito sono stati utilizzati per selezionare mosche che avessero le caratteristiche genotipiche adeguate allo scopo; il gene *Cyo* si esprime infatti in mosche dalle ali arricciate, mentre il gene *Sco* causa un fenotipo di

mosche con scutello (placca dorsale tra rostro e addome dell'insetto) privo di setole, o con setole in numero inferiore a 4. Il gene *MKRS* è responsabile di una mutazione delle setole di *Drosophila*, le quali si presentano più spesse e tozze, mentre il gene *TM6b* implica la nascita di mosche con mutazione "humeral" che prevede setole sovrannumerarie ai bordi del rostro, in prossimità della testa, e un fenotipo distinguibile nella fase pupale delle mosche, che presentano pupe più corte e tozze, dette "tubby".



Bilanciamento linee

Per prima cosa sono state create delle linee, da poter mantenere stabili che presentassero uno solo dei costrutti in omozigosi su un cromosoma e un doppio bilanciatore nell'altro per evitare crossing over indesiderati.

Successivamente queste linee verranno incrociate, e verrà selezionata la progenie con il fenotipo corrispondente alla presenza di entrambi i costrutti considerati in omozigosi.

Le linee omozigoti bilanciate sono derivate dal susseguirsi di tre incroci, differenti per mosche con mutagene per α -sinucleina e mosche con mutagene per Toll-like receptors. Come indicato precedentemente, al fine di standardizzare la procedura tramite la quale si sono potute ricavare le linee bilanciate, è stato scelto di utilizzare solo linee con mutagenesi sul 2° cromosoma per Toll-like receptors, e sul 3° cromosoma per quanto riguarda le α -sinucleine.

Drosophila melanogaster è infatti un ottimo organismo modello non solo per la rapidità dei cicli di riproduzione e la numerosità della progenie, ma anche perché ha solo 4 coppie di cromosomi: i cromosomi sessuali X\Y (1°) e tre autosomi classificati come 2°, 3° e 4°; questo rende molto più facile la manipolazione genetica di questi organismi. Per quanto riguarda le α -sinucleine, sono state utilizzate le linee sovra-esprimenti α -sinucleina wild-type (#BL8146), α -sinucleina A30P (#BL8147) e α -sinucleina A537 (#BL8148).

Il primo incrocio prevedeva l'accoppiamento di mosche con secondo cromosoma omozigote WT e terzo cromosoma omozigote per α -sinucleina, con mosche in cui il secondo e il terzo cromosoma esprimessero due coppie di bilanciatori in eterozigosi; queste linee sono di proprietà della facility del laboratorio di Cronobiologia del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova, e presentano sul secondo cromosoma i geni per i fenotipi *Cyo/Sco*, e sul terzo cromosoma i geni *MKRS* e *TM6b*. Dalla progenie di questo primo incrocio, sono state selezionate alternativamente mosche con *TM6b* e il costrutto per α -sinucleina in eterozigosi sul terzo cromosoma, e con *Cyo* o *Sco* in eterozigosi con la forma WT sul secondo cromosoma.

A loro volta queste linee con alternativamente *Cyo* o *Sco* al secondo cromosoma e il costrutto per α -sinucleina e il gene *TM6b* sul terzo, sono stati incrociati tra loro per ottenere la linea bilanciata.

A seguito della rimozione delle pupae *tubby*, marker fenotipico del gene *TM6b* (insieme al fenotipo *Humeral* descritto precedentemente), la prole di questo incrocio è stata nuovamente selezionata, ottenendo così una linea stabile con bilanciatore *Cyo\Sco* sul secondo cromosoma e uno dei costrutti per α -sinucleina indagati in omozigosi sul terzo. Il procedimento è analogo per i Toll-like Receptors: sono state utilizzate mosche che esprimessero i costrutti, *18 Wheeler* sovra-espresso (#BL92996) e due forme simili di *18 Wheeler* RNAi (VRDC #965 e #44387) in omozigosi sul secondo cromosoma, con il terzo cromosoma in omozigosi WT, incrociate con la medesima linea a doppio bilanciatore *Cyo\Sco*; *MKRS\TM6b*.

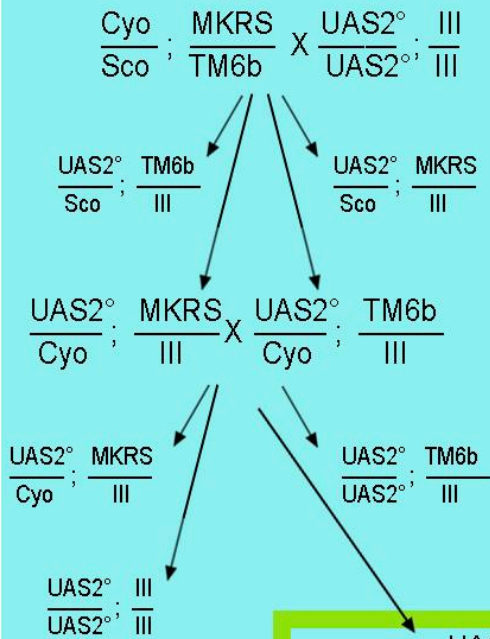
A seguito di questo primo incrocio, in questo caso è stata selezionata la prole che presentasse il costrutto in eterozigosi con il carattere fenotipico *Cyo* sul secondo cromosoma, e alternativamente il bilanciatore *MKRS* o *TM6b* in eterozigosi con WT sul terzo cromosoma.

Queste due linee alternative, una con *MKRS*, l'altra con *TM6b* sono state successivamente incrociate tra di loro, e sono state rimosse le pupe che non esprimevano il carattere *tubby*.

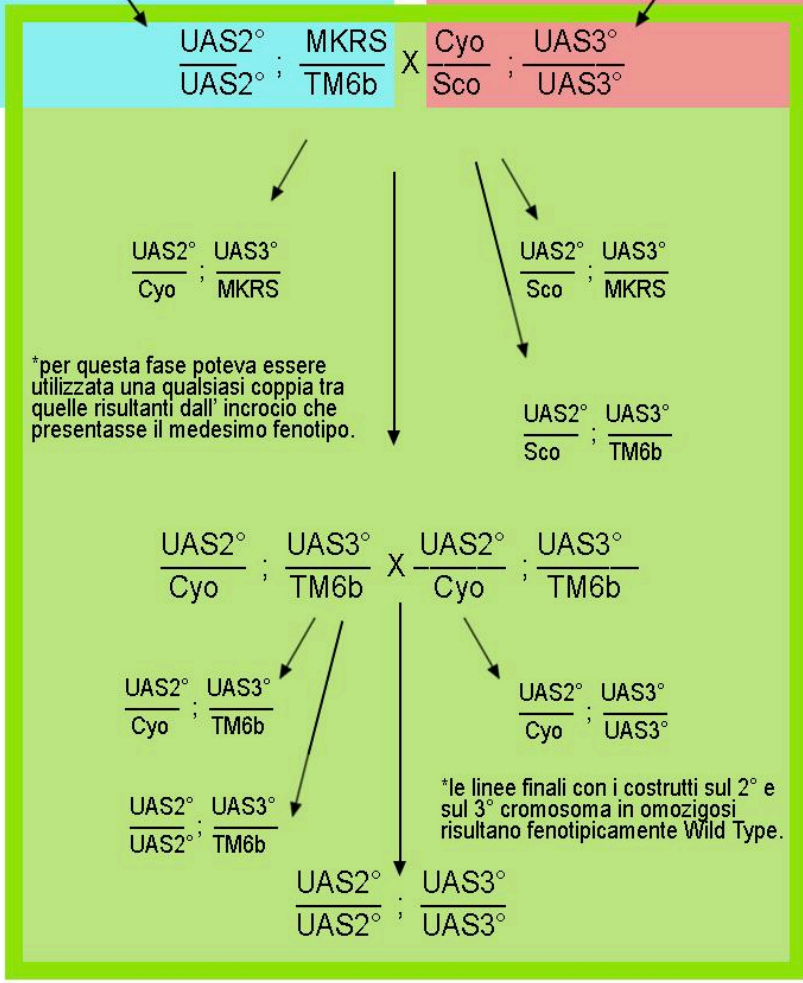
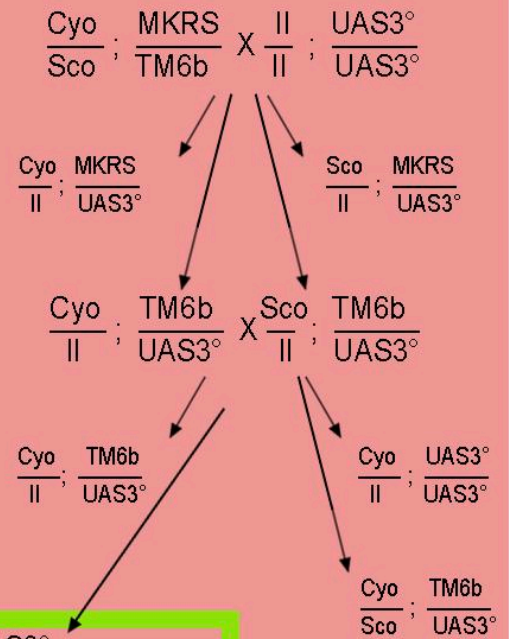
Una volta rimosse le pupe WT sono stati selezionati maschi e vergini che presentassero il costrutto sul secondo cromosoma in omozigosi, e la compresenza dei due bilanciatori sul terzo.

In seguito le linee bilanciate per i due costrutti verranno incrociate tra loro, e verranno prelevate dalla prole e incrociate nuovamente mosche maschio e femmina aventi lo stesso fenotipo, ovvero il costrutto per Toll-Like receptor in eterozigosi con *Cyo* sul secondo cromosoma e il costrutto per α -sinucleina sul terzo cromosoma in eterozigosi con *TM6b*; queste mosche si presenteranno con setole lunghe, ali ricce, fenotipo *Humeral* e scutello con tutte e 4 le setole (è possibile anche selezionare e incrociare maschi e femmine di mosche che presentino *MKRS* come bilanciatore per il 3° cromosoma e *Sco* per il 2°, ovvero mosche a setola corta, con scutello privo di setole e prive del carattere *Humeral*). Da quest'incrocio verranno ulteriormente selezionate e incrociate le mosche che non presentano alcun fenotipo collegato ad un bilanciatore, le quali saranno portatrici di entrambi i costrutti in omozigosi.

COSTRUTTO SUL 2° CROMOSOMA



COSTRUTTO SUL 3° CROMOSOMA



Cyo: fenotipo ali ricce
 Sco: fenotipo scutello senza setole
 MKRS: fenotipo con setole corte e tozze
 TM6b: fenotipo humeral e con pupa corta

UAS2°: costruito localizzato sul secondo cromosoma
 UAS3°: costruito localizzato sul terzo cromosoma
 II: secondo cromosoma Wild type
 III: terzo cromosoma Wild type

PCR

Per verificare l'effettiva presenza dei geni target nelle linee bilanciate per α -sinucleine e Toll Like Receptors, nonché per verificare la presenza dei costrutti nelle linee parentali utilizzate per creare i diversi incroci, sono state svolte delle PCR, ovvero Polymerase Chain Reaction (Reazione a catena della DNA polimerasi).

Si tratta in breve di una tecnica di biologia molecolare che permette la replicazione di un tratto di DNA, a patto di conoscerne le sequenze nucleotidiche iniziali e finali.

È possibile selezionare il tratto di DNA da amplificare in modo molto preciso, partendo da una soluzione di DNA in cui sia presente il DNA target, anche se in quantità minime, potendo così amplificare e rilevare il DNA target da campioni biologici che ne contengano anche solo tracce.

La reazione su cui si basa la PCR è catalizzata dall'enzima DNA polimerasi: questa tecnica infatti ricostruisce in-vitro il passaggio della duplicazione cellulare che prevede la sintesi di un segmento di DNA completo, cioè a doppia elica, partendo da un filamento a singola elica.

Per mezzo di tale reazione è possibile generare molteplici frammenti di DNA target partendo da un singolo filamento che funge da stampo.

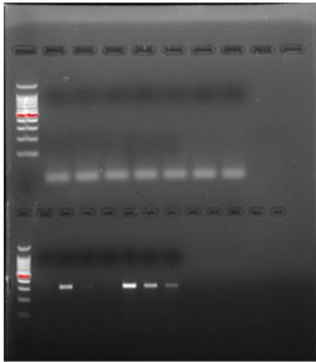
Riporto a seguito il protocollo utilizzato per l'applicazione pratica di questa tecnica, fornito dal Vienna Drosophila Research Center (VRDC):

Verifica dei transgeni (GD library)

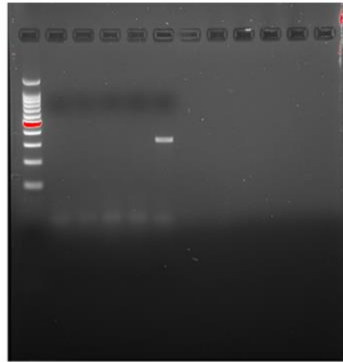
Per la verifica del transgene estrarre il DNA genomico da due mosche per linea.

- mettere le mosche in una piastra tubo/96 pozzetti
- schiacciare con una pipetta con punte gialle contenente 50 μ l di tampone di schiacciamento (10 mM Tris, 1mM EDTA, 25 mM NaCl and 200 μ g/ml fresh Proteinase K)
- incubare a 37°C per 30min, poi a 95°C per 3min (per distruggere la proteinasi)
- centrifugare per 5min a 4000 giri/min
- spostare il surnatante in una nuova piastra tubo/96 pozzetti
- Reazioni PCR allestite con un primer specifico (il primer sinistro utilizzato per la clonazione) e un primer comune (hsp7_2: GAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGAC, SV2: CACAGAAGTAAGGTTTCCTTCACAAAGATCC)
- 34 cicli di 94°C per 30 sec, 59° per 30 sec e 72° per 1 min 30 sec
- 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP (ciascuno), 0,5 μ M ogni primer, 0,25 μ l Taq e 1 μ l DNA genomico in un volume di reazione totale di 50 μ l
- 10 μ l del carico della reazione PCR su un gel di agarosio al 2%
- controllo: lunghezza del prodotto = lunghezza della sequenza + 200 bp

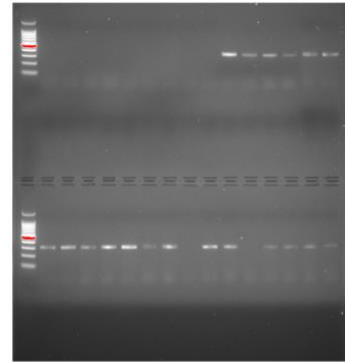
Tutte le linee parentali e le linee bilanciate sono state testate, ed è risultato che in ognuna di esse il costrutto target è presente. Sarà quindi possibile procedere alla creazione di linee che presentino i costrutti per α -sinucleina e Toll-Like Receptors in doppia omozigosi, tramite incroci tra le linee bilanciate.



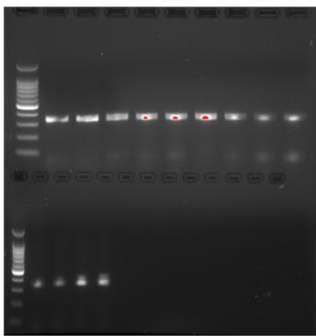
Parentale 18wRNAi 965 e linee bilanciate per alfa-sinucleina



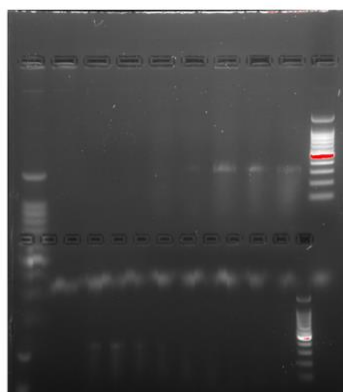
Alfa-sinucleina su linee bilanciate



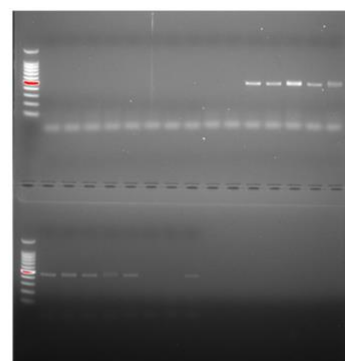
conferma della presenza di alfa-sinucleina nelle linee parentali alfa-synHWT(8146), A53T(8147), e A30P(8148)



18 wheeler sovraespresso (92996) + controlli



Ripetizione-conferma della presenza di alfa-sinucleina nelle linee parentali alfa-synHWT(8146), A53T(8147), e A30P(8148)



18w RNAi per le linee 965 e 44387 bilanciate

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Abele, S.H. et al. (2019). Time is on the Immune System's Side, Yes it is. *J Biol Med.* 2019 Jun 27;92(2):225-231.
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., et al. (2000). Mice lacking a-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25: 239–252. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80886-7.
- Arjona, A. et al. (2012). Immunity's fourth dimension: approaching the circadian-immune connection. *Trends Immunol.* 2012 Dec;33(12):607-12. doi:10.1016/j.it.2012.08.007.
- Ballard, S.L., Miller, D.L., Ganetzky, B. (2014). Retrograde neurotrophin signaling through Tollo regulates synaptic growth in *Drosophila*” *J. Cell Biol.* 204, 1157–1172. doi: 10.1083/jcb.201308115.
- Barone, P. et al. (2009). The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2009 Aug 15;24(11):1641-9. doi: 10.1002/mds.22643.
- Bonuccelli, U. et al. (2000). Diurnal motor variations to repeated doses of levodopa in Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.* 2000 Jan-Feb;23(1):28-33. doi: 10.1097/00002826-200001000-00006.
- Cabin, D.E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N.B., Gottschalk, W., McIlwain, K.L., Chen, A., Ellis, C.E., Paylor, R., Lu, B., et al. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking a-synuclein. *J Neurosci* 22: 8797–8807, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-20-08797.2002.
- Chavan, S.S. et al. (2017) Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity.* 2017 Jun 20;46(6):927-942. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.008.
- Chu, Y., Kordower, J.H. (2007). Age-associated increases of a-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiol Dis* 25: 134–149.
- Chung, C.Y., Koprach, J.B., Siddiqi, H., Isacson, O.(2009). Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV a-synucleinopathy. *J Neurosci* 29: 3365–3373. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5427-08.2009.
- Conte, C. (2021). Possible Link between SARS-CoV-2 Infection and Parkinson's Disease: The Role of Toll-Like Receptor 4), *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7135.

- Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Williamson, R.E., Lansbury, P.T. Jr. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both a-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci* 97: 571–576, doi: 10.1073/pnas.97.2.571.
- Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M., Lansbury, P.T. Jr. (2001). Kinetic stabilization of the a-synuclein protofibril by a dopamine-a-synuclein adduct. *Science* 294: 1346– 1349. doi: 10.1126/science.1063522.
- Cusumano, P. et al. (2018). Modulation of miR-210 alters phasing of circadian locomotor activity and impairs projections of PDF clock neurons in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 2018 Jul 16;14(7):e1007500. doi: 10.1371/journal.pgen.1007500.
- Damulewicz, M. et al. (2018). Daily Regulation of Phototransduction, Circadian Clock, DNA Repair, and Immune Gene Expression by Heme Oxygenase in the Retina of *Drosophila*. *Genes (Basel)*. 2018 Dec 21;10(1):6. doi: 10.3390/genes10010006.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., Kostka, M. (2007). Different species of a-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 27: 9220–9232. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2617-07.2007.
- Danzer, K.M., Krebs, S.K., Wolff, M., Birk, G., Hengerer, B. (2009). Seeding induced by a-synuclein oligomers provides evidence for spreading of a-synuclein pathology. *J Neurochem* 111: 192–203. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06324.x.
- Danzer, K.M., Ruf, W.P., Putcha, P., Joyner, D., Hashimoto, T., Glabe, C., Hyman, B.T., McLean, P.J. (2011) Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular a-synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *FASEB J* 25: 326 – 336. doi: 10.1096/fj.10-164624.
- Dzamko, N. et al. (2017). Toll-like receptor 2 is increased in neurons in Parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol.* 2017 Feb;133(2):303-319. doi: 10.1007/s00401-016-1648-8.
- El-Agnaf, O.M., Salem, S.A., Paleologou, K.E., Cooper, L.J., Full- wood, N.J., Gibson, M.J., Curran, M.D., Court, J.A., Mann, D.M., Ikeda, S. et al. (2003). a-Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma". *FASEB J* 17: 1945–1947. doi: 10.1096/fj.03-0098fje.
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L., Vekrellis, K. (2010b). Cell-produced a-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* 30: 6838–6851 doi: 10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010.

- Fan, X.L. et al. (2021). Regulatory Effects of Clock and Bmal1 on Circadian Rhythmic TLR Expression. *Int Rev Immunol.* 2021 Sep 20:1-12. doi: <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1931170>
- Feany, M.B. et al. (2000). A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature.* 2000 Mar 23;404(6776):394-8. doi: 10.1038/35006074.
- Foldi, I., Anthoney, N., Harrison, N., Gangloff, M., Verstak, B., Nallasivan, M.P., et al. (2017). Three-tier regulation of cell number plasticity by neurotrophins and Tolls in Drosophila. *J. Cell Biol.* 216, 1421–1438. doi: 10.1083/jcb.201607098.
- Fortin, D.L., Nemani, V.M., Voglmaier, S.M., Anthony, M.D., Ryan, T.A., Edwards R.H. (2005) Neural activity controls the syn-aptic accumulation of α -synuclein. *J Neurosci* 25: 10913 – 10921. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2922-05.2005.
- Fredenburg, R.A., Rospigliosi, C., Meray, R.K., Kessler, J.C., Lashuel, H.A., Eliezer, D., Lansbury, P.T. Jr. (2007) The impact of the E46K mutation on the properties of α -synuclein in its monomeric and oligomeric states. *Biochemistry* 46: 7107–7118. doi: 10.1021/bi7000246.
- Frederiksen, H.R. et al. (2019). Cell Type Specific Expression of Toll-Like Receptors in Human Brains and Implications in Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int.* 2019 Jul 18;2019:7420189. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/7420189>.
- Fuchs, J., Nilsson, C., Kachergus, J., Munz, M., Larsson, E.M., Schule, B., Langston, J.W., Middleton, F.A., Ross, O.A., Hulihan, M. et al. (2007). Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology* 68: 916–922. doi: 10.1212/01.wnl.0000254458.17630.c5.
- Gajula Balija, M.B. et al. (2011). Pre-Fibrillar α -Synuclein Mutants Cause Parkinson's Disease-Like Non-Motor Symptoms in Drosophila. *PLoS One.* 2011;6(9):e24701. doi: 10.1371/journal.pone.0024701
- George, J.M., Jin, H., Woods, W.S., Clayton, D.F. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15: 361 – 372 doi: 10.1016/0896-6273(95)90040-3.
- Gründemann, J., Schlaudraff, F., Haeckel, O., Liss, B. (2008) Elevated α -synuclein mRNA levels in individual UV laser microdissected dopaminergic substantia nigra neurons in idiopathic Parkinson's disease. *Nucleic Acids Res* 36: e38.
- Hansen, C., Angot, E., Bergström, A.L., Steiner, J.A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T.F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., et al. (2011). α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest* 121: 715–725. doi: 10.1172/JCI43366.
- Hergenhan, S. et al. (2020). Molecular Interactions Between Components of the Circadian Clock and the Immune System. *J Mol Biol.* 2020 May 29;432(12):3700-3713 doi: 10.1016/j.jmb.2019.12.04

- Hettiarachchi, N.T., Parker, A., Dallas, M.L., Pennington, K., Hung, C.C., Pearson, H.A., Boyle, J.P., Robinson, P., Peers, C. (2009). α -Synuclein modulation of Ca²⁺ signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *J Neurochem* 111: 1192–1201. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06411.x.
- Hirsch, E.C. et al. (2021). Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2021 Jan;36(1):16-24 doi: 10.1002/mds.28075.
- Jellinger, K.A. (2019). Is Braak staging valid for all types of Parkinson's disease? *J Neural Transm (Vienna)*. 2019 Apr;126(4):423-431 doi: 10.1007/s00702-018-1898-9. Epub 2018 Jun 25.
- Kawai, T., Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 2011, 34, 637–650.
- Kholodilov, N.G., Neystat, M., Oo, T.F., Lo, S.E., Larsen, K.E., Sulzer, D., Burke, R.E. (1999). Increased expression of rat synuclein in the substantia nigra pars compacta identified by mRNA differential display in a model of developmental target injury. *J Neurochem* 73: 2586–2599 doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0732586.x.
- Klegeris, A., Pelech, S., Giasson, B.I., Maguire, J., Zhang, H., McGeer, E.G., McGeer, P.L. (2008). α -Synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiol Aging* 29: 739–752, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.013.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet Science*. 2003 Oct 31. doi: 10.1038/ng0298-106.
- Kumar, V. (2019). Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation) *J Neuroimmunol*. Jul 15;332:16-30. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.03.012.
- Labrecque, N. et al. (2015). “Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms*. 2015 Aug;30(4):277-90. doi: 10.1177/0748730415577723.
- Larsen, K.E., Schmitz, Y., Troyer, M., Mosharov, E., Dietrich, P., Savalle, M., Quazi, A.Z., Chaudhry, F.A., Edwards, R., Stefanis, L. et al. (2006). α -Synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J Neurosci* 26: 11915 – 11922. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3821-06.2006.
- Lee, H.J., Patel, S., Lee, S.J. (2005). Intravesicular localization and exocytosis of α -synuclein and its aggregates) *J Neurosci* 25: 6016–6024. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0692-05.2005.
- Lee, H.J., Suk, J.E., Patrick, C., Bae, E.J., Cho, J.H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E., Lee, S.J., (2010). Direct transfer of α -synuclein from neuron to astroglia causes

- inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem* 285: 9262–9272. doi: 10.1074/jbc.M109.081125.
- Leonidas, S. (2012). α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspect Med*. doi: 10.1101/cshperspect.a009399
 - Li, G., Hidalgo, A. (2020). Adult Neurogenesis in the Drosophila Brain: the Evidence and the Void. *Int. J. Mol. Sci.* 21:6653. doi: 10.3390/ijms21186653.
 - Li, G., Forero, M.G., Wentzell, J.S., Durmus, I., Wolf, R., Anthony, N.C. et al. (2020). A Toll-receptor map underlies structural brain plasticity. *Elife* 9:e52743.
 - Li, G., Hidalgo, A. (2021). The Toll Route to Structural Brain Plasticity. *05 July 2021*. doi: 10.3389/fphys.2021.679766.
 - Lind, N.A., Rael, V.E., Pestal, K., Liu, B., Barton, G.M. (2022). Regulation of the Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 2022, 22, 224–235.
 - Lu, B., Nagappan, G., Guan, X., Nathan, P.J., Wren, P. (2013). BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 401–416. doi: 10.1038/nrn3505.
 - Lu, B., Pang, P.T., Woo, N.H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 603–614. doi: 10.1038/nrn1726.
 - May, M.J. et al. (1998). Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today*. 1998 Feb;19(2):80-8. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01197-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01197-3).
 - *Mazzotta, G.M., Ceccato, N., Conte, C. (2023). Synucleinopathies Take Their Toll: Are TLRs a Way to Go? *Cells* 2023, 12, 1231. <https://doi.org/10.3390/cells12091231>
 - Mazzulli, J.R., Mishizen, A.J., Giasson, B.I., Lynch, D.R., Thomas, S.A., Nakashima, A., Nagatsu, T., Ota, A., Ischiropoulos, H. (2006). Cytosolic catechols inhibit α -synuclein aggregation and facilitate the formation of intracellular soluble oligomeric intermediates. *J Neurosci* 26: 10068–10078. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0896-06.2006.
 - McDonald, M.J. et al. (2001). Microarray analysis and organization of circadian gene expression in Drosophila. *Cell*. 2001 Nov 30;107(5):567-78. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00545-1.
 - McIlroy, G., Foldi, I., Aurikko, J., Wentzell, J.S., Lim, M.A., Fenton, J.C. et al. (2013). Toll-6 and Toll-7 function as neurotrophin receptors in the Drosophila melanogaster CNS. *Nat. Neurosci.* 16, 1248–1256. doi: 10.1038/nn.3474.
 - McLaughlin, C.N., Nechipurenko, I.V., Liu, N., Broihier, H.T.A. (2016). Toll receptor-FoxO pathway represses Pavarotti/MKLP1 to promote microtubule dynamics in motoneurons. *J. Cell Biol.* 214, 459–474. doi: 10.1083/jcb. 201601014.

- Mhyre et al. (2012). Parkinson's disease. *Subcell Biochem.* 2012;65:389-455. doi: 10.1007/978-94-007-5416-4_16.
- Mosharov, E.V., Larsen, K.E., Kanter, E., Phillips, K.A., Wilson, K., Schmitz, Y., Krantz, D.E., Kobayashi, K., Edwards, R.H., Sulzer, D. (2009). Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and a-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron* 62: 218–229. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.033.
- Mosharov, E.V., Staal, R.G., Bove, J., Prou, D., Hananiya, A., Markov, D., Poulsen, N., Larsen, K.E., Moore, C.M., Troyer, M.D. et al. (2006). a-Synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *J Neurosci* 26: 9304–9311. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0519-06.2006
- Murphy, D.D., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and a-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 3214– 3220. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-09-03214.2000.
- Nemani, V.M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M.K., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A., Edwards, R.H. (2010). Increased expression of a-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron* 65: 66–79. doi: 10.1016/j.neuron.2009.12.023.
- Nonaka, T., Watanabe, S.T., Iwatsubo, T., Hasegawa, M. (2010). Seeded aggregation and toxicity of a-synuclein and tau: Cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 285: 34885–34898. doi: 10.1074/jbc.M110.148460.
- Okun, E., Griffioen, K.J., Mattson, M.P. (2011). Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 34, 269–281. doi: 10.1016/j.tins.2011.02.005.
- Park, H., Poo, M.M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23. doi: 10.1038/nrn 3379.
- Piccinini, A.M. et al. (2010). DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:672395. doi: 10.1155/2010/672395.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R. et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, doi: 10.1126/science.276.5321.2045.
- Raggi, A. et al. (2013). Sleep disorders in Parkinson's disease: a narrative review of the literature. *Rev Neurosci.* 2013;24(3):279-91. doi: 10.1515/revneuro-2013-0002.
- Ramesh, G. et al. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:480739. doi: 10.1155/2013/480739.

- Ransohoff, R.M. et al. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jul;3(7):569-81 doi: 10.1038/nri1130.
- Rideout, H.J., Dietrich, P., Savalle, M., Dauer, W.T., Stefanis, L. (2003). Regulation of a-synuclein by bFGF in cultured ventral midbrain dopaminergic neurons. *J Neurochem* 84: 803 – 813, doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01574.x.
- Riederer, P. et al. (2019). α -Synuclein in Parkinson's disease: causal or bystander?. *J Neural Transm (Vienna).* 2019 Jul;126(7):815-840. doi: 10.1007/s00702-019-02025-9.
- Ros-Bernal, F. et al. (2011). Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci.* 108(16):6632–7. doi: 10.1073/pnas.1017820108.
- Scott, D.A., Tabarean, I., Tang, Y., Cartier, A., Masliah, E., Roy, S. (2010). A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in a-synuclein-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 30: 8083–8095. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1091-10.2010
- Shin, W.H., et al. (2015). Induction of microglial toll-like receptor 4 by prothrombin kringle-2: a potential pathogenic mechanism in Parkinson's disease. *Sci Rep.* 2015 Oct 6;5:14764. doi: 10.1038/srep14764, doi: 10.1038/srep14764.
- Shmueli, A., Shalit, T., Okun, E., Shohat-Ophir, G. (2018). The Toll Pathway in the Central Nervous System of Flies and Mammals. *1 October 2018 NeuroMolecular Medicine (2018)* 20:419–436. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8515-9>
- Sian-Hulsmann, J. et al. (2021) The Nigral Coup in Parkinson’s Disease by α -Synuclein and Its Associated Rebels. *Cells.* 2021 Mar 9;10(3):598. <https://doi.org/10.3390/cells10030598>.
- Silver, A.C. et al. (2012). The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity.* 2012 Feb 24;36(2):251-61. doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.017.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nuss-baum, R. et al. (2003). a-Synuclein locus triplication causes Parkinson’s disease, *Science* 302: 841. doi: 10.1126/science.1090278
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goe-dert, M. (1998) a-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson’s disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci* 95: 6469–6473. doi: 10.1073/pnas.95.11.6469.
- Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012 Feb;2(2):a009399. doi: 10.1101/cshperspect.a009399.

- Stone, E.F. et al. (2012). The Circadian Clock Protein Timeless Regulates Phagocytosis of Bacteria in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 2012 Jan;8(1):e1002445. doi : <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002445>
- Struck, L.K. et al. (1990). Circadian fluctuations of contrast sensitivity in Parkinson's disease. *Neurology.* 1990 Mar;40(3 Pt 1):467-70. doi: https://doi.org/10.1212/WNL.40.3_Part_1.467.
- Tong, J., Wong, H., Guttman, M., Ang, L.C., Forno, L.S., Shimadzu, M., Rajput, A.H., Muentner, M.D., Kish, S.J., Hornykiewicz, O. et al. (2010) Brain a-synuclein accumulation in multiple system atrophy, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: A comparative investigation. *Brain* 133 (Pt 1): 172–188.
- Tsika, E., Moysidou, M., Guo, J., Cushman, M., Gannon, P., Sandaltzopoulos, R., Giasson, B.I., Krainc, D., Ischiropoulos, H., Mazzulli, J.R. (2010). Distinct region-specific a-synuclein oligomers in A53T transgenic mice: Implications for neurodegeneration. *J Neurosci* 30: 3409–3418. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4977-09.2010.
- Ulian-Benitez, S., Bishop, S., Foldi, I., Wentzell, J., Okenwa, C., Forero, M.G., et al. (2017). Kek-6: a truncated-Trk-like receptor for *Drosophila* neurotrophin 2 regulates structural synaptic plasticity. *PLoS Genet.* 13:e1006968. doi: 10.1371/journal.pgen.1006968.
- Vila, M., Vukosavic, S., Jackson-Lewis, V., Neystat, M., Jakowec, M., Przedborski, S. (2000). Alpha-Synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *J Neurochem* 74: 721–729. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.740721.x.
- Volles, M.J., Lansbury, P.T. Jr. (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar a-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* 41: 4595–4602. doi: 10.1021/bi0121353.
- Waggoner, S.N. (2020). Circadian Rhythms in Immunity. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2020 Jan 10;20(1):2. doi: 10.1007/s11882-020-0896-9.
- Ward, A., Hong, W., Favaloro, V., Luo, L. (2015). Toll receptors instruct axon and dendrite targeting and participate in synaptic partner matching in a *Drosophila* olfactory circuit. *Neuron* 85, 1013–1028. doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.003.
- Waxman, E.A., Giasson, B.I. (2010). A novel, high-efficiency cellular model of fibrillar a-synuclein inclusions and the examination of mutations that inhibit amyloid formation. *J Neurochem* 113: 374–388. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06592.x.
- Wang W., Khajavi, M. et al, (1998). The G209A Mutation in the α -Synuclein Gene in Familial Cases of Parkinson Disease in Non-Greek and/or Italian Populations. *Arch Neurol.* doi:1998;55:1521-1523.

- Yang, L. et al. (2015). Overexpression of CRY1 protects against the development of atherosclerosis via the TLR/NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol.* 2015 Sep;28(1):525-30. 62. Lee JE et al. *Curr Biol.* 2008 Feb 12;18(3):195-9, doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.001>
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros. R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B. et al. (2004). The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55: 164–173.
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.S. et al. (2005). Aggregated α -synuclein activates microglia: A process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 19: 533 – 542. doi: 10.1096/fj.04-2751com.
- Zhu, B., Pennack, J.A., McQuilton, P., Forero, M.G., Mizuguchi, K., Sutcliffe, B. et al. (2008). Drosophila neurotrophins reveal a common mechanism for nervous system formation. *PLoS Biol.* 6:e284. doi: 10.1371/journal.pbio.0060284.