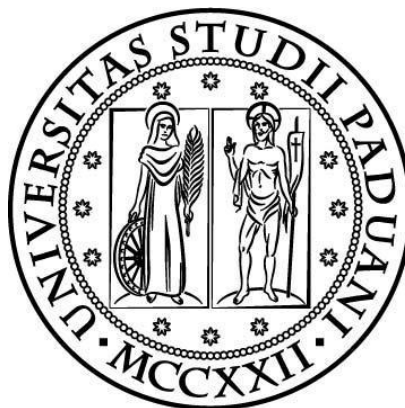


UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

**LAUREA SPECIALISTICA IN BIOLOGIA
EVOLUZIONISTICA**



**CLONAGGIO E PURIFICAZIONE DELLE 7 ISOFORME UMANE DI 14-3-3,
PER UN'ANALISI COMPARATIVA DEL LORO RUOLO NELLA
MALATTIA DI PARKINSON.**

RELATORE: PROF. LUIGI BUBACCO
Dipartimento di Biologia

CORRELATORE: DOTT.SSA ELISA BELLUZZI
Dipartimento di Biologia

LAUREANDO: ANDREA COVOLAN

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Struttura delle 14-3-3	6
1.2 Requisiti necessari per il legame con le 14-3-3	7
1.3 Regolazione delle 14-3-3	9
1.3.1 Autoregolazione	
1.3.2 Regolazione mediante fosforilazione	
1.4 Il ruolo delle 14-3-3	10
1.4.1 Regolazione dell'attività enzimatica	
1.4.2 Azione ostruttiva delle 14-3-3	
1.4.3 Le 14-3-3 come <i>scaffold</i> per la formazione di complessi proteici	
1.5 Le 14-3-3 e malattia di Parkinson	12
1.6 14-3-3 e α-sinucleina	13
1.7 Il processo di fibrillazione dell'α-sinucleina	15
1.8 14-3-3 e LRRK2	16
SCOPO DELLA TESI	19
2. MATERIALI E METODI	21
2.1 Terreni utilizzati	21
2.1.1 Medium LB (Luria-Bertani)	
2.1.2 Medium ricco SOC	
2.2 Cellule competenti	21
2.2.1 Cellule competenti DH5 α	
2.2.2 Cellule competenti BL21	
2.3 Trasformazione mediante shock termico	23
2.4 Plasmidi utilizzati nella fase di clonaggio	23
2.5 Plasmidi utilizzati per la tranfezione di	24
cellule HEK293T	
2.6 Purificazione del DNA plasmidico	24
2.7 Misurazione della concentrazione del DNA	25
e delle proteine	
2.8 Primers utilizzati	25
2.8.1 Primers per l'iserimento del sito di restrizione per <i>BamHI</i> in pET-28a+	

2.8.2 Primers per l'amplificazione degli inserti	
2.9 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	27
2.9.1 PCR mutagenica	
2.9.2 PCR per lo screening di colonie	
2.9.3 PCR per l'amplificazione degli inserti	
2.10 Elettroforesi su gel di agarosio	29
2.11 Digestione enzimatica del DNA	30
2.12 Defosforilazione del vettore	30
2.13 Ligazione fra vettore e inserto	31
2.14 Prove di espressione	31
2.15 Cromatografie tramite FPLC	31
2.15.1 Cromatografia a scambio anionico	
2.15.3 Cromatografia IMAC	
2.15.3 Cromatografia ad esclusione molecolare	
2.16 Precipitazione con ammonio solfato	33
2.17 Utilizzo dei tubi da dialisi	34
2.17.1 Sostituzione di un tampone e rimozione di un sale	
2.17.2 Concentrazione di una proteina con l'ausilio di PEG	
2.18 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)	34
2.19 Colorazione al blu di Comassie	35
2.20 Liofilizzazione di proteine	36
2.21 Dicroismo circolare	36
2.22 Western Blot	37
2.23 Espressione e purificazione di 14-3-3	38
2.24 Espressione e purificazione di α-sinucleina	39
2.25 Colture cellulari	40
2.25.1 Terreni per le linee cellulari	
2.25.2 Linea cellulare HEK293T	
2.26 Espressione e purificazione di LRRK2	41
2.26.1 Transfezione transiente di cellule HEK293T	
2.26.2 Lisi cellulare	
2.26.3 Purificazione	
2.27 Co-immunoprecipitazione	42
2.28 Saggio di aggregazione con tioflavina T (ThT)	43
3. RISULTATI	45
3.1 Clonaggio delle 7 isoforme di 14-3-3 umane	45
3.1.1 Strategia 1	
3.1.2 Strategia 2	

3.2 Prove di espressione per le 14-3-3.....	48
3.3 Purificazione delle 7 isoforme di 14-3-3.....	50
3.4 Analisi della struttura secondaria tramite spettropolarimetro	53
3.5 Purificazione di α -sinucleina.....	54
3.6 Saggi di aggregazione con tioflavina T.....	55
3.7 Purificazione di LRRK2 WT e di alcuni mutanti	57
3.8 Possibile copurificazione della PKA insieme a..... LRRK2	58
3.9 Valutazione del livello di fosforilazione delle Ser910/Ser935 in LRRK2 WT e in LRRK2 KD	59
3.10 Affinità delle diverse 14-3-3 con LRRK2.....	60
5. DISCUSSIONE	61

BIBLIOGRAFIA

APPENDICE

ABBREVIAZIONI

BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
TH	<i>Tyrosine hydroxylase</i>
ThT	<i>Thioflavina T</i>
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase</i>
WT	<i>Wild type</i>
KD	<i>Kinase death</i>
bp	Paia di basi
Da,kDa	Dalton, kDalton
dNTPs	<i>deoxynucleotide triphosphate</i>
DTT	Ditiotreitolo
EDTA	Acido etilen-di-ammiino-tetracetico
IPTG	Isopropil-p-D-tiogalatto-piranoside
kb	kilo basi
LB	Luria-Bertani
OD ₆₀₀	Densità ottica a 600nm
O/N	<i>Over night</i>
SDS-PAGE	<i>Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PMSF	<i>Phenyl methyl sulfonyl fluoride</i>
PVDF	Poliviniliden Fluoride
g	Rivoluzioni per minuto
SDS	Sodio Dodecil Solfato
TAE	Tris Acetato EDTA
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
Tris	2-ammino-2-idrossi-metilpropano-1,3-diolo

1. INTRODUZIONE

Nel nostro organismo sono presenti diverse famiglie di proteine omologhe che si sono diversificate, per un susseguirsi di mutazioni, a partire da un gene ancestrale comune. Una di queste famiglie, comprendente numerose isoforme e presente in numerosi organismi eucarioti, è quella delle 14-3-3. Il nome coniato per identificarle, fa riferimento alla frazione di eluizione (14) della cromatografia a scambio ionico con DEAE-cellulose (*diethylaminoethyl-cellulose-chromatography*) ed al pattern di migrazione (3-3) elettroforetica (*starch-gel-electrophoresis*) con il quale sono state isolate. Queste proteine vennero identificate nel 1967 da Moore e Perez nel corso di studi che miravano a catalogare tutte le proteine presenti nei tessuti cerebrali di mammifero. Furono ritenute subito importanti in quanto, da sole, rappresentavano l'1% delle proteine presenti nei tessuti cerebrali. Da allora, sono state identificate 153 isoforme, con un grado di similarità del 53% (Rosenquist 2000). Nell'uomo, in particolare, sono presenti 7 isoforme: β/α , γ , ϵ , ζ/δ , η , σ e θ chiamata anche τ (Berg, Holzmann & Riess 2003)(**Fig.1**). Le isoforme chiamate α e δ , non sono altro che la forma fosforilata di β e ζ (Berg 2003).

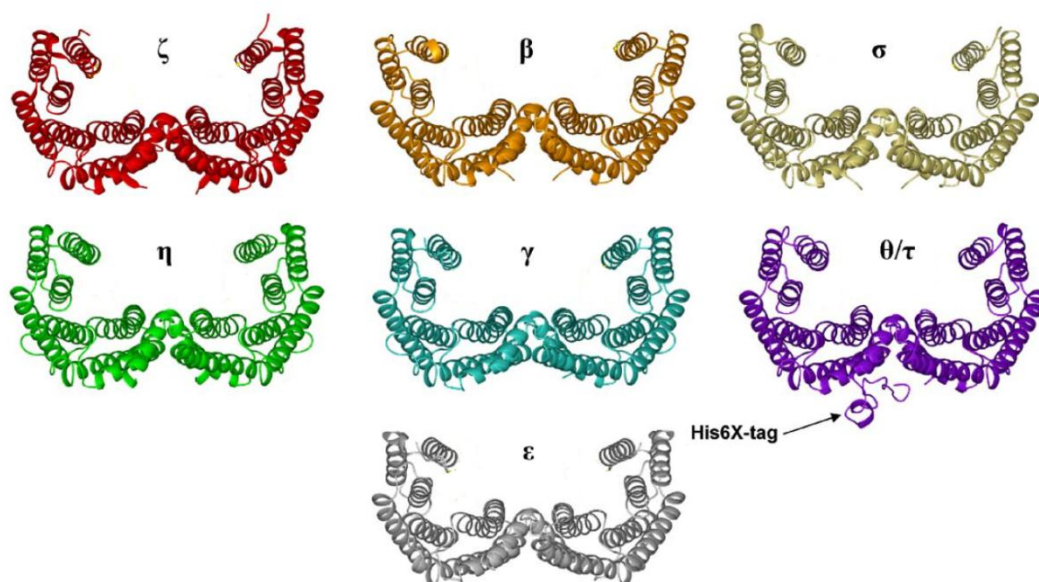


Fig.1 Struttura cristallografica dei dimeri delle 7 isoforme umane di 14-3-3. Nell'isoforma θ è stato raffigurato anche l'His-Tag all'estremità N-terminale utilizzato per la purificazione delle proteine. Questo mostra come la presenza del tag non vada ad interferire con il sito di legame o con la dimerizzazione. Immagine modificata da Gardino 2006.

Inizialmente alla sigla 14-3-3 seguiva una lettera dell'alfabeto greco ma in seguito, visto che le 24 lettere non erano più sufficienti, si iniziarono ad usare acronimi ed altri nomi creando confusione. Nel tentativo di mettere ordine,

diverse 14-3-3, identificate prima degli studi di Moore e Perez, vennero rinominate o incluse, per somiglianza, alle classi presenti nei mammiferi, creando diversi problemi di sinonimia. Per esempio, la proteina Leonardo di *Drosophila melanogaster* è una forma di 14-3-3 ε. Quella che nell'uomo veniva chiamata Biliardo è la 14-3-3 ζ. FAS, Rad24 e Rad25 appartengono sempre alla famiglia delle 14-3-3.

Oltre alle differenze nella sequenza, anche la localizzazione, la funzione e le possibili disfunzioni di ogni isoforma rappresentano un carattere discriminatorio. Nella tabella che segue (**Tab.1**), sono riassunte alcune informazioni riguardanti le diversità delle sette isoforme umane, per quanto riguarda la localizzazione istologica associata a specifiche patologie, la posizione dei geni codificanti, il coinvolgimento in alcune malattie e i risultati di alcuni studi compiuti su modelli animali.

14-3-3 isotype	Gene symbol	Genomic localization	Isotype-specific CSF disorders	Isotype-specific histology	Animal models and experimental results
β and its phosphorylated isotype α	YWHAB	20q13.1	CJD (β)	Present in tangles in AD and associated with tau proteins (β)	
γ	YWHAG	7q11.23	CJD	Elevated in AD, no association with tau, reduction in Down's syndrome and present in LBs in PD	Increased in rat carotid arteries after injury
ε	YWHAE	17p13.3	CJD	Elevated in AD, no association with tau and present in LBs in PD	
ζ and its phosphorylated isotype δ	YWHAZ	8q23.1		Present in tangles in AD, associated with tau and present in LBs in PD (ζ)	Upregulated in rat hypoglossal motor neurons after injury (ζ)
η	YWHAH	22q12.3	CJD, AD, other dementias and herpes encephalitis		
σ	SFN	1p35.3		Only expressed in T- and epithelial cells	Expression induced in response to DNA damage. Might function as main tumour suppressor
τ/θ	YWHAQ	2p25.1		Present in LBs in PD	Upregulated in rat hypoglossal motor neurons after injury

AD, Alzheimer's disease; CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; CSF, cerebrospinal fluid; LBs, Lewy bodies ; PD, Parkinson's disease.

Tab. 1 Rilevanza delle 7 isoforme umane di 14-3-3 in alcune malattie (Berg 2003)

Il fatto che queste proteine siano state mantenute da un progenitore antico comune a tutti gli eucarioti (**Fig.2**) lascia supporre che esse svolgano un ruolo importante. Negli animali è stato dimostrato il loro coinvolgimento nella regolazione del ciclo cellulare (compresa la proliferazione tumorale (Zhao 2011)), nell'apoptosi, nella risposta ai danni al DNA, nella formazione di complessi proteici, nella localizzazione di proteine, nel controllo dell'espressione genica, nella regolazione di chinasi e fosfatasi (Gardino 2006). Nelle piante, le 14-3-3 hanno un ruolo nella sintesi degli zuccheri, nel controllo dell' H^+ ATPasi (Obsil 2011), nell'assorbimento e nella riduzione dei nitrati (Rosenquist 2000). Visto il così largo impiego delle 14-3-3 all'interno delle cellule, un organismo risulterebbe avvantaggiato nel mantenere la duplicazione di un gene per la loro espressione, qualora avvenisse. Questa potrebbe essere una ragione per giustificare la presenza di numerose isoforme, ma ce ne sono altre. Poiché le 14-3-3 svolgono funzioni diverse, anche in differenti fasi dello sviluppo, è necessario che geni distinti siano sotto il controllo di promotori diversi. Maggiori sono i tipi cellulari presenti in un

organismo, maggiore sarà la probabilità di trovare isoforme differenti in quella specie (**Fig.2**). Chiaramente, se il numero di copie all'interno del genoma è elevato, più grande sarà la probabilità che questi geni evolvano indipendentemente formando nuove isoforme.

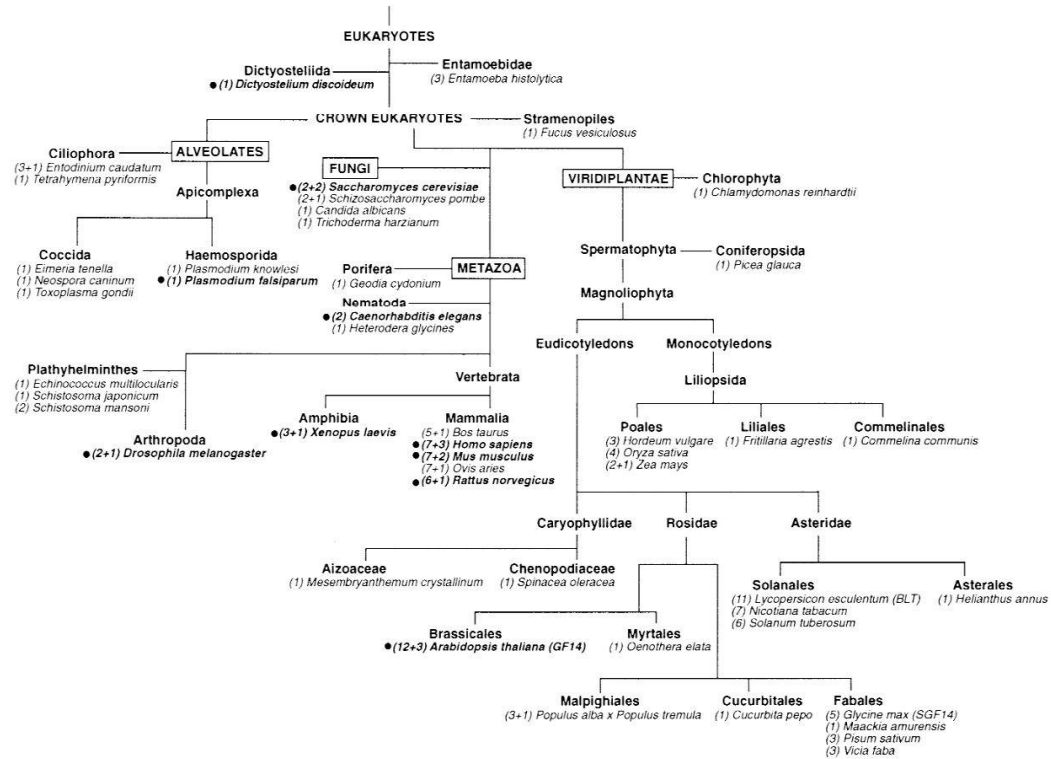


Fig.2 Cladogramma che rappresenta la distribuzione delle 14-3-3 presenti nelle varie specie. Fra parentesi il numero di isoforme al quale viene sommato il numero dei polimorfismi. (Rosenquist 2000).

Rosenquist et al., nel 2000, hanno condotto uno studio comparando 125 isoforme di 14-3-3, per ricavare un filogramma non radicato che mostrasse la distanza, in termini di mutazioni, fra le varie isoforme (**Fig.3**). Questo modello evidenzia come le isoforme di organismi appartenenti allo stesso *phylum* siano chiaramente simili fra di loro, tranne alcune eccezioni. Per esempio, l'isoforma ϵ sembra essere estranea al gruppo delle 14-3-3 dei metazoi, come se si fosse separata precocemente dal progenitore ancestrale, rimanendo quasi invariata fino ad oggi. L'albero mostra inoltre che organismi con tempi di generazione brevi presentano le isoforme meno conservate.

Lo stesso studio si proponeva poi di individuare i domini conservati, comparando allineamenti multipli e strutture cristallografiche note, presenti in banca dati. Salvo che una mutazione abbia fatto acquisire alla proteina una funzione

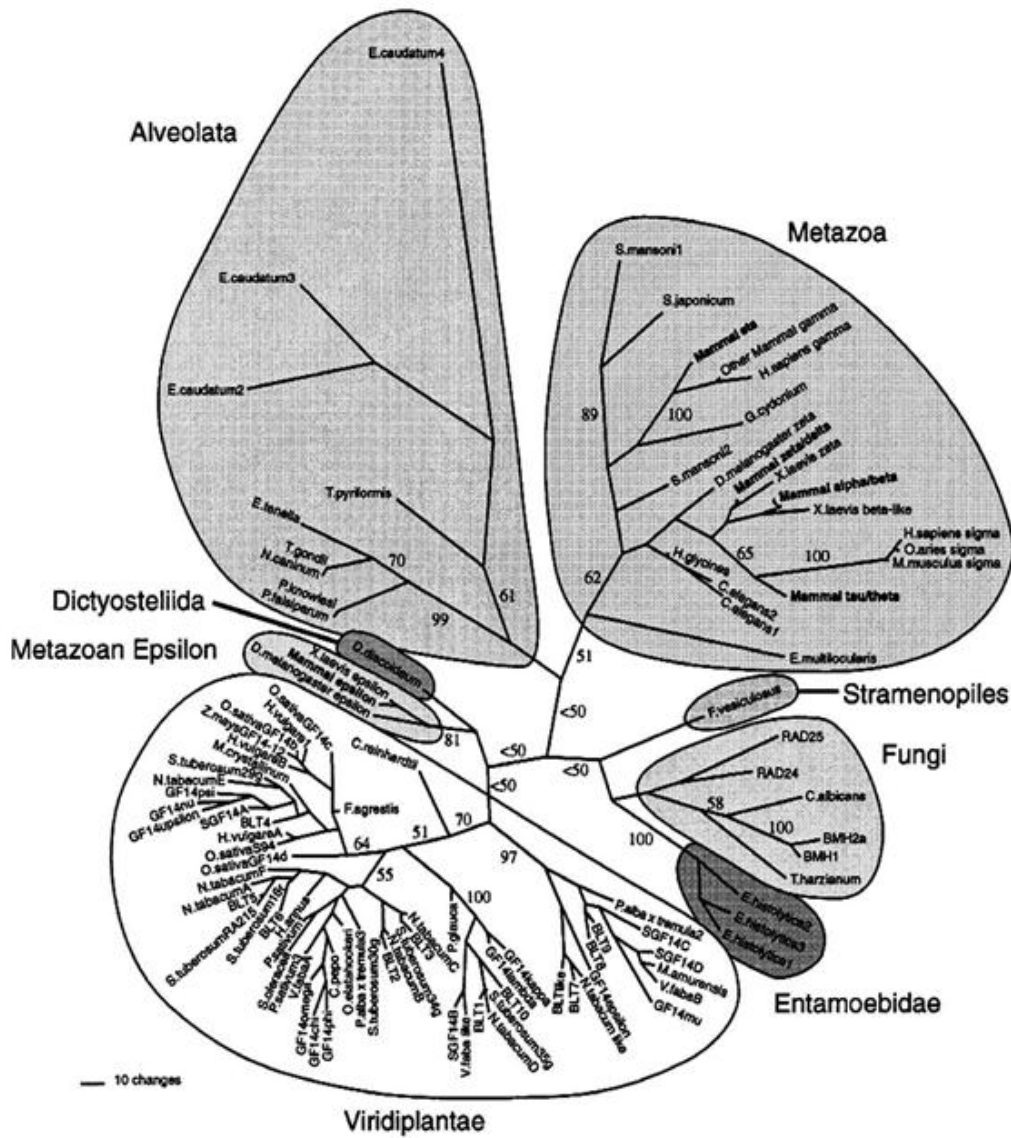


Fig.3 Filogramma non radicato costruito sulla base di 125 sequenze di 14-3-3 ottenute da Swissprot e Genbank. L'albero è stato generato con il programma PAUP 4.0b2, utilizzando il principio di massima parsimonia. (Rosenquist 2000)

completamente diversa ed abbia definito nuovi vincoli strutturali, è possibile avere un'indicazione dei suoi domini funzionali analizzando allineamenti multipli. La **Fig.4** mostra come le 14-3-3 siano caratterizzate da 5 domini molto conservati (regioni con diversi amminoacidi consecutivi in grigio), separati da regioni variabili. Un'analisi di file pdb può inoltre mostrare che i domini conservati si affacciano sulla tasca interna della molecola, cioè in quella regione che si ritiene essere l'interfaccia per le interazioni con le altre proteine (**Fig.5**).

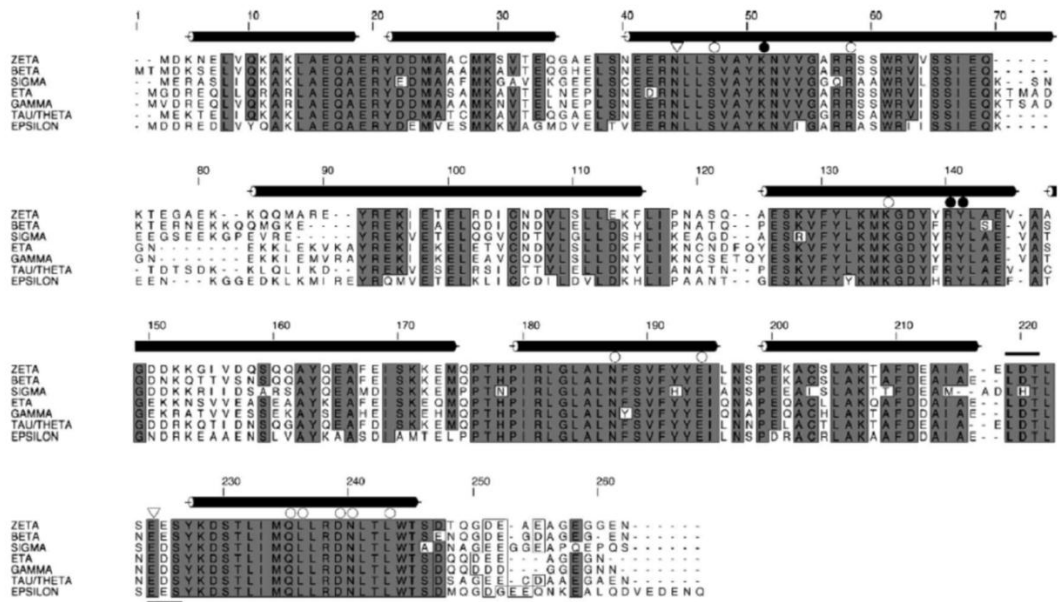


Fig.4 Allineamento multiplo delle sette isoforme di 14-3-3 umane (Gardino 2006). In nero, sopra le sequenze, sono raffigurate le 9 α -eliche della molecola. Gli amminoacidi in grigio rappresentano quelli conservati in almeno sei delle sette isoforme.

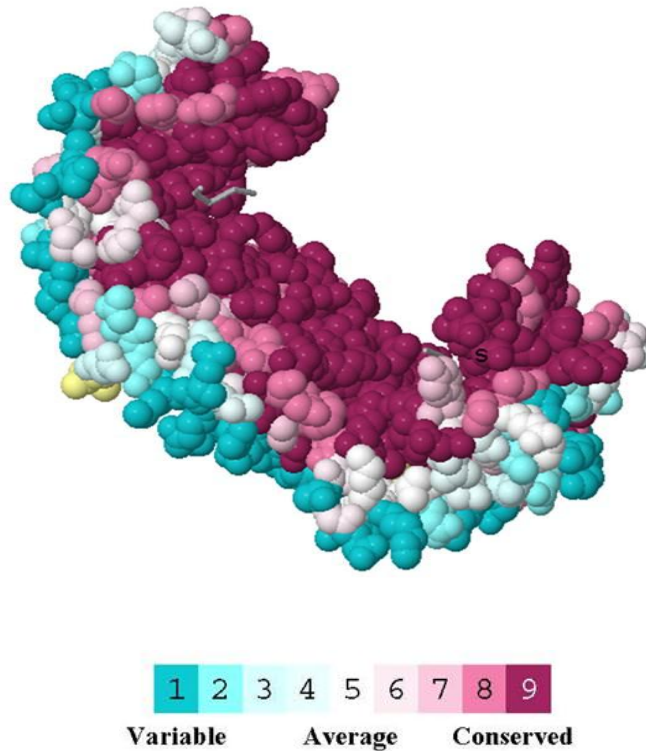


Fig.5 Immagine ottenuta comparando 80 file pdb di differenti isoforme, tramite il programma ConSurf. La colorazione della molecola sfuma dal rosso al blu, indicando in questo modo il grado di conservazione delle varie regioni. Le porzioni in giallo sono quelle esclusive di alcune isoforme.

1.1 Struttura delle 14-3-3

I monomeri di 14-3-3 hanno un peso di circa 30 kDa e una forma ad “L”, frutto dell’unione di 9 α -eliche (da α -A ad α -I) di differente lunghezza, disposte in modo antiparallelo(**Fig.6**).

Per adempiere le loro funzioni, le 14-3-3 devono essere associate in dimeri, in modo da formare una tasca che possa interagire con altre proteine. Questa tasca è profonda 20Å e larga 35Å ed ha proprietà anfipatiche.

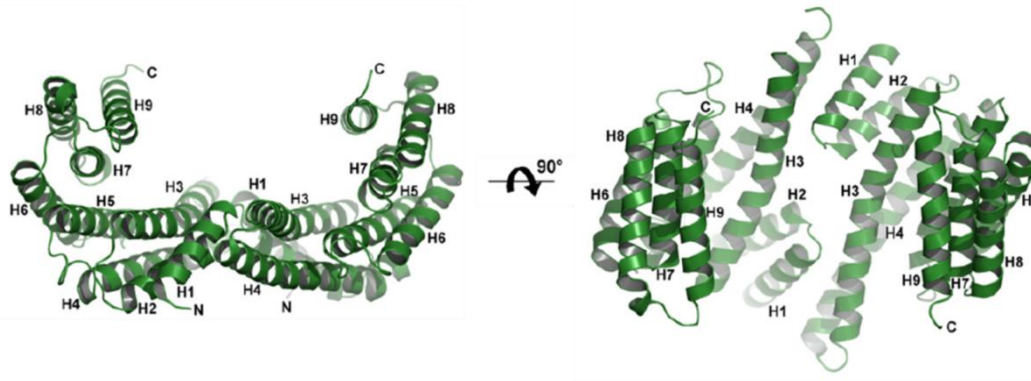


Fig.6 Disposizione delle 9 α -eliche delle 14-3-3. Figura modificata da (Obsil 2011).

Tale caratteristica è dovuta al fatto che il sito di legame presenta due α -eliche, α -C e α -E, ricche di amminoacidi carichi positivamente, come Lys49, Arg56, Arg127 e Tyr128(Gardino 2006). Altre α -eliche, α -G e α -I, disposte a formare le pareti della cavità, sono invece ricche di amminoacidi che le rendono idrofobiche. La polarità della molecola favorisce l’interazione con i siti fosforilati di numerose proteine.

La struttura dimerica è relativamente rigida in quanto, in assenza di ligandi inseriti nella cavità, non avvengono cambiamenti strutturali significativi. I monomeri che formano il dimero si interfacciano attraverso le α -eliche α -A, α -B e α -C’, α -D’ (**Fig.6**). Tra queste vengono a formarsi principalmente tre ponti salini: Arg18-Glu89, Glu5-Lys74, e Asp21-Lys85(Berg 2003). Il primo legame è indispensabile per tutti i dimeri, il secondo non si forma nelle isoforme γ , ϵ , η e il terzo legame è condiviso da tutte le isoforme tranne la ϵ (Obsil 2011). L’isoforma σ può inoltre formare un quarto ponte salino, che coinvolge Lys9 e Glu83. La formazione di quattro legami favorisce la struttura dimerica. Al contrario, l’isoforma ϵ forma prevalentemente eterodimeri perché se formasse omodimeri i monomeri sarebbero legati da un solo ponte salino anziché due.

Il fatto che alcune isoforme tendano a formare eterodimeri piuttosto che omodimeri, dipende, oltre che dal numero di ponti salini che si possono formare fra i monomeri, da variazioni amminoacidiche nei 20 amminoacidi dell’estremità N-terminale, la regione più variabile della molecola.

Nella formazione di alcuni dimeri sono coinvolti anche legami idrogeno, come nel caso dell’isoforma ζ (a carico degli amminoacidi Leu12, Ala16, Ser58, Val62, Ile65, and Tyr82)

1.2 Requisiti necessari per il legame con le 14-3-3

Analizzando le sequenze delle 14-3-3 sono stati individuati tre *pattern* di legame per proteine con siti fosforilati: RSXpSXP, RXY/FXpSXP e pS/pT X₁₋₂ CO₂H (all'estremità C-terminale) (Tab.2). Questi *pattern* sono caratterizzati dalla presenza di una fosfoerina (pS) o di una fosfotreonina (pT)(Aitken 2002). Gli interattori delle 14-3-3 presentano solitamente due siti fosforilati ciascuno dei quali si lega ad un monomero (Aitken 2002). Caratteristica importante è la distanza tra i due siti fosforilati, che deve essere di circa 34Å(Obsil 2011). I due siti infatti sono generalmente localizzati in regioni disordinate e flessibili della proteina, in grado quindi di ripiegarsi e interagire con il sito di legame della 14-3-3 (Obsil 2011).

E' stato calcolato che le proteine con due siti fosforilati, posti ad una determinata distanza, hanno una capacità di legarsi alle 14-3-3 trenta volte superiore rispetto a quelle che ne presentano solamente uno. Johnson et Al. hanno ipotizzato che la fosforilazione in tandem presente nelle regioni disordinate, si sia in qualche modo evoluta e si conservi in risposta alla maggior stabilità del legame con entrambi i monomeri (Fig.7).

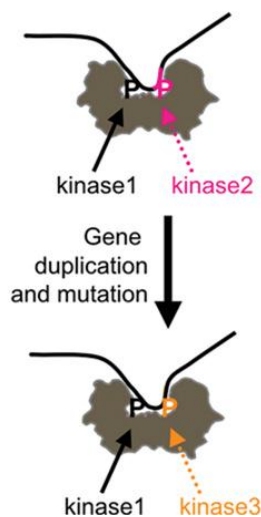


Fig.7 Evoluzione di un ligando paralogo per duplicazione genica e mantenimento di un sito fosforilabile vincente (Johnson 2010).

Come rappresentato nella Fig.8, i due siti di legame possono venire fosforilati anche da chinasi diverse. Uno dei due legami può avere minore affinità dell'altro ma è comunque necessario affinché alcuni ligandi subiscano modifiche conformazionali che attivano una loro funzione.

Inoltre, la conformazione a tasca delle 14-3-3 permette anche legami con proteine prive di siti fosforilati, come per esempio Exos, una tossina di origine batterica prodotta da *Pseudomonas aeruginosa*. Alcuni studi ritengono che l'interazione sia mediata da residui idrofobici (Lys49, Arg127 e Tyr128) altri sostengono che possano esistere proteine fosforilate sconosciute che fungono da ponte (Johnson 2010). Le 14-3-3 possono inoltre legare il DNA cruciforme generatosi dal ripiegamento di regioni palindrome, regolando l'inizio della sua trascrizione (Zannis 2008).

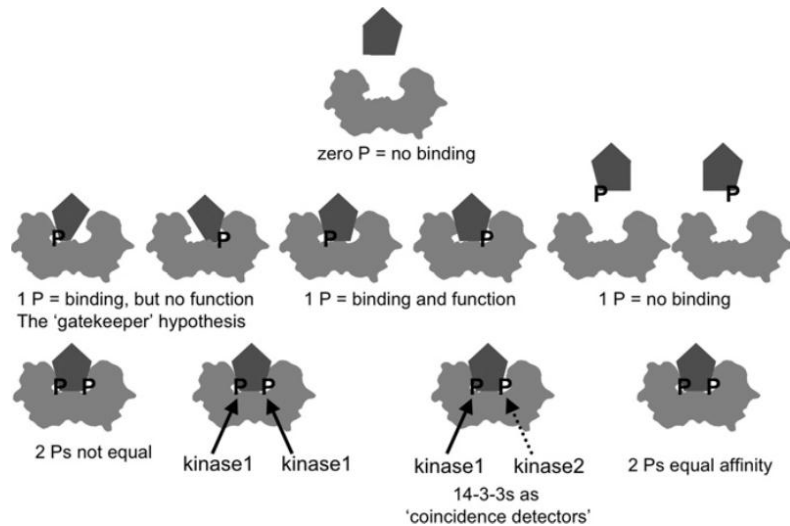


Fig.8 Modello definito “digital core” per riassumere il comportamento delle 14-3-3 in presenza di siti fosforilati. Una proteina priva di siti fosforilati generalmente non può legarsi alle 14-3-3. Quando possiede un sito fosforilato può interagire ed esercitare una qualche funzione, legarsi senza alcuna conseguenza oppure non interagire affatto. Un interattore può essere fosforilato in due punti, da due chinasi differenti o dalla stessa. I siti fosforilati possono avere o meno la stessa affinità per la 14-3-3. (Johnson 2010)

Binding assays and K_D comparison					
Mode	Peptide sequences/proteins ^a	Methods ^b	14-3-3	K_D (nM)	Ref.
Mode I RSx (pS/pT) xP ^c	RSRSTpSTP (pS-Raf259)	SPR	14-3-3 η -GST	510	[9]
	RSApSEP (pS-Raf621)	SPR	14-3-3 η -GST	1270	[9]
	RSRSTSTP (Raf259)	SPR	14-3-3 η -GST	>50,000	[9]
	LSQRQTSTpSTPNVHM (pS-Raf259)	SPR	14-3-3 η -GST	116	[9]
	LSQRQTSTpSTPNVHM (pS-Raf259)	SPR	14-3-3 η -GST	128	[8]
	LSQRQTSTpSTPNVHM (pS-Raf259)	SPR	14-3-3 ζ -GST	122	[8]
	LSQRQTSTpSTPNVHM (pS-Raf259)	FRET	14-3-3 ζ	124	[18]
	LSQRQTSTpSTPNVHMV (pS-Raf259)	RBA	GST-14-3-3 ζ	31.8	[11]
	AANAT (pT31)	Enzyme coupling	His-BMH ^h	2.5	[26]
	Nitrate reductase				
	CGPTLKRTApSTPFM				
	Nitrate reductase PNR6	SPR	His-GF14 ω ^g	843	[23]
Mode II Rx Φ x(pS/pT)xP ^c	Biotin-MAGGGRLSHpSLP	SPR	14-3-3 η -GST	55.7	[9]
	Biotin-MAGGGRLSHpSLP	SPR	14-3-3 η -GST	37.4	[9]
	Biotin-MAGGGRLSHpSLG	SPR	14-3-3 η -GST	190.4	[9]
	AcNH-RLQRpSLPA-CONH2 ^d	FI	14-3-3 ζ -GST	4600	[17]
Mode III pS/pT(X ₁₋₂)-COOH	Biotin-VKLLKGLDIETPSHYpTV-COOH				
	(BA-(933-948)-P, AHA2)	SPR	GF14 ω	88	[27]
	QSYpTV-COOH (PMA2)	ITM	His-14-3-3 ζ	2500 ^e	[12]
	QSYpTVP-COOH	ITM	His-14-3-3 ζ	2700 ^e	[12]
	QSYpT-COOH	ITM	His-14-3-3 ζ	15,000 ^e	[12]
	AANAT (pS205)	RBA	GST-14-3-3 ζ	21.7	[11]
2 Binding sites	MAGGGGRSApSEP-(AHA) ₆ -RSApSEPAKK	SPR	14-3-3 η -GST	~20	[9]
	AANAT (pT31, pS205)	RBA	14-3-3 ζ -GST	7.2	[11]
Unphosphorylated peptides	KEESEK-COOH (Ammodytosin C)	SPR ^f	14-3-3	1000 ^g	[28]
	“ ²⁴⁵ FGADAE”, Δ N222, ExoS	SPR	His-14-3-3 ζ	7.2	[29]
	H ₂ N-PHCVPRDLSWLDLEANMCLP-COOH (R18)	RBA	14-3-3 ζ -GST	90	[15]

^a AANAT, arylalkylamine *N*-acetyltransferase; AHA2, *Arabidopsis* plasma membrane H⁺-ATPase; PMA2, plasma membrane H⁺-ATPase; ExoS, ADP-ribosyltransferase exoenzyme S; BMH, yeast 14-3-3; GF14 ω , plant 14-3-3 (tobacco).

^b SPR, surface plasmon resonance, with immobilized peptides; FRET, fluorescence resonance energy transfer; RBA, radioactive binding assay; FI, fluorescence intensity; ITM, isothermal titration microcalorimetry.

^c Uppercase indicates a highly conserved position; Φ , an aromatic or aliphatic amino acid; x, any amino acid.

^d Ω , fluorophore-labeled amino acid.

^e pH 6.5 with Mg²⁺ and Ca²⁺.

^f Immobilized 14-3-3.

^g pH 8.2 with Mg²⁺ and Ca²⁺.

Tab.2 Costanti di dissociazione delle 14-3-3 nei confronti di molecole con diversi pattern di legame, specifici e non specifici. (Wu 2006)

1.3 Regolazione delle 14-3-3

1.3.1 Autoregolazione

Quando non ci sono proteine legate all'interno della tasca, gli ultimi 15-40 amminoacidi della coda C-terminale del monomero di 14-3-3 sono ripiegati in modo tale da impedire possibili legami aspecifici (Obsil 2011). Questo effetto autoinibitorio è probabilmente mediato da residui di Asp e Glu capaci di mimare un fosfopeptide andando così a mascherare il sito di legame. L'estremità C-terminale, avendo una bassa affinità per il sito attivo, viene scalzata in presenza di un interattore con i siti fosforilati. A supporto di ciò, 14-3-3 prive dell'estremità C-terminale legano con maggiore affinità Raf1 e BAD. Inoltre, nelle piante, è stato visto che la fusicoccina, una tossina fungina, che attiva la pompa H⁺ATPasi causando l'iperpolarizzazione della membrana, è in grado di aumentare di 93 volte l'affinità della 14-3-3 divaricando le code C-terminali ed aumentando la superficie della concavità disponibile per i legami (Michael 1999). Sono infine presenti delle regioni, come gli α -H e α -I loops, coinvolte nella discriminazione dei ligandi privi di gruppi fosfati (Gardino 2006).

1.3.2 Regolazione mediante fosforilazione

La fosforilazione di alcuni siti è importante per la stabilità del dimero e per la regolazione dei legami con le altre molecole. Nel caso delle isoforme η , β , ζ , la fosforilazione della Ser58 da parte di una chinasi dipendente da sfingosina (*sphingosine dependent kinase*, SDK) impedisce la formazione del dimero. Questo, nel caso della 14-3-3 ζ , inibisce la sua normale funzione anti-apoptotica (Megidish 1998). Inoltre, sono stati mappati altri siti che, una volta fosforilati, possono incrementare l'affinità di legame nei confronti dei loro interattori. Altri ancora che possono indurre il rilascio di ligandi, permettendo loro di traslocare nel nucleo o di avviare il processo apoptotico. Questo è il caso della Ser184, fosforilata dalla *c-Jun N-terminal kinases* (JNK), che impedisce alle 14-3-3 β e ζ di legare Bad e di inibire l'apoptosi (Zhao, J. 2011). Ancora, l'isoforma ζ può essere fosforilata a livello della Thr233 ad opera della casein chinasi 1- α , perdendo così la capacità di legare la Raf chinasi (Zhao 2011).

Nonostante molte somiglianze, è quindi impreciso parlare di 14-3-3 in termini generali. Anche se ci possono essere ligandi comuni, il grado di affinità per ogni isoforma è molto spesso differente e può variare a causa della presenza di chinasi capaci di fosforilare sia le 14-3-3 che i loro ligandi. Inoltre, non solo ogni isoforma possiede caratteristiche differenti, ma anche ogni eterodimero che si può formare possiede le sue peculiarità. Per questo motivo, in studi volti a comprendere il meccanismo d'interazione delle 14-3-3 con un'altra proteina è importante tener presente la localizzazione tessuto specifica delle varie isoforme, le possibili combinazioni di eterodimeri, la presenza di chinasi e di altri ligandi competitori che potrebbero avere maggior affinità della proteina in esame.

1.4 Il ruolo delle 14-3-3

Le 14-3-3 hanno la capacità di interagire con più di 200 proteine diverse e non lo fanno sempre allo stesso modo. Col passare degli anni i ruoli attribuiti alle 14-3-3 sono aumentati notevolmente e si è capito che non si tratta semplicemente di una classe di proteine chaperoniche. Esse possono modificare la conformazione di un enzima in modo da aumentare l'affinità per i suoi substrati (Kent 2010), possono mascherare siti necessari per l'interazione fra alcune proteine o sequenze segnale per il trasferimento di una proteina attraverso la membrana plasmatica (Obsil 2011). Possono fungere da *scaffold* per l'interazione fra più proteine (Obsil 2011) (**Fig.9**) e possono agire anche come *Heat shock proteins* in quanto sono in grado di stabilizzare diverse proteine e diminuire lo stress ossidativo dopo uno *shock* termico (Satoh 2005, Yano 2006).

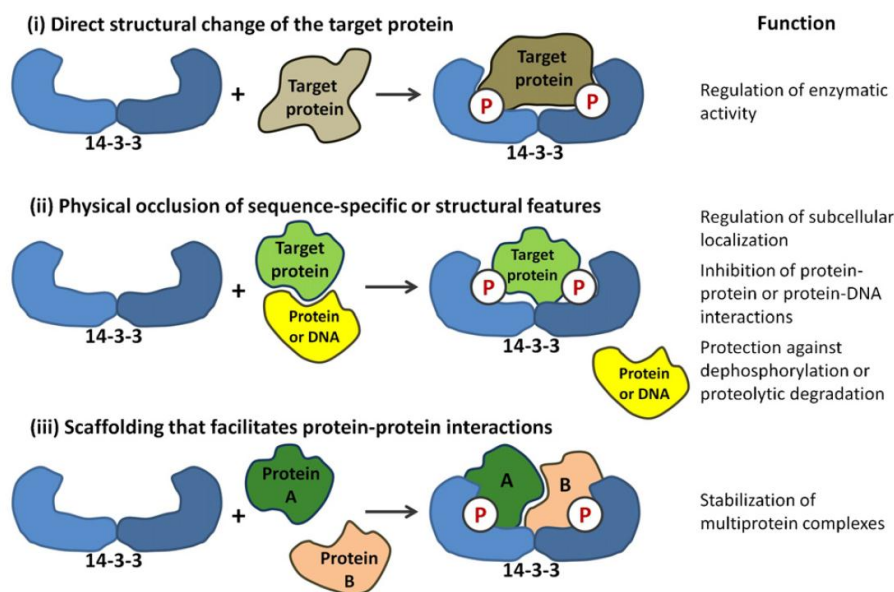


Fig.9 Schema riassuntivo dei tre principali ruoli delle 14-3-3 (Obsil 2011)

1.4.1 Regolazione dell'attività enzimatica

Il primo ruolo nel quale si è pensato fossero coinvolte è stato l'attivazione della tirosin idrossilasi (TH) e della triptofano idrossilasi (TPH). Questi enzimi sono entrambi coinvolti nella sintesi delle catecolammine. Quando la Ser19 e la Ser40 della TH sono fosforilate ad opera della protein chinasi A (PKA), essa può legare tutte le isoforme di 14-3-3. Questa interazione può essere regolata da un sistema a feedback negativo: le catecolammine prodotte, sono infatti in grado di regolare l'attività della TH agendo sulla fosforilazione dei siti di legame, determinando così la dissociazione dalla 14-3-3. Inoltre, quando la 14-3-3 lega la TH, questa

viene localizzata vicino alla membrana plasmatica dove può interagire con la dopa-decarbossilasi nella sintesi della dopamina(Kleppe 2011).

In secondo luogo, è stato molto studiato anche il rapporto fra 14-3-3 e pAANAT (aralchilamina N-acetiltransferasi fosforilato), l'enzima coinvolto nel penultimo passaggio della sintesi della melatonina. Questo enzima, grazie a due siti fosforilati ad opera della PKA (Thr31 e Ser209) è in grado di formare complessi con la 14-3-3. L'interazione fra queste due proteine coinvolge anche molti legami deboli sull'intera superficie di contatto(Berg 2003). La rigidità della 14-3-3 e la presenza di numerosi legami forza pAANAT ad assumere una conformazione che lo attiva(Obsil 2011).

Ancora, l'azione di molte chinasi, come la PKA (Kent 2010), la protein chinasi B (PKB o AKT) e C (PKC), PAK1 (*p21 activated protein kinase 1*), RSK1 (*Ras-mitogen activated protein kinase*, conosciuta anche come MAPKAP-K1), MAP kinase-activated protein kinase-2 (MAPKAP-K2) e la piruvato chinasi (PK), è regolata dal cambiamento conformazionale indotto dal doppio legame con la 14-3-3. A questo proposito, si ritiene che alcune patologie, come l'atassia cerebellare, possano essere dovute a chinasi mutate incapaci di legare le 14-3-3, come la PKC- γ (Berg 2003).

1.4.2 Azione ostruttiva delle 14-3-3

Il legame di una proteina con una 14-3-3, può nascondere o rendere inaccessibili alcuni siti necessari per il legame a DNA o proteine.

In questo modo, le 14-3-3 sono in grado di regolare la localizzazione cellulare di alcune proteine, mascherando i siti di riconoscimento ai recettori posti sulla membrana nucleare(Obsil 2011) o sequestrandole in determinati compartimenti della cellula (Obsil 2011). Un esempio è rappresentato da CRTC (*cAMP-regulate transcriptional coactivator*), un cofattore epatico che promuove la gluconeogenesi. Il suo legame fosforilazione-dipendente con la 14-3-3 impedisce la sua traslocazione nel nucleo e l'attivazione della gluconeogenesi(Kleppe 2011). Altri esempi di azione ostruttiva, sono rappresentati dalle interazioni che vedono coinvolte Cdc25C e Bad. Cdc25C, una proteina che agisce nella regolazione del ciclo cellulare, viene mantenuta inattiva dal legame con la 14-3-3, che ne impedisce la traslocazione nel nucleo. Bad è una molecola pro-apoptotica, che agisce sequestrando le proteine anti-apoptotiche Bcl-XL e Bcl-2. La 14-3-3 è in grado di legare Bad, impedendone l'azione e permettendo la sopravvivenza della cellula.(Berg 2003)

1.4.3 Le 14-3-3 come *scaffold* per la formazione di complessi proteici

La tasca delle 14-3-3 può anche fungere da *scaffold* all'interno del quale due proteine *target* possono interagire e formare legami stabili; isoforme specializzate in questo tipo di azione sono ϵ e ζ . Nelle piante, per esempio, le estremità C-terminali di due subunità facenti parte dello stesso dimerico di H^+ -ATPase di membrana, sono dotate un sito fosforilato e possono posizionarsi all'interno della tasca di un dimerico di 14-3-3. Questa loro collocazione promuove un cambiamento conformazionale alle estremità C-terminali, che normalmente hanno funzione autoinibente, e permette alle estremità di più dimeri di interagire fra loro all'interno della tasca delle 14-3-3. A un complesso formato inizialmente dal dimerico di 14-3-3 e da un dimerico di H^+ -ATPase, si aggiungeranno poi altri due dimeri di H^+ -ATPase tenuti insieme da altrettanti dimeri di 14-3-3 (**Fig.10**) (Ottmann 2007)

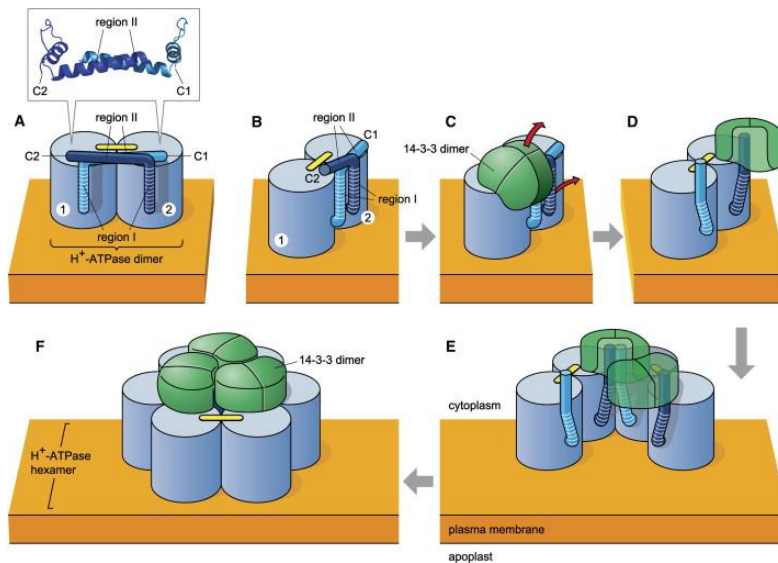


Fig.10 Modello proposto per assemblaggio del complesso esamerico dell' H^+ -ATPase di membrana. In azzurro sono rappresentate le subunità di H^+ -ATPase, in blu le loro estremità C-terminali, in verde i dimeri di 14-3-3, in giallo il legame che tiene unito il dimerico di H^+ -ATPase e in arancione la membrana plasmatica (Ottmann 2007).

1.5 Le 14-3-3 e malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (PD) è caratterizzata da una rigidità posturale, da tremore e da bradicinesia, attribuibile alla degenerazione dei neuroni dopaminergici localizzati nella *substantia nigra, pars compacta*. Inoltre c'è un rallentamento delle attività cognitive. Nei neuroni dopaminergici compromessi, possono essere presenti degli aggregati proteici insolubili chiamati corpi di (Spillantini 1998). Questi aggregati sono formati prevalentemente da una proteina chiamata α -

sinucleina, che durante il suo processo patologico di fibrillazione e aggregazione, intrappola numerose proteine.

Yacoubian et al. hanno osservato che c'è un minor tasso di mortalità in cellule sovraespressanti le 14-3-3 esposte ad induttori chimici del PD come rotenone e MPP+. Viceversa, quando viene inibita la loro espressione, la mortalità delle cellule aumenta. Le isoforme che sembrano conferire una maggior resistenza sembrano essere la γ , la ϵ e la θ (Yacoubian 2010). Inoltre, nel 2011, Kurz and Co. hanno dimostrato che 14-3-3 e α -sinucleina sono legate dal punto di vista dell'espressione. Quando l' α -sinucleina A53T umana viene sovraespressa nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra* di topo si verifica anche un aumento dell'espressione delle 14-3-3 θ , η e in particolare della ϵ . Al contrario c'è una leggera riduzione dell'espressione delle isoforme β , ζ e γ . L'aumento dell'espressione della 14-3-3 ϵ potrebbe essere un meccanismo di difesa messo in atto dalla cellula per contrastare l'aumento di α -sinucleina (Kurz 2012).

E' risaputo che nei neuroni dei malati di PD, l'attività della TH sia (Haavik 1998). Questo potrebbe essere dovuto all'interazione con alcune proteine come per esempio l' α -sinucleina e le 14-3-3 che hanno entrambe la capacità di legare la TH. L' α -sinucleina è in grado di impedire l'attivazione della tirosin idrossilasi (inibendo così la sintesi della dopamina) legando la TH defosforilata. Quando invece la 14-3-3 è legata alla TH fosforilata, questa viene protetta e rimane nel suo stato attivato. Inoltre il legame della 14-3-3 con l' α -sinucleina impedisce che quest'ultima si leghi alla TH defosforilata. Questi dati sono confermati dal fatto che un silenziamento della 14-3-3 ad opera di siRNA (small interfering RNA), porta ad una diminuzione dell'attività della TH e ad una diminuzione del livello di TH fosforilata (Steinacker 2011, Wang 2009).

1.6 14-3-3 e α -sinucleina

L' α -sinucleina è una proteina di 14kDa, isolata per la prima volta nel 1986 in *Torpedo californica* (Maroteaux 1988). Fin dai primi anni '90 è stata molto studiata, in quanto è la principale componente dei corpi di Lewy (**Fig.11**).

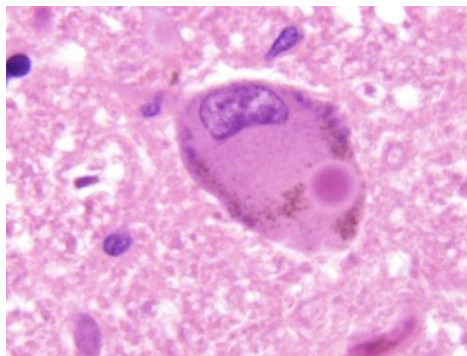


Fig.11 Sezione di *substantia nigra, pars compacta* in colorazione ematossilina-eosina in cui si può apprezzare il pirenoforo di un neurone con all'interno un corpo di Lewy (frontalcortex.com).

Questa proteina possiede un dominio idrofobico centrale di 12 amminoacidi che la contraddistingue dalle altre isoforme di sinucleina presenti in natura (β e γ). Proprio questa regione è importante per le interazioni con la membrana plasmatica a livello delle vescicole sinaptiche e per la formazione di oligomeri (**Fig.12**). In vitro è stato osservato che quando l' α -sinucleina lega le vescicole assume una struttura ad α -elica (Recchia 2004).

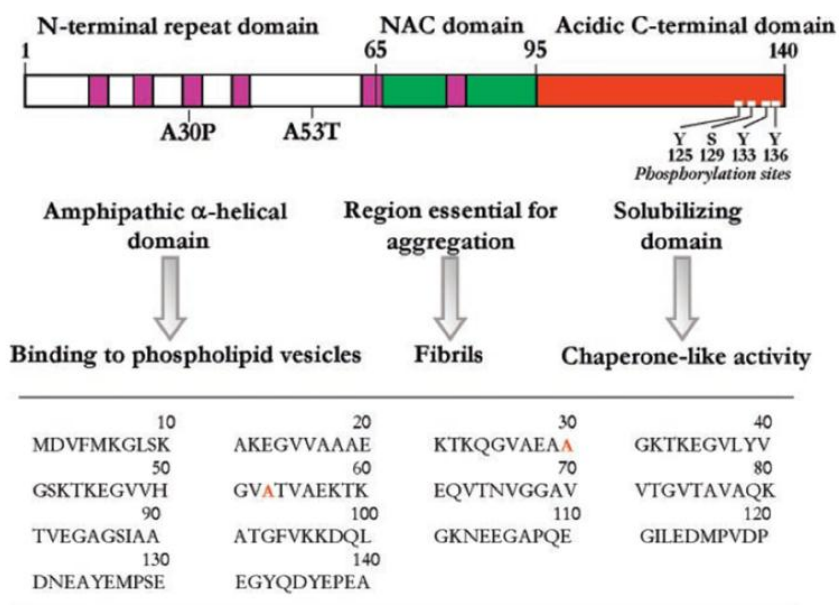


Fig.12 Rappresentazione delle principali regioni dell' α -sinucleina e della loro funzione. In basso è inoltre raffigurata la sequenza amminacidica della proteina con le mutazioni "non senso" patologiche segnalate in rosso (Recchia 2004).

Il ruolo di questa proteina non è ancora noto, ma ci sono studi che la ritengono coinvolta nel mantenimento di una certa rigidità della membrana plasmatica e nella capacità delle vescicole sinaptiche di rilasciare i neurotrasmettitori (Pavan, 2010). Si ritiene inoltre che, oltre ai danni di carattere infiammatorio provocati da un suo accumulo, essa sia anche responsabile della formazione di pori sulla membrana plasmatica (Lashuel 2002).

Le 14-3-3 e l' α -sinucleina spesso co-localizzano all'interno delle cellule nervose e sono dotate di due regioni, di circa 50 amminoacidi, con un grado di similarità superiore al 35%. La regione N-terminale dell' α -sinucleina ha inoltre la capacità di legare molte proteine che normalmente interagiscono con le 14-3-3.

Queste due proteine possono formare fra di loro complessi da 54 o 83 kDa, normalmente presenti nei tessuti cerebrali dei malati di PD (Xu 2002).

Il meccanismo con cui 14-3-3 e α -sinucleina interagiscono non è stato ancora definito con esattezza. Forse, come l' α -sinucleina è in grado di formare fibrille con sé stessa, allo stesso modo, a causa della similarità con le 14-3-3, potrebbe

interagire. Un dato di fatto è che le 14-3-3 solitamente legano proteine con serine fosforilate (Aitken 2003).

Nella sequenza dell' α -sinucleina è stata individuata la serina 129, un possibile sito di legame per le 14-3-3. Inizialmente si pensava che questo amminoacido venisse fosforilato dalla casein chinasi (CK), mentre in seguito è stato visto che PLK2 (*Polo Like Kinase 2*) e PLK3 (*Polo Like Kinase 3*), conosciute anche come *serum-inducibile kinases* (SNK), risultano essere le responsabili della sua fosforilazione (Inglis 2009). Questa modifica postraduzionale, non solo potrebbe essere un sistema di regolazione per le interazioni con le 14-3-3, ma rappresenterebbe anche un sistema di controllo per l'attività della TH, che non subisce l'inibizione da parte dell' α -sinucleina quando la Ser129 è fosforilata (Steinacker 2011).

1.7 Il processo di fibrillazione dell' α -sinucleina

Il processo di fibrillazione dell' α -sinucleina, che come ultima conseguenza porta all'accumulo delle fibrille nei corpi di Lewy, è stato studiato sia in vivo che in vitro. La capacità di una proteina di formare fibrille sembra non essere una proprietà rara per questo genere di molecole. Molti studi hanno dimostrato che diverse proteine globulari o *unfolded* possono essere indotte a generare fibrille in particolari condizioni (Yagi 2005). Questa capacità dipende probabilmente da proprietà della catena peptidica (come la possibilità di formare numerosi legami idrogeno fra i gruppi NH e CO), piuttosto che dal tipo di amminoacidi che si susseguono. Il processo che porta alla formazione delle fibrille si suddivide in due parti, una chiamata nucleazione (*lag fase*), che vede la formazione di piccoli oligomeri, ed una seconda fase chiamata elongazione (*growth phase*), che rappresenta il processo che porta alla formazione delle fibrille (**Fig.13**).

In presenza di protofibrille, ovvero di corpi ad uno stato precoce di aggregazione, il processo di fibrillazione è facilitato, in quanto questi complessi hanno la capacità di reclutare e stabilizzare le proteine monomeriche. Essi fungono in pratica da innesco per la propagazione del filamento e per questo motivo vengono anche chiamati "*seeds*" (Giurleo 2008). Per descrivere la formazione delle fibrille nel tempo, si fa riferimento ad una curva sigmoide con una fase iniziale di plateau, dovuta al tempo impiegato per la formazione dei nuclei di aggregazione, una fase di rapida crescita, dovuta all'azione dei *seeds*, ed una parte di plateau finale, giustificabile dall'esaurimento della proteina libera in soluzione e da un allungamento e da un inspessimento (ma non da un aumento in numero) delle fibrille (**Fig.14**) (Merlini 2003). Il disagio che queste fibrille provocano accumulandosi all'interno dei neuroni non è ancora stato ben definito. Si suppone che possa esserci un'inibizione del sistema antiapoptotico o che venga promossa la produzione di specie attive dell'ossigeno (ROS) (Recchia 2004).

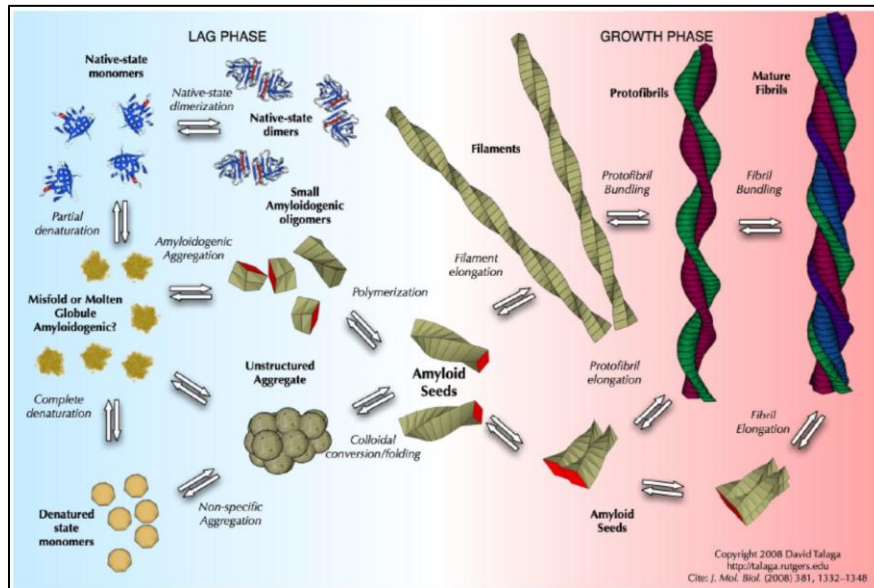


Fig.13 Processo di formazione delle fibre amiloidi(Giurleo 2008). Il meccanismo è differente a seconda che si parta da molecole monomeriche con una struttura terziaria ben definita o che si parta da molecole *unfolded*.

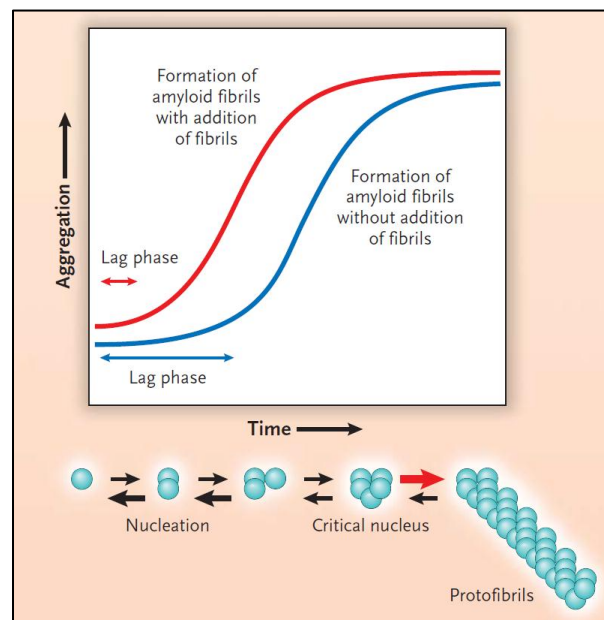


Fig.14 Andamento del processo di aggregazione in presenza o in assenza di protofibrille (seeds). (Merlini 2003)

1.8 14-3-3 e LRRK2

Fra le cause della malattia di Parkinson ci possono essere mutazioni a carico di proteine come α -sinucleina, parkin, LRRK2, DJ1 e pink 1. LRRK2 in particolare, *Leucine-rich repeat kinase* di 280kDa, normalmente associata in dimeri, le cui mutazioni rappresentano la più comune causa di

Parkinson autosomico dominante con insorgenza tardiva (Paisan 2004). Non tutte le popolazioni cellulari risentono delle mutazioni di LRRK2 in quanto i suoi livelli di espressione variano notevolmente. Questa proteina è espressa soprattutto nella corteccia frontale e nel midollo e si trova in assoni, dendriti e in quelle regioni della cellula ricche di membrana plasmatica, come l'apparato di Golgi, gli endosomi, le vescicole, i lisosomi ecc (Drolet 2011). Si ritiene che LRRK2 possa essere coinvolta nel mantenimento e nella crescita degli assoni, nell'attivazione dell'apoptosi, nella via di trasduzione del segnale della MAP chinasi e anche nella regolazione delle strutture citoscheletriche, essendo in grado di interagire con alfa e beta tubulina. Inoltre, LRRK2 interagisce anche con Rab5, una proteina che regola la fusione delle vescicole all'endosoma. La relazione fra queste due proteine lascia supporre che vi sia un ruolo di LRRK2 nella biogenesi delle vescicole sinaptiche (Shin 2008).

Per quanto riguarda l'apoptosi, è stato visto che LRRK2 interagisce con il *death domain* di FADD, una proteina coinvolta nella via apoptotica estrinseca, che ha origine dal recettore di membrana Fas e che porta all'attivazione della caspasi 8. Il ruolo che LRRK2 potrebbe adempiere in questa cascata di segnali sembra non essere solo quello di una chinasi. Mutanti di LRRK2 privi del dominio LRR mantengono ancora l'attività chinasi ma non portano all'attivazione delle caspasi. Sembra pertanto che LRRK2 abbia il compito di reclutare, grazie alla regione LRR, una molecola necessaria per la continuazione della via apoptotica. (Dzamko 2012)

Si ritiene che le 14-3-3 possano essere delle possibili candidate a questo ruolo essendo in grado di legarsi alla Ser910 e alla Ser935 fosforilate localizzate sul dominio LRR. L'importanza del rapporto fra queste due proteine è sottolineato dal fatto che 5 mutanti patologici di LRRK2 non sono in grado di legare le 14-3-3 (Dzamko 2012).

Per comprendere meglio la regolazione del legame fra 14-3-3 e LRRK2 sono state cercate possibili chinasi responsabili della fosforilazione della Ser910 e della Ser935 (Iaccarino 2007). E' stato dimostrato che la PKA ha la capacità di fosforilare la Ser 935 (Li 2011) ma non sono ancora stati condotti studi per verificare l'azione della PKA sulla Ser910 (**Fig.15**).

Recentemente, dopo la scoperta che cellule del sistema immunitario come linfociti e macrofagi hanno un alto livello di espressione di LRRK2, sono state vagliate diverse chinasi appartenenti alla famiglia delle *IkappaB Kinase*. Sembrerebbe che i Toll like Receptors posti sulle membrane plasmatiche dei macrofagi innescassero una serie di segnali responsabili dell'attivazione delle *IkappaB Kinases* con la conseguente fosforilazione di alcune serine di LRRK2 fra cui la Ser910 e la Ser935 (Dzamko 2012).

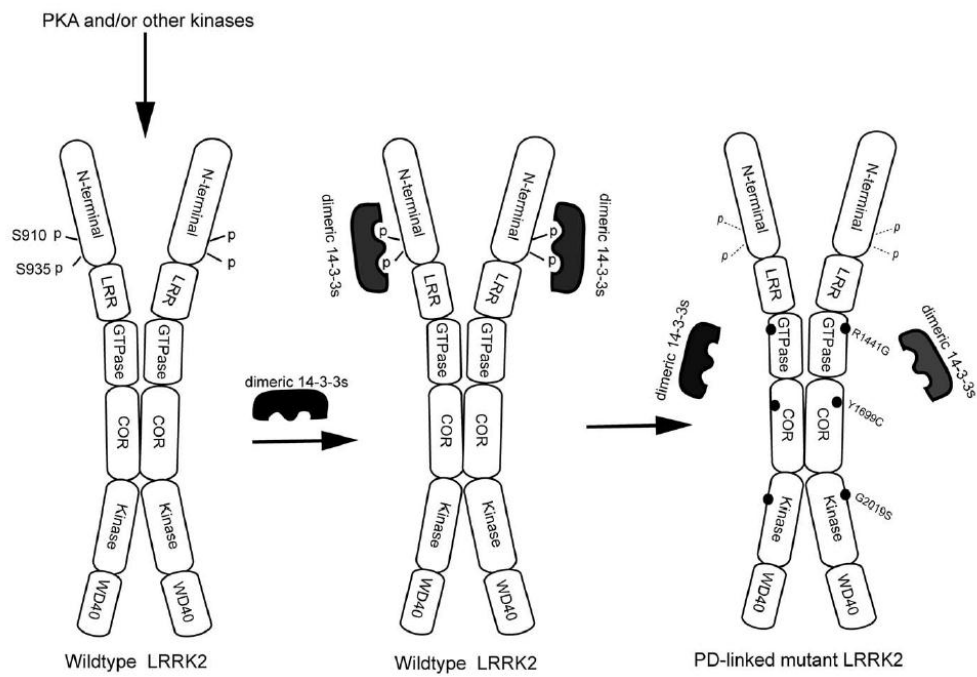


Fig.15 Ipotesi di come le 14-3-3 possano interagire con LRRK2 dopo la fosforilazione della Ser935 e della Ser910 da parte della PKA e/o di qualche altra chinasi (Li 2011)

SCOPO DELLA TESI

Le 14-3-3 sono una famiglia di proteine capaci di legare centinaia di interattori diversi e di svolgere numerose funzioni, molte delle quali probabilmente ancora sconosciute. Il fatto che queste proteine interagiscano con varie proteine associate al PD, come LRRK2, α -sinucleina e tirosin idrossilasi, lascia supporre che possano rappresentare un anello di congiunzione fra le varie cause di questa malattia neurodegenerativa.

Indagini sul ruolo delle 14-3-3 nel PD sono complicate dal fatto che, nell'uomo, sono presenti 7 isoforme, le quali potrebbero avere funzioni differenti tessuto-specifiche.

Lo scopo di questa tesi è quello di clonare, esprimere e purificare le 7 isoforme umane di 14-3-3 in modo da poter intraprendere un'analisi comparativa del loro ruolo fisiologico e/o patologico nel contesto del PD. In particolare, dopo aver clonato e messo a punto un protocollo di purificazione per tutte le isoforme, è stato effettuato un esperimento preliminare per identificare quali di esse siano coinvolte nel processo di fibrillazione dell' α -sinucleina in vitro. Inoltre è stato fatto un primo tentativo di coimmunoprecipitazione in vitro tra 14-3-3 e LRRK2 ricombinanti al fine di studiare l'interazione isoforma specifica. Prima di procedere con questo esperimento, è stato valutato il livello di fosforilazione delle due serine di LRRK2 necessarie per il legame con le 14-3-3 e il possibile coinvolgimento della PKA in questa interazione.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Terreni utilizzati

2.1.1 Medium LB (Luria-Bertani)

Per un litro: 10g bactotriptide
5g estratto di lievito
5g NaCl

La soluzione deve essere agitata fino a sciogliere le polveri, aggiustata a pH 7 con NaOH e portata a volume di 1 litro con acqua deionizzata. Successivamente il terreno va autoclavato. Per realizzare delle piastre, ai componenti per il terreno LB liquido descritto in precedenza, vanno aggiunti 15g/litro di Bacto Agar o di agarosio. Dopo aver autoclavato il terreno, questo va lasciato raffreddare fino a 50-60 °C in modo che eventuali antibiotici aggiunti non vengano degradati a causa delle alte temperature. Finché è ancora caldo e liquido, il terreno va versato all'interno di piastre sterili e lasciato solidificare sotto cappa.

2.1.2 Medium ricco SOC

Per un litro: 20g bactotriptide
5g estratto di lievito
5g NaCl
1,87g MgCl₂

Dopo aver sciolto le polveri, aggiustato a pH7 con NaOH e portato a volume di 1 litro la soluzione, questa va autoclavata e lasciata raffreddare. A questo punto vanno aggiunti glucosio 20mM.

2.2 Cellule competenti

2.2.1 Cellule competenti DH5α

Le cellule competenti DH5α, utilizzate nella fase di clonaggio, sono rese chimicamente competenti grazie al trattamento con un buffer freddo contenente CaCl₂ che destabilizza la parete batterica facilitando l'ingresso di DNA esogeno. Inoltre, i cationi presenti nel buffer mascherano la carica negativa del DNA facilitando l'ingresso attraverso la membrana plasmatica. Per la loro preparazione

è necessario prelevare alcune cellule da uno stock del ceppo DH5α piastrarle senza antibiotico. Dopo aver lasciato incubare la piastra a 37°C *over night*, si preleva una singola colonia e la si inocula in 55ml di terreno LB. Al raggiungimento di un OD₆₀₀ compreso tra 0,2-0,5, la coltura va trasferita in ghiaccio per 20 min. Successivamente si centrifuga a 7000g per 7 minuti a 4°C per poi eliminare il surnatante. Il pellet batterico va risospeso in 20ml di TBI freddo, e si agita lasciandolo in ghiaccio per 20 minuti. A questo punto bisogna centrifugare il campione a 7000g a 4°C per 7 minuti e successivamente eliminare il surnatante. Il pellet va risospeso in 2ml di TBII freddo, e dopo aver agitato, va mantenuto in acqua ghiacciata per 15 minuti. Infine, bisogna aliquotare 100μl della coltura in diverse provette che verranno congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

Buffer:

TBI:

100 mM RbCl₂

50 mM MnCl₂

30 mM CH₃COOK

10 mM CaCl₂

15% glicerolo

Aggiustare il pH a 5.8 con 0,2 M di acido acetico.

Filtrare con filtri da 0,45 (pretrattare filtro con acqua sterile).

Conservare a -20°C

TBII:

75 mM CaCl₂

10 mM RbCl₂

10mM MOPS (3-(*N-morpholino*)propanesulfonic acid)

15% glicerolo

Aggiustare il pH a 6,8 con KOH

Filtrare con filtri da 0,45 (pretrattare filtro con acqua sterile).

Conservare a -20°C

2.2.2 Cellule competenti BL21

Queste cellule sono particolarmente adatte per l'espressione di proteine esogene indotta da IPTG in quanto hanno una scarsa produzione di proteinasi e riescono a tollerare la potenziale tossicità delle proteine espresse. Per la preparazione di queste cellule è necessario allestire una precoltura di 5ml di LB e lasciarla crescere *over night* a 37°C. Il giorno successivo, la coltura in fase stazionaria, viene inoculata in terreno LB fresco in un rapporto 1:100. Questa, viene fatta crescere fino ad un OD₆₀₀ pari a 0,3 raggiunto il quale viene trasferita in ghiaccio

per 15 min per bloccare la crescita. Le cellule vengono pellettate centrifugando per 5 minuti a 5000g a 4°C. Dopodiché, tolto il surnatante, vengono risospese in metà volume iniziale di CaCl₂ 0,1M freddo, precedentemente sterilizzato. Si incubano in ghiaccio per 30 minuti prima di venire nuovamente centrifugate a per 5 minuti a 5000g a 4°C. Poi vengono risospese in 1/50 del volume iniziale di CaCl₂ 0,1M e 25% glicerolo. Successivamente vanno incubate in ghiaccio dove la competenza aumenta proporzionalmente al tempo trascorso, inizia dopo un'ora e aumenta fino a 24 ore dopo. A questo punto, le cellule rese competenti, vengono congelate in azoto liquido e conservate in freezer a -80°C in aliquote di 100µl.

2.3 Trasformazione mediante shock termico

Le cellule competenti precedentemente descritte sono in grado di internalizzare del DNA plasmidico esogeno in particolari condizioni. 50ng di DNA plasmidico vanno aggiunti ad un'aliquota di 100µl di cellule competenti che verranno lasciate ad incubare in ghiaccio per 15 min. Dopo questo passaggio si provoca uno shock termico immergendo la provetta per 90 secondi in un bagnetto a 42°C. Si aggiungono poi 900µl di terreno *medium ricco SOC* alla provetta che va lasciata ad incubare per 45min a 37°C in agitazione. A questo punto si può piastrare la coltura in un terreno solido contenente l'antibiotico al quale il plasmide inserito conferisce resistenza.

2.4 Plasmidi utilizzati nella fase di clonaggio

Le sequenze codificanti le 7 isoforme di 14-3-3 si trovano all'interno di plasmidi pEBG, per l'espressione di proteine in cellule di mammifero, disponibili nel nostro laboratorio. Tali plasmidi sono gentilmente stati concessi dal prof. Dario Alessi (University of Dundee, Dow Street, Dundee Scotland). Il plasmide pEBG ha una lunghezza di 6034bp alla quale va aggiunta la lunghezza delle sequenze codificanti le diverse 14-3-3 che hanno una dimensione compresa tra 750bp e 850bp, a seconda dell'isoforma (vedi appendice).

Le 7 isoforme di 14-3-3 andranno ad essere clonate all'interno del plasmide batterico pET-28a+ (Novagen), un vettore di 5369bp a basso numero di copie, il quale conferisce la resistenza alla kanamicina. L'espressione delle proteine ricombinanti clonate all'interno di questo plasmide, è sotto il controllo di un promotore forte riconosciuto dalla RNA polimerasi del fago T7 la cui trascrizione è regolata dal gene lac. In seguito all'induzione con IPTG, l'RNA polimerasi di *Escherichia coli* può legarsi al promotore lac promuovendo la trascrizione della RNA polimerasi del fago T7, necessaria per la trascrizione della proteina ricombinante.

2.5 Plasmidi utilizzati per la transfezione di cellule HEK293T

I costrutti di LRRK2 WT e KD utilizzati per la transfezione di cellule HEK293T sono vettori lenti virale pCHMWS per l'espressione eucariotica. All'interno del *multiple cloning site* di questo vettore è stata clonata la sequenza codificante il peptide 3xflag, contenente un codone di start all'N-terminale e un sito di restrizione per BamHI al C-terminale. Il peptide flag è necessario per la fase di purificazione ed è utilizzato come bersaglio degli anticorpi per poter vedere la proteina in Western Blot. I costrutti dei mutanti per le Ser910 e Ser935, sono invece vettori pCMV5 dotati di una sola sequenza flag, e ci sono stati gentilmente concessi dal prof. Dario Alessi (University of Dundee, Dow Street, Dundee Scotland).

2.6 Purificazione del DNA plasmidico

Per estrarre e purificare il DNA plasmidico di una colonia batterica, vengono utilizzate *Miniprep* commerciali (Promega). Come prima cosa è necessario inoculare in 5ml di terreno LB, contenente l'appropriato antibiotico, una singola colonia di batteri trasformati. Dopo aver incubato la coltura *over night* a 37°C, i batteri vanno precipitati in centrifuga a 5000g per 10 minuti. A questo punto, dopo aver eliminato il surnatante, si risospende il pellet in 250µl di *Cell Resuspension solution* e si trasferisce in una eppendorf da 2 ml. Qui si aggiungono 250µl di *Cell Lysis Solution* in modo da rompere le cellule e degradare l'RNA che potrebbe contaminare il DNA plasmidico estratto. Dopo aver agitato delicatamente per inversione, si attendono 5 minuti prima di aggiungere 750µl di *Neutralization Solution*. Il campione viene quindi centrifugato alla massima velocità per 10 minuti in modo da precipitare il lisato batterico. Il surnatante, in cui il DNA plasmidico, dopo la lisi dei batteri, si troverà disciolto, va caricato in una colonna dotata di un filtro capace di trattenere il DNA. La colonna, posta all'interno di una eppendorf, deve essere centrifugata per 1 minuto alla massima velocità in modo da far defluire il surnatante attraverso il filtro. Ora, è necessario effettuare un lavaggio del DNA plasmidico caricando nella colonna 700µl di *Colum Wash Solution*. Successivamente, dopo aver centrifugato per un altro minuto il campione in modo da eliminare anche le ultime tracce della soluzione di lavaggio, il DNA plasmidico va eluito in una eppendorf caricando 50µl di acqua mQ sterile e centrifugando per l'ultima volta la colonna. Il DNA eluito va conservato a -20°C.

Soluzioni:

Cell Resuspension Solution

50mM Tris-HCl (pH 7.5)

10mM EDTA

100µg/ml RNase A

Cell Lysis Solution

0.2M NaOH

1% SDS

Neutralization Solution

1.32M potassio acetato pH 4,8

Column Wash Solution

80mM potassio acetato pH 4,8

8.5mM Tris-HCl (pH 7.5)

40µM EDTA

2.7 Misurazione della concentrazione del DNA e delle proteine

Per misurare la concentrazione del DNA e delle proteine è stato utilizzato uno spettrofotometro di tipo *diode-array* Agilent 8453 EV-visible. Per quantificare il DNA viene misurata l'assorbanza a 260nm mentre per quantificare le proteine quella a 280nm. Lo strumento è in grado di compiere una correzione sottraendo la media dell'assorbanza tra 700nm e 900nm misurata nel campione bianco di calibrazione. I valori di assorbanza ottenuti, una volta moltiplicati per il fattore di diluizione del campione, potranno essere usati per calcolare le concentrazioni grazie alla legge di Lambert-beer $A = \epsilon c l$, dove "A" è l'assorbanza, "ε" è il coefficiente di estinzione proprio di ogni molecola e "l" è la lunghezza del cammino ottico che il fascio di luce attraversa e dipende essenzialmente dalla cuvetta. I valori di ε per le proteine sono stati ottenuti inserendo la sequenza amminoacidica nel programma online Protparam.

2.8 Primers utilizzati

Tutti i primer utilizzati hanno una percentuale di guanina e citosina, sul totale dei nucleotidi, compresa fra il 50 e il 60% e una temperatura di *melting* intorno ai 60°C. Essi hanno inoltre una guanina o una citosina all'estremità 5' in modo da facilitare l'annealing, grazie ai 3 legami che questi nucleotidi possono stabilire con la sequenza *target*. Nelle sequenze dei primers che seguono, è indicato in giallo il sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione *BamHI*, in verde quello per *NdeI* e in rosso è indicato il codone di inizio del cDNA delle 14-3-3.

2.8.1 Primers per l'iserimento del sito di restrizione per *BamHI* in pET-28a+

Primer forward: 5'-CCTGGTGCCGCGCG[▼]GATCCCATATGGCTAGCAT-3'

Primer reverse: 5'-ATGCTAGCCATATG[▼]GGATC[▼]CGCGCGGCACCAGG-3'

2.8.2 Primers per l'amplificazione degli inserti

La prima strategia di clonaggio prevedeva l' inserimento della sequenza per le 14-3-3 fra i siti di riconoscimento per *BamHI* e *NotI*. A questo fine sono stati progettati dei primer che permettono l'amplificazione di una regione leggermente più ampia di quella che verrà tagliata.

14-3-3 REV: 5'-CACCTGGGACCCTTGAGAGTATC-3'

14-3-3 FOR: 5'-GATCTCTGGAAGTTCTGTTCCAG-3'

L'isoforma ζ è stata clonata all'interno del plasmide pEBG in modo differente rispetto alle altre isoforme e per questo motivo è necessario utilizzare un primer *forward* diverso che va ad appaiarsi con il sito di taglio per *BamHI*.

14-3-3 zeta FOR: 5'-GTTCCGCGT **G** **GATCC** **ATG** GATAAAAATGAGC-3'

Primers per l'inserimento di un sito di riconoscimento per l'enzima *NdeI* negli inserti contenenti i cDNA delle 7 isoforme.

Isoforma η

Sequenza templatato: 5'- **G** **GATCC** **ATG** GGGGACCGGGAGCAG -3'

Primer forward: 5'-GGT **CA** **TATG** **ATG** GGGGACCGGGAGCAG -3'

Isoforma ζ

Sequenza templatato 5'- **G** **GATCC** GATAAAA **ATG** AGCTGGTTCAGAAGG- 3'

Primer forward: 5'-GGT **CA** **TATG** **ATG** AGCTGGTTCAGAAGG- 3'

Isoforma γ

Sequenza templatato: 5'- **G** **GATCC** **ATG** GTGGACCGCGAGC- 3'

Primer forward: 5'-GGT **CA** **TATG** **ATG** GTGGACCGCGAGC- 3'

Isoforma θ

Sequenza templatato: 5'- **G** **GATCC** **ATG** GAGAAGACTGAGCTG- 3'

Primer forward: 5'-GGT **CA** **TATG** **ATG** GAGAAGACTGAGCTG- 3'

2.9 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR è una tecnica che consente l'amplificazione in vitro di specifici segmenti di DNA mediante l'utilizzo di due oligonucleotidi (primers) che ibridizzano con le regioni fiancheggianti di una sequenza di DNA bersaglio. Grazie a questa tecnica sarà possibile mutagenizzare il plasmide pET-28a+, amplificare gli inserti necessari al clonaggio e per controllare il loro inserimento nei plasmidi presenti all'interno di colonie batteriche trasformate.

2.9.1 PCR mutagenica

Questo tipo di PCR è stata utilizzata per inserire un sito di restrizione per l'enzima *BamHI* all'interno del plasmide pET-28a+ con l'ausilio di *primers* contenenti al loro interno la sequenza di riconoscimento per l'enzima.

Mix di reazione :

- 40µl acqua mQ sterile
- 5µl Buffer Pfu 10X
- 1µl dNTPs 10mM
- 1,25 µl Primer FOR 10µM
- 1,25 µl Primer REV 10µM
- 5ng di DNA templato
- 1µl Pfu pol (proof reading)

50 µl di soluzione totale

Temperature raggiunte dal termociclatore durante la reazione:

1 minuto a 95°C per la denaturazione iniziale della doppia elica

30 secondi a 95°C per la denaturazione

1 minuto a 55°C per l'annealing dei primers

6 minuti a 72°C per l'estensione

} 16 cicli

10 minuti a 72°C per il completamento di tutti i frammenti

2.9.2 PCR per lo screening di colonie

Nella reazione vengono utilizzati dei primers capaci di legarsi alla regione del promotore T7 e di amplificare una regione comprendente l'inserto qualora si fosse inserito.

Mix di reazione : 11,4 µl Acqua mQ sterile
1,5µl Buffer 10X
0,9 µl MgCl₂ 25mM
0,3µl dNTPs 10mM
0,3 µl Primer T7long FOR 10µM
0,3 µl Primer T7long REV 10µM
Come templato, alcune cellule di una colonia
0,3µl Taq pol

15 µl di soluzione totale

Temperature raggiunte dal termociclatore durante la reazione:

1 minuto a 95°C per la denaturazione iniziale della doppia elica

30 secondi a 95°C per la denaturazione che si ripeterà ad ogni ciclo

30 secondi a 65°C per l'annealing dei primers

1 minuti a 72°C per l'estensione

} 25 cicli

10 minuti a 72°C per il completamento di tutti i frammenti

2.9.3 PCR per l'amplificazione degli inserti

PCR utilizzata per amplificare le sequenze codificanti le 14-3-3 a partire dai plamidi pEBG

Mix di reazione : 15,75µl Acqua mQ sterile
2,5µl Buffer Pfu 10X
0,5µl dNTPs 10mM
0,75µl Primer FOR 10µM
0,75µl Primer REV 10µM
5 ng di templato
0,5µl Pfu pol (prof reading)

25 µl di soluzione totale

Temperature raggiunte dal termociclatore durante la reazione:

1 minuto a 95°C per la denaturazione iniziale della doppia elica

30 secondi a 95°C per la denaturazione
30 secondi a 60°C per l'annealing dei primers
1,5 minuti a 72°C per l'estensione

} 25 cicli

10 minuti a 72°C per il completamento di tutti i frammenti

2.10 Elettroforesi su gel di agarosio

Questa tecnica permette di separare frammenti di DNA o di RNA in base alla loro capacità di migrare attraverso la trama di un gel di agarosio posto all'interno di un campo elettrico. Gli acidi nucleici sono infatti dotati di una carica negativa che conferisce loro la possibilità di muoversi verso la carica positiva del campo elettrico in cui vengono a trovarsi. A seconda delle dimensioni e del grado di superavvolgimento che posseggono, i frammenti migreranno a velocità diverse disponendosi in bande precise. E' possibile utilizzare percentuali di agarosio e tamponi differenti, a seconda delle dimensioni che si vogliono discriminare. Questa tecnica, nell'ambito dei clonaggi, viene utilizzata per verificare la digestione enzimatica del DNA e perché permette, dopo una digestione, di poter estrarre, grazie a specifici kits, il DNA presente in una banda. I gel che sono stati utilizzati avevano una concentrazione di agarosio dell'1% e sono stati fatti correre in tampone TAE 1X (TAE Buffer: 0.04 M Tris-Acetato; 0.001 M EDTA; pH 8.0) A seconda della dimensione del frammento di DNA in esame sono stati utilizzati pesi differenti. In particolare sono stati utilizzati DNA *ladder* (Promega) da 1Kb e da 100bp (**Fig.16**).

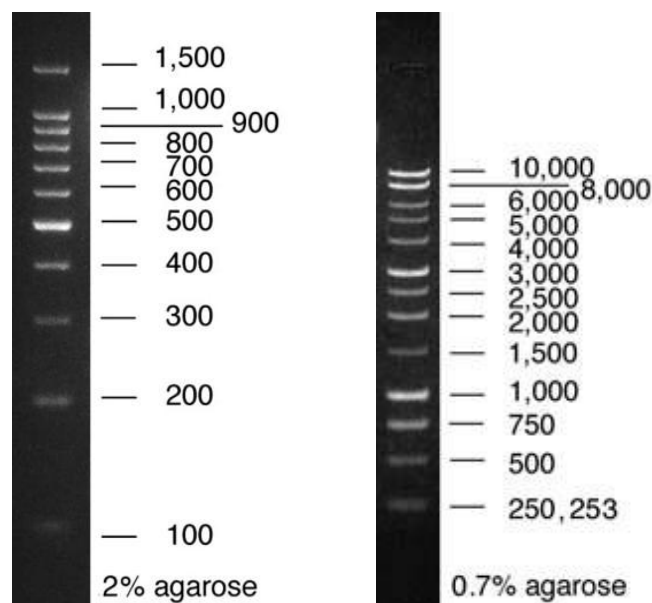


Fig.16 Pesi di riferimento utilizzati nelle elettroforesi su gel di agarosio. La figura a sinistra raffigura i ladder da 100bp, mentre quella a destra quelli da 1Kbp

2.11 Digestione enzimatica del DNA

Per poter effettuare dei clonaggi è necessario poter tagliare le sequenze di DNA in modo preciso e univoco. Per fare ciò sono stati utilizzati i seguenti enzimi di restrizione:

ENZIMA	SITO DI RICOSCIMENTO
<i>BamHI</i>	G▼GATCC CCTAG▲G
<i>NotI</i>	GC▼GGCCGC CGCCGG▲CG
<i>NdeI</i>	CA▼TATG GTAT▲AC

La miscela di reazione per il loro funzionamento comprendeva 4 componenti: il DNA, la cui concentrazione varia a seconda della resa della purificazione, l'enzima (in cui 1 unità è considerata la quantità di enzima necessaria a digerire 1µg di DNA), il buffer 10X ,specifico per ogni enzima, che va diluito fino alla concentrazione di 1X, e infine l'acqua mQ sterile utilizzata per portare a volume la soluzione (la digestione del vettore è stata eseguita in un volume di 50µl mentre quella degli inserti in 35µl). Tutti questi enzimi operano ad una temperatura di 37°C e possono essere inattivati tramite riscaldamento a 65°C.

2.12 Defosforilazione del vettore

Dopo la digestione del vettore, per ridurre la possibilità che esso possa richiudersi su sé stesso al momento della ligazione, è necessario defosforilare la sua estremità 5'. In assenza del gruppo fosfato la ligasi non sarà più in grado di legare le due estremità digerite. Soltanto in presenza di un inserto con l'estremità 5' fosforilata sarà possibile la richiusura del vettore. Per defosforilare il vettore è stata utilizzata una fosfatasi alcalina termosensibile (Promega). Il plasmide digerito va lasciato incubare con la fosfatasi per 4 ore a 37°C. Al termine del processo l'enzima va disattivato ponendo la provetta a 60°C per 20 minuti.

Mix di reazione: 4µg di DNA
 2µl di fosfatasi alcalina termosensibile (TSAP)
 4µl di TSAP buffer 10X
 Acqua mQ sterile

40 µl di soluzione totale

2.13 Ligazione fra vettore e inserto

Per poter inserire l'inserto all'interno del vettore digerito e defosforilato, è stata adoperata una DNAligasi, un enzima che all'interno della cellula ha il compito di riparare le rotture nei filamenti di DNA. In particolare, l'enzima qui utilizzato è la T4 DNA ligasi (Promega).

Per effettuare la ligazione fra vettore e inserto sono stati usati dei rapporti calcolati con la formula:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng plasmide} \cdot \text{Kb inserto}}{\text{Kb plasmide}} \cdot X$$

Dove il X rappresenta il rapporto fra i frammenti di inserto e i frammenti di vettore in soluzione. Per ogni tentativo di ligazione è stato impiegato normalmente un rapporto 5:1. La miscela di reazione utilizzata è composta da vettore, inserto, acqua mQ sterile, T4DNA ligasi e da un buffer10X specifico per la ligasi diluito alla concentrazione di 1X.

Parallelamente alla reazione di ligazione, viene eseguita anche un'autoligazione, ovvero un controllo in cui non è stato inserito l'inserto nella miscela di reazione, per vedere quanto è stata efficace la defosforilazione del vettore.

2.14 Prove di espressione

Ogni isoforma, trasformata in cellule competenti BL21, è stata inoculata in 150ml di terreno LB. Raggiunta un OD₆₀₀ di 0,7 la coltura è stata indotta con IPTG 500µM ed è stata suddivisa e posta a temperature differenti (18°C, 30°C e 37°C). Dal momento dell'induzione, ogni ora vengono effettuati dei prelievi per verificare l'andamento dell'espressione, misurando l'OD₆₀₀ e pellettando una quantità costante di batteri utilizzando la formula $X = 1/\text{OD}_{600} \cdot 500$ dove X rappresenta i µl di coltura da pellettare.

Dopo 5 prelievi la coltura è lasciata crescere over night prima di effettuare l'ultimo. La coltura rimanente viene lisata e centrifugata per separare il pellet dal surnatante. Tutti i campioni vanno poi preparati per essere fatti correre in gel di acrilamide al 13%.

2.15 Cromatografie tramite FPLC

La *Fast protein liquid chromatography (FPLC)* è una tecnica che permette, grazie all'utilizzo di colonne con diversi tipi di resine, di separare le differenti proteine presenti in una soluzione. L'isolamento della molecola può avvenire in base al suo peso molecolare, in base alla sua carica, o in base alla presenza di particolari "tag" inseriti ad una sua estremità. Lo strumento utilizzato (*AKTA purifier GÈ Healthcare*) per questo tipo di tecnica è costituito essenzialmente da due pompe,

da uno spettrofotometro (lo strumento in dotazione ha una lampada che emette a 280nm), da una valvola per regolare il percorso dei flussi all'interno dell'apparecchio, da una *loop* di tubo capillare per l'inserimento di precise quantità di soluzione e da colonne di diverso tipo a seconda della tecnica cromatografica che si deve utilizzare (**Fig.17**) La presenza di due pompe è necessaria in alcuni tipi di cromatografie per generare un gradiente fra la soluzione di flusso (o di caricamento) e la soluzione di eluizione per fare in modo che la proteina venga eluita dalla colonna.

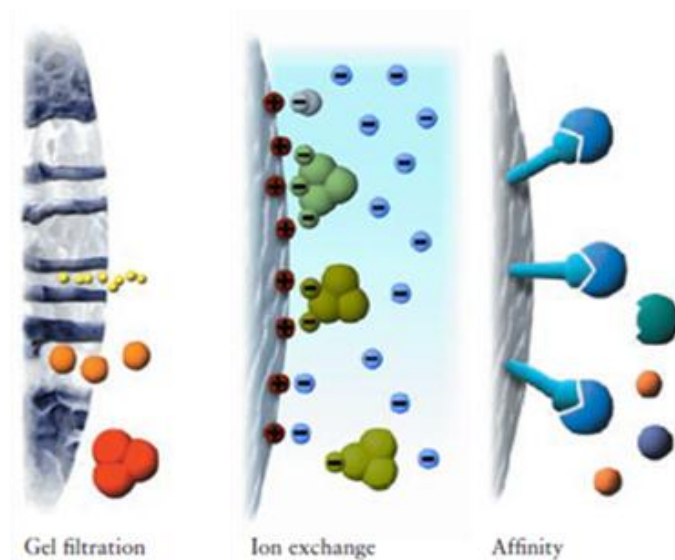


Fig.17 Rappresentazione del principio di funzionamento dei tre tipi di cromatografie utilizzate, ovvero: gel filtrazione, cromatografia a scambio ionico e per affinità.

2.15.1 Cromatografia a scambio anionico

Questa tecnica cromatografica, utilizzata per la purificazione dell' α -sinucleina, si basa sull'utilizzo di una colonna a scambio anionico (Resource Q-Amersham Pharmacia) che permette di separare le molecole in base alla differenza della loro carica netta superficiale. La matrice della colonna Resource Q in dotazione è composta da polistirene/divenil benzene a cui sono stati legati gruppi carichi positivamente. In particolare viene utilizzato l'ammonio quaternario come scambiatore anionico forte. Si usa un buffer di corsa (Tris-HCl) con 2 unità di pH sopra il punto isoelettrico (pI) della proteina *target*.

2.15.3 Cromatografia IMAC

I cDNA delle 7 isoforme di 14-3-3 sono stati clonati in successione ad una sequenza codificante una coda di istidine (His-tag). Questo *tag* permette un elevato grado di purificazione della proteina, grazie alla sua proprietà di legare

con alta affinità metalli immobilizzati sulla matrice di una colonna. Questa tecnica cromatografica denominata IMAC, *Immobilized metal ion affinity Chromatography*, è realizzata con l'utilizzo di una colonna pre-impacchettata (HisTrap IMAC HP) e con una matrice di sefarosio funzionalizzata con gruppi chelanti caricati con ioni Ni^{2+} . Il sistema e la colonna sono equilibrati con Tampone 20 mM Na_3PO_4 pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazolo. L'eluizione della proteina con l'His-tag avviene con un gradiente lineare di imidazolo.

2.15.3 Cromatografia ad esclusione molecolare

Questo tipo di cromatografia, chiamata anche gel filtrazione, permette di separare le proteine in base alle loro dimensioni e alla loro forma. Per compiere questa separazione vengono utilizzate colonne che possono avere al loro interno diversi tipi di materiali porosi. Questo comporta che le proteine con dimensioni maggiori rispetto ai pori possano eluire velocemente passando negli spazi interstiziali della resina, mentre le molecole più piccole, essendo in grado di passare attraverso i pori, vengono rallentate ed eluiscono successivamente. La colonna utilizzata per la purificazione delle 14-3-3 è la Superdex 75 10/300 GL, capace di separare proteine con dimensioni comprese fra 3kDa e 70kDa. Questa colonna, avendo un volume di 24ml diluisce notevolmente le proteine. Per questo motivo, è necessario caricare non più di 500 μl di campione concentrato.

2.16 Precipitazione con ammonio solfato

Uno dei metodi più semplici per effettuare una parziale separazione di proteine, sfrutta la loro diversa solubilità in soluzioni concentrate di sali. Il sale più usato a questo scopo è l'ammonio solfato, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, molto solubile e capace di non denaturare le proteine. Conoscendo la concentrazione salina a cui la proteina d'interesse precipita, è possibile aggiungere il sale alla soluzione fino ad arrivare in prossimità di quella concentrazione. In questo modo, dopo una fase di centrifugazione, la proteina d'interesse, ancora solubile, si troverà nel surnatante mentre tutte quelle con solubilità inferiore si troveranno nel pellet. Nel processo di purificazione dell' α -sinucleina è stata compiuta una prima fase di precipitazione utilizzando una concentrazione di ammonio solfato del 33% per ottenere una parziale eliminazione dei contaminanti, ed una seconda fase di precipitazione al 55% per far precipitare e poter recuperare l' α -sinucleina.

2.17 Utilizzo dei tubi da dialisi

I tubi da dialisi sono costituiti da una membrana semipermeabile capace di lasciar permeare solamente molecole al di sotto di una certa dimensione. Per i nostri esperimenti sono stati utilizzati tubi con un *cut-off* di 3500Da. Prima di utilizzare i tubi è necessario effettuare alcuni lavaggi, in modo da eliminare impurità e residui di metalli dovuti alla produzione del tubo stesso. Come prima cosa i tubi vanno fatti bollire per 10 minuti in una soluzione contenente il 2% di sodio bicarbonato e 1mM di EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) a pH 8. Successivamente vanno sciacquati con acqua deionizzata e fatti nuovamente bollire in un becker in una soluzione contenete solamente EDTA 1mM pH 8. A questo punto, una volta che la soluzione si è raffreddata, i tubi, sempre all'interno del becker, possono essere conservati a 4°C.

2.17.1 Sostituzione di un tampone e rimozione di un sale

Per sostituire un tampone nel quale è stata disciolta una proteina o per rimuovere un sale aggiunto in una fase della purificazione, è sufficiente trasferire il campione in un tubo da dialisi, chiudere le estremità del tubo e immergerlo in un becker in agitazione con il nuovo tampone. A seconda della concentrazione del sale da eliminare o del volume di soluzione presente all'interno del tubo, saranno necessari diverse sostituzioni del tampone all'interno del becker.

2.17.2 Concentrazione di una proteina con l'ausilio di PEG

I tubi da dialisi possono essere utilizzati anche per concentrare una proteina. Per fare ciò, bisogna ricoprire il tubo, nel quale è stata trasferita la soluzione contenente la proteina, con uno strato di glicole polietilenico (PEG), un polimero sotto forma di scaglie, capace di assorbire il tampone attraverso la membrana. Prima che la proteina venga completamente disidratata, la soluzione va rimossa dal tubo utilizzando una pipetta Pasteur in vetro.

2.18 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)

Nell'elettroforesi su gel di poliacrilammide le proteine vengono denurate dall'aggiunta del detergente sodio dodecil solfato (SDS). Le molecole anfifiliche come l'SDS interferiscono con le interazioni idrofobiche che normalmente stabilizzano le proteine. Queste legano il detergente in un rapporto di circa 1,4 g di SDS per grammo di proteina e perciò la loro carica intrinseca viene mascherata dalla grande carica negativa assunta per effetto del legame con l'SDS. I campioni prima di essere caricati nel gel, devono essere diluiti in *SDS gel-loading buffer*

(che consente una preliminare denaturazione delle proteine e la riduzione di eventuali ponti di solfuro) ed essere fatti bolliti per 10 minuti. In questo modo le proteine vengono ad avere una forma e un rapporto carica/massa pressoché simile e di conseguenza la separazione attraverso il gel avviene in base alla loro massa. Per l'analisi delle 14-3-3 sono stati utilizzati gel preparati al momento con una percentuale di acrilamide del 13% mentre per LRRK2 sono invece stati utilizzati precast gel (BioRad) a gradiente con una concentrazione di acrilamide 4-20%.

4X SDS sel-loadins buffer:

Tris-HCl pH 6.8 200 mM
 Ditiotreitolo (DTT) 400 mM
 SDS 8% (w/v)
 Blue di Bromofenolo 0.4% (w/v) .
 Glicerolo 40% (w/v)

Tampone di corsa:

Tris base (25 mM)
 Glicina (pH 8.3) (250 mM)
 SDS 0.1% (w/v)

Pesi di riferimento utilizzati

Per poter identificare le proteine sulla base del loro peso molecolare viene caricata in SDS-PAGE una miscela commerciale di pesi di riferimento della Bio-Rad (Fig.18).

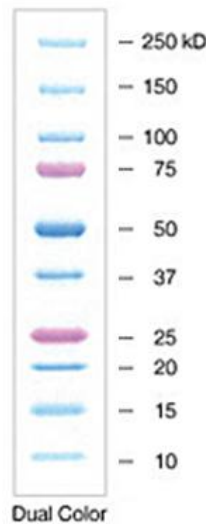


Fig.18 Precision Plus Protein dual extra standards (Bio-Rad)

2.19 Colorazione al blu di Comassie

Per poter vedere le proteine in un SDS-PAGE è necessario prima incubare il gel per un'ora in una *staining solution*, una soluzione al blu di Comassie, e successivamente compiere dei lavaggi utilizzando una *destaining solution* in modo da decolorare tutte quelle parti in cui non sono presenti proteine.

Staining solution

1% w/v Brillant Blu R
 40% v/v etanolo
 50% v/v acqua deionizzata

10% v/v acido acetico

Destaining solution

10% v/v etanolo
 10% v/v isopropanolo

2.20 Liofilizzazione di proteine

Dopo aver purificato una proteina, è possibile liofilizzarla in modo da poterla conservare per lunghi periodi a -20°C . Il processo di liofilizzazione è composto da due fasi: il congelamento e la sublimazione. Per prima cosa bisogna trasferire la soluzione contenente l' α -sinucleina in un pallone di vetro che verrà posto all'interno di un contenitore con azoto liquido così che la soluzione venga congelata istantaneamente. L'estremità del pallone verrà poi fissata ermeticamente ad una pompa a vuoto in modo che l'acqua contenuta nella soluzione ghiacciata, in presenza del vuoto spinto sublimi lasciando la proteina completamente disidratata.

2.21 Dicroismo circolare

Sostanze chirali sono in grado di assorbire in maniera differente le componenti, levogira e destrogira di una luce polarizzata che le attraversa. Questo fenomeno si chiama dicroismo circolare (CD) ed il principio che permette di poter distinguere, grazie ad uno spettropolarimetro (J-710 Jasco), la struttura secondaria delle proteine. Lo strumento fornisce uno spettro con una forma caratteristica a seconda che le proteine siano in α -elica, in β -sheet o in *random coil* (**Fig.19**).

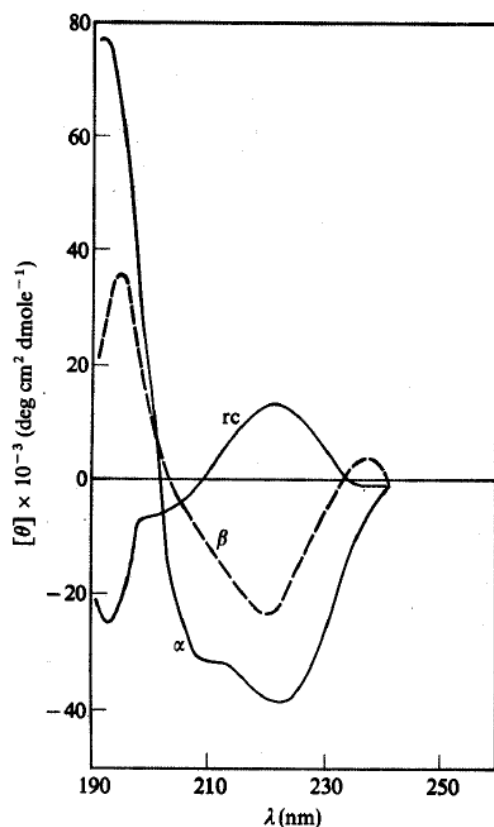


Fig.19 Spettri CD caratteristici di proteine con struttura secondaria ad α -elica (α), β -sheet (β) o in *random coil* (*rc*).

2.22 Western Blot

Il western blot è una procedura che permette di trasferire le proteine da un gel di poliacrilamide ad una membrana di nitrocellulosa, o di polivinilidene fluoride (PVDF). Per il trasferimento delle proteine sulla membrana è stato assemblato un “*sandwich*” composto da una spugna, da un foglio di carta da bancone, dalla membrana in PVDF, equilibrata in metanolo e in un tampone di trasferimento (48mM Tris, 39mM Glicina, 0,037% w/v SDS, 2% v/v metanolo), dal gel, da uno strato di carta e da un'altra spugna. Il tutto, caricato su un supporto, e immerso nel tampone di trasferimento, va introdotto all'interno di un apparecchio (Bio-Rad) dotato di due elettrodi. Il campo elettrico che verrà generato farà in modo che le proteine, a causa del legame con l'SDS, si trasferiscano dal gel alla membrana. Dopo aver tenuto l'apparecchio per 90 minuti a 100V, le proteine si saranno trasferite sulla membrana. A questo punto è necessario saturare i domini idrofobici della membrana rimasti ancora disponibili per il legame con le proteine utilizzando una soluzione contenente latte in polvere (10% w/v latte in polvere, 50mM Tris pH 7,4, 150mM NaCl, 0,1% Tween). In questo modo è possibile utilizzare degli anticorpi per verificare la presenza di proteine. Per fare ciò è necessario aggiungere alla soluzione contenente latte l'anticorpo primario specifico per la proteina d'interesse e lasciare incubare la soluzione sulla membrana per un'ora in agitazione. Dopo aver effettuato 5 lavaggi con TTBS (50mM Tris pH 7,4, 150mM NaCl, 0,1% Tween), è necessario aggiungere un anticorpo secondario coniugato con una perossidasi, un enzima che, in presenza di uno specifico substrato, genera della luce. L'anticorpo secondario essendo in grado di legare l'anticorpo primario, permetterà, dopo l'aggiunta dello substrato della perossidasi, l'individuazione della proteina con l'utilizzo di una lastra fotografica (Biomax film, Kodak). La lastra, rimasta in esposizione al buio sopra la membrana per un tempo variabile, a seconda della quantità di proteina o della sensibilità dell'anticorpo, va trasferita prima in una soluzione di sviluppo, fino alla comparsa delle bande, e poi in una soluzione di fissaggio. In alcuni casi l'anticorpo primario può essere direttamente coniugato alla perossidasi.

Gli anticorpi usati in questi tesi sono:

- Anticorpo primario anti His-Tag sviluppato in coniglio (Sigma)
- Anticorpo primario contro tutte le isoforme di 14-3-3 sviluppato in coniglio (Santa Cruz)
- Anticorpo primario anti pSer910 di LRRK2 sviluppato in coniglio (Epitomix)
- Anticorpo primario anti pSer935 di LRRK2 sviluppato in coniglio (Epitomix)

- Anticorpo primario contro la subunità catalitica della PKA sviluppato in coniglio (Cell Signaling)
- Anticorpo primario anti α -flag coniugato alla perossidasi di rafano(Sigma)
- Anticorpo secondario anti rabbit (Sigma)

2.23 Espressione e purificazione di 14-3-3

Per l'espressione e la purificazione delle 14-3-3 (**Fig.20**) si deve diluire una precoltura di cellule BL21, trasformate con il plasmide codificante per la 14-3-3 d'interesse, in terreno LB con kanamicina 25 $\mu\text{g/ml}$. Quando la coltura, posta in agitazione a 37°C ha raggiunto un OD₆₀₀ di 0,7-0,8 si induce l'espressione della proteina con 500 μM IPTG lasciando procedere l'induzione *over night* a 37°C. In seguito si centrifuga la coltura per 10minuti a 6000g in modo da recuperare le cellule e le si risospende in 10ml di tampone A. Al campione vanno poi aggiunti PMSF 100mM ed un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma) entrambi diluiti 1:100. A questo punto è possibile rompere le cellule tramite 4 cicli di French Press e centrifugare il lisato per 30-60 minuti a 12000g a 4°C. Il surnatante ottenuto va caricato su colonna IMAC a *nichel affinity* per poi eluire la proteina con un gradiente lineare di 20 minuti da 20 a 300 mM imidazolo. Successivamente il campione va dializzato per 4 ore contro 500ml di PBS (che va sostituito dopo 2 ore), per eliminare l'imidazolo. A questo punto il campione va concentrato con PEG e successivamente incubato con trombina (Sigma) *over night* a 25°C in modo da tagliare l'*His-tag*. Il campione deve essere ora ricaricato in colonna IMAC per rimuovere le code di istidine digerite. Questa volta la proteina uscirà subito nel *flow-through*. L'eluato va quindi concentrato nuovamente con PEG e caricarlo in gel filtrazione (Superdex 75) in PBS. Infine, dopo aver quantificato la proteina, si aggiunge DTT, ad una concentrazione finale di 2mM, e si aliquota il campione in provette che verranno poi congelate in azoto liquido e conservate a -80°C .

Tamponi utilizzati per la purificazione delle 14-3-3

Tampone A

20mM Sodio Fosfato
500mM NaCl
20mM imidazolo

Tampone B

20mM Sodio fosfato
500mM NaCl
500mM Imidazolo

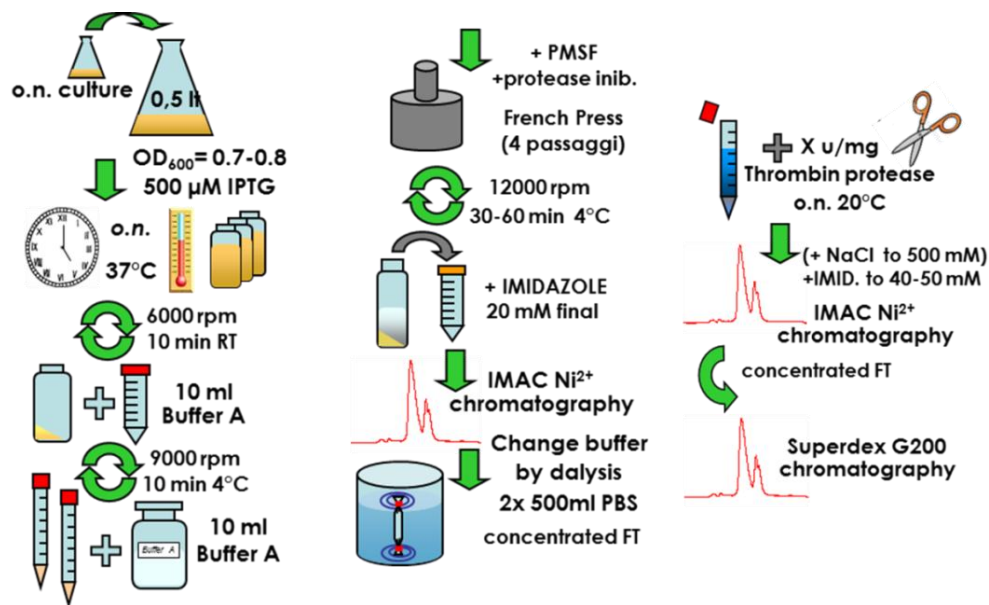


Fig.20 Rappresentazione schematica del protocollo di purificazione delle 14-3-3

2.24 Espressione e purificazione di α -sinucleina

Per la purificazione dell' α -sinucleina (Fig.21) è necessario diluire circa 100 volte una precultura fatta crescere *over night* di cellule BL21, trasformate con il plasmide codificante per l' α -sinucleina, in terreno LB con kanamicina 25 μ g/ml. Quando la coltura, lasciata crescere a 37°C in agitazione, ha raggiunto un OD₆₀₀ di 0,3-0,4, va indotta l'espressione della proteina con 100 μ M IPTG. Dopo 5 ore i batteri vanno precipitati in centrifuga a 6000g per 10minuti e successivamente risospesi delicatamente in *Osmotic Shock Buffer* (100 ml per il pellet di 1 l di coltura). Dopo aver lasciato la coltura ad incubare a temperatura ambiente per 10 minuti si precipitano nuovamente i batteri a 9000 g per 10 minuti a 4°C. In seguito si aggiunge acqua deionizzata fredda (90 ml per il pellet di 1 l di coltura) e si aggiunge MgCl₂ saturo (37.5 μ l per 90 ml di soluzione). Il pellet va risospeso delicatamente in ghiaccio e va lasciato ad incubare per 3 minuti. A questo punto si centrifuga il campione a 9000 g per 15-20 minuti a 4°C per poi rimuovere il surnatante che andrà aggiustato con tampone Tris pH 8 fino ad una concentrazione di 20 mM (2 ml di Tris 1 M + 8 ml di acqua per portare a 100 ml la soluzione). Si fa successivamente bollire il campione per 10-15, lo si lascia raffreddare e lo si centrifuga. Al surnatante che è stato ottenuto, va aggiunto (molto lentamente, lasciando il campione in agitazione in ghiaccio) ammonio solfato fino ad una concentrazione finale del 35%. In questo modo si otterrà la precipitazione di tutti i contaminanti con idrofobicità superiore a quella dell' α -sinucleina. Dopo aver centrifugato il campione a 12000g per 20 minuti a 4°C, si aggiunge nuovamente ammonio solfato al surnatante fino ad una concentrazione

finale del 55%. A questo punto si centrifuga il campione a 12000g per 20 minuti a 4°C per poi eliminare il surnatante e risospendere il pellet in un volume di 5-10ml. Ora, è necessario eliminare il sale dializzando il campione *over night* contro tampone 20mM Tris pH8 e centrifugare la soluzione a 12000g per 20 minuti a 4°C. Dopo averlo filtrato il campione questo va purificato con l'utilizzo di una colonna a scambio anionico (Resource Q – Ge Healthcare), eluendo la proteina con un gradiente lineare di NaCl di 1 ora da 0 a 500mM. Infine, prima di procedere con la liofilizzazione della proteina, la soluzione va dializzata per eliminare il sale.

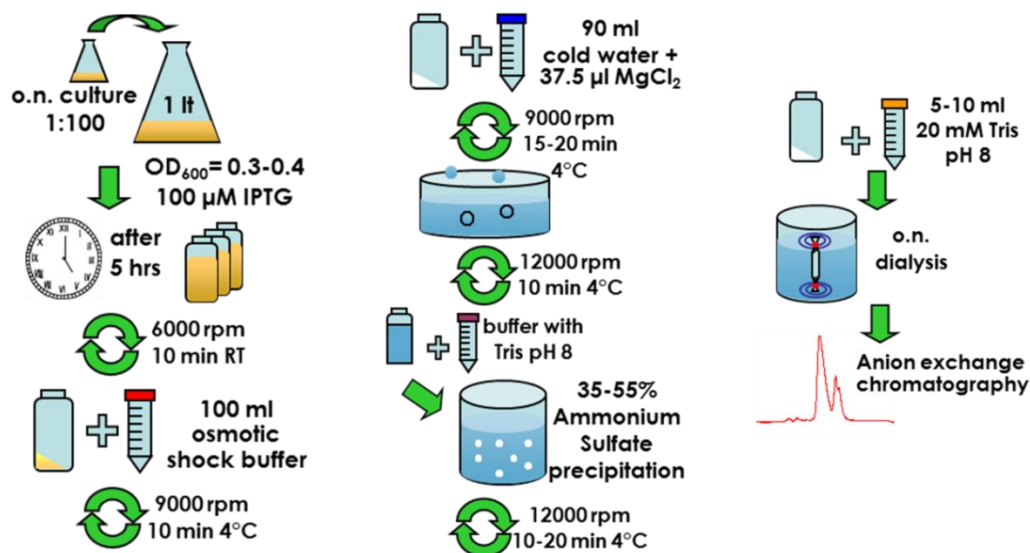


Fig.21 Rappresentazione schematica del protocollo di purificazione dell' α -sinucleina

2.25 Colture cellulari

2.25.1 Terreni per le linee cellulari

- **DMEM:** Dulbecco modified Eagle Medium (GIBCO) +FBS 10% (fetal bovin serum) + Penstrep loox (PEN-Penicilin/streptomycin, Invitrogen) – 100 U/ml, Strep – 100ng/ml). Utilizzato per la crescita cellulare.
- **OPTIMEM:** Reduced serum media (GIBCO). Utilizzato per la transfezione cellulare.

2.25.2 Linea cellulare HEK293T

La linea cellulare HEK293T proviene da cellule embrionali renali umane ed è stata sviluppata in Olanda alla fine degli anni settanta. Queste cellule sono molto utilizzate in ricerca in quanto sono facilmente transfettabili con costrutti per la produzione di proteine ricombinanti. Queste cellule sono state utilizzate per l'espressione e la purificazione di LRRK2 e dei suoi mutanti. Infatti, per l'espressione di proteine di grandi dimensioni con più domini funzionali, è necessario utilizzare cellule umane, in quanto, quelle batteriche, non sarebbero in grado di assemblare l'intera proteina e di compiere le modifiche post-traduzionali necessarie al suo funzionamento.

Le HEK293T sono state coltivate a 37°C, con il 5% di CO₂, in terreno Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM). Le cellule sono state fatte crescere in monostrato su fiasche da 150cm², e su piastre con diametro di 15cm (BD Falcon). Raggiunta la confluenza, dopo aver tolto il terreno, lavato delicatamente le cellule con PBS (buffer salino di fosfato senza calcio e magnesio, pH 7,4) e averle staccato utilizzando tripsina1X (trypsin-EDTA solution, Gibco), le cellule vengono in parte trasferite in una nuova fiasca con nuovo terreno. Tutte queste operazioni vengono eseguite in ambiente sterile, sotto una cappa aspirante a flusso laminare.

2.26 Espressione e purificazione di LRRK2

2.26.1 Transfezione transiente di cellule HEK293T

Le cellule HEK293T possono venir transfettate con DNA plasmidico attraverso l'uso di polietilenimide (PEI), un polimero cationico capace formare complessi con il DNA. Questi, una volta all'interno di endosomi, grazie alla loro carica positiva, fanno permeare all'interno ioni cloro e acqua fino alla rottura dell'endosoma. In questo modo il DNA entrato nella cellula viene rilasciato nel citoplasma.

Il complesso DNA-PEI è stato preparato unendo 1ml di una prima soluzione contenente terreno OPTIMEM e plasmide ricombinante, con 1ml di una seconda soluzione costituita da OPTIMEM e una soluzione 1g/l di PEI. Il rapporto tra DNA e PEI utilizzato è di 1:2. Ciascuna soluzione è stata lasciata ad incubare singolarmente per 5 minuti prima di essere unita all'altra. La miscela DNA-PEI ottenuta, va lasciata ad incubare per altri 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente si trasferiscono le cellule in una piastra da 150 mm al 25% di confluenza. Qui verrà aggiunta la miscela per la transfezione e infine 15ml di terreno DMEM. Prima che le cellule internalizzino il plasmide e producano la proteina ricombinante sono necessarie 48 ore, al termine delle quali è possibile procedere con la lisi.

2.26.2 Lisi cellulare

Prima di procedere con la lisi delle cellule, è necessario rimuovere il terreno, lavarle con PBS e trasferirle in provette da 2ml. Dopo aver aggiunto degli inibitori di proteinasi (Sigma) va aggiunto un buffer di lisi contenente 20mM, Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Tween, 2,5mM sodio pirofosfato, 1mM beta-glicerofosfato, 1mM NaVO₄ che verrà lasciato a incubare per 30 minuti in ghiaccio. Successivamente le provette vanno centrifugate per 30 minuti a 4°C a 14000g.

2.26.3 Purificazione

Il surnatante, risultato della centrifugazione, va trasferito in un'altra provetta da 2ml nella quale verranno aggiunti anche 40µl di anti-flag M2 affinity gel (Sigma-Aldrich). Il campione va poi posto in agitazione *over night* in una ruota a 4°C. Il giorno successivo, la resina a cui è legata la proteina, va fatta precipitare in centrifuga a 9000g per 1 minuto e il surnatante viene eliminato. A questo punto si effettuano una serie di lavaggi con i buffer sotto riportati.

- 1) 20mM TRIS-HCl pH 7.5, 500mM NaCl, 0,5% TWEEN
- 2) 20mM TRIS-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 0,5% TWEEN
- 3) 20mM TRIS-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0,5% TWEEN
- 4) 20mM TRIS-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0,1% TWEEN
- 5) 20mM TRIS-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0,02% TWEEN

Con ciascuno di essi vanno eseguiti 2 lavaggi, aggiungendo alla resina 1ml di buffer che verrà rimosso dopo una centrifugazione. Una volta eseguito l'ultimo lavaggio, sarà possibile eluire la proteina risospesando la resina in un buffer contenente 20mM TRIS-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0,02% TWEEN e 150ng/µl di peptide 3Xflag(Sigma) e mettendola in agitazione per 30min. Dopo un ultimo passaggio in centrifuga sarà possibile recuperare la proteina dal surnatante.

2.27 Co-immunoprecipitazione

Questa tecnica permette di studiare le interazioni fra una proteina nota, che può essere fissata su un supporto solido e precipitata, ed altre proteine con cui questa è stata incubata. Grazie a questo tipo di esperimento è possibile testare l'affinità fra le diverse 14-3-3 e LRRK2 utilizzando un anticorpo anti-flag e la proteina G coniugata a delle *beads* per precipitare LRRK2.

Dopo aver incubato insieme in agitazione le 14-3-3 e LRRK2 per 2 ore, con un rapporto molare di 2:1, bisogna aggiungere ai campioni un anticorpo anti-flag, che si legherà a LRRK2 e successivamente la proteina G (GE Healthcare) coniugata

alle beads che permetterà di precipitare la proteina. A questo punto è necessario compiere alcuni lavaggi in modo da eliminare le proteine precipitate a causa di interazioni aspecifiche. Il buffer utilizzato per questi lavaggi ha una concentrazione di NaCl di 150mM, questo per non rompere anche i legami specifici fra le proteine. A questo punto i campioni vengono bolliti con l'aggiunta di 4X *SDS sel-loadins buffer* in modo da separare le proteine dalle *beads*. Dopo aver centrifugato i campioni, in modo che la resina precipitasse lasciando le proteine nel surnatante, questi sono stati caricati in un SDS-PAGE e trasferiti su membrana. Questa è stata sviluppata prima con anticorpo anti-Pan 14-3-3, in modo da poter vedere le bande relative alle 14-3-3 in input e a quelle co-immunoprecipitate, e successivamente con anticorpo anti-flag per vedere le LRRK2 in input e quella immunoprecipitata.

2.28 Saggio di aggregazione con tioflavina T (ThT)

La tioflavina T (**Fig.22**) è una molecola fluorescente capace di intercalarsi nella struttura secondaria a foglietti β delle proteine. A causa di questa sua proprietà è stata utilizzata per seguire lo sviluppo delle fibrille di α -sinucleina dotate appunto di una struttura a foglietti β .

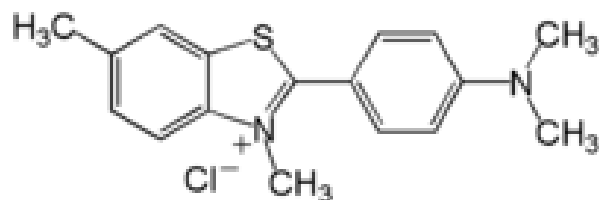


Fig.22 Struttura chimica della tioflavina T

Analizzando tramite un fluorimetro diversi campioni contenenti ThT e α -sinucleina a diversi stadi di aggregazione, si osserva che l'intensità della fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di aggregati presenti in soluzione. Questo perché la conformazione assunta dalla ThT intercalata nei foglietti beta ed una diversa distribuzione delle sue cariche, aumentano la sua capacità di emissione. Per monitorare il processo di fibrillazione dell' α -sinucleina in presenza delle 14-3-3 sono stati preparati 7 campioni contenenti le 7 isoforme di 14-3-3 e α -sinucleina, altri 7 campioni contenenti solamente le 7 isoforme (controlli negativi) e un campione contenente esclusivamente α -sinucleina (controllo positivo). Le proteine sono state incubate in rapporto 4:1; i campioni contengono 70 μ M di α -sinucleina e 17,5 μ M di 14-3-3. A tutti i campioni è stato poi aggiunto lo 0,05% g/l di Azoturo di sodio (NaN₃) per impedire la crescita microbica. Queste 15 provette da 500 μ l, contenenti 300 μ l di campione, sono state messe ad incubare a 37°C in agitazione(1000g) per 3 settimane.

A 60h, 120h, 240h e dopo 3 settimane sono state prelevate delle aliquote da 62 μ l da ciascun campione posto in agitazione. Queste sono state tutte congelate a -80°C e analizzate in seguito.

La preparazione dei campioni è stata completata aggiungendo ai 62 μ l di prelevati, 548 μ l di una soluzione 1X contenente ThT. Questa soluzione viene preparata in concentrazione 100X (2,5mM ThT, tampone fosfato 25mM a pH6). I campioni così preparati sono stati analizzati al fluorimetro, utilizzando una cuvetta da 500 μ l, come eccitazione una lunghezza d'onda di 440nm e registrando un' emissione fra i 450 e i 600nm.

3. RISULTATI

3.1 Clonaggio delle 7 isoforme di 14-3-3 umane

I cDNA delle 7 isoforme di 14-3-3 sono stati gentilmente forniti dal Prof. Dario Alessi (University of Dundee, UK) clonati in vettori pEBG per l'espressione dei costrutti in cellule di mammifero. Al fine di poter produrre una maggior quantità di proteina, è stato necessario clonare le 7 isoforme all'interno di pET-28a+, un plasmide per l'espressione in batteri (*Escherichia coli*). A questo scopo sono state utilizzate due strategie.

3.1.1 Strategia 1

Poiché le 7 isoforme di 14-3-3 erano state clonate nei vettori pEBG utilizzando l'enzima di restrizione *Bam*HI, all'estremità 5', e l'enzima *Not*I all'estremità 3' di ciascuna sequenza, nella prima strategia è stato deciso di utilizzare proprio questi due enzimi per il clonaggio. Gli inserti sono stati quindi preparati amplificando tramite PCR delle regioni più ampie rispetto alle sequenze codificanti le 14-3-3, comprendenti i siti di restrizione per *Bam*HI e *Not*I (**Fig.17**). Per completare la preparazione degli inserti è stato sufficiente digerire i frammenti e purificarli.

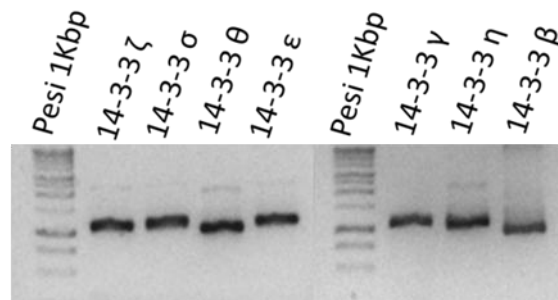


Fig.17 Elettroforesi su gel di agarosio realizzata per verificare l'amplificazione degli inserti di 14-3-3.

La preparazione del vettore è stata invece più complessa. E' stato necessario inserire, grazie ad una PCR mutagenica, un sito di taglio per l'enzima *Bam*HI nel *multiple cloning site* del plasmide pET-28a+. Quest'ultimo possedeva già tale sito ma non adiacente alla regione codificante l'His-Tag, cioè quella sequenza di 6 istidine che permette, mediante una cromatografia per affinità, di isolare la proteina ricombinante una volta espressa. Inoltre, come si può vedere dalla **Fig.18**, il plasmide pET-28a+ è dotato di un sito di taglio per la trombina posto fra l'His-Tag e il primo codone codificante la proteina inserita. Questo permette mediante una digestione enzimatica di eliminare il Tag una volta purificata la proteina.

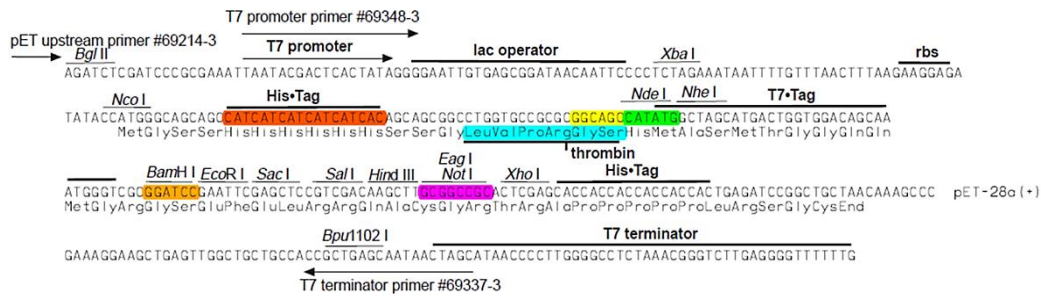


Fig.18 Regione del plasmide pET-28a+ contenente la sequenza codificante l’His-Tag(in rosso), i siti di taglio per gli enzimi BamHI(in arancione) e NotI(in viola), il sito dove andrà ad essere inserito il nuovo sito per BamHI(in giallo) e il sito di riconoscimento per la trombina (in azzurro).

Inizialmente i tentativi di mutagenizzare il vettore sono risultati inefficaci. La PCR mutagenica è riuscita solo dopo aver aumentato le dimensioni dei primers. Questo deve aver aumentato la loro capacità di annealing. In seguito alla digestione del prodotto di PCR con l’enzima *DpnI*, che taglia solo il DNA metilato di origine batterica, e quindi il template non mutagenizzato, cellule competenti DH5 α sono state trasformate. L’effettiva presenza del sito di restrizione è stata verificata tramite sequenziamento. A questo punto, il vettore mutagenizzato è stato digerito con *BamHI* e *NotI*, purificato e defosforilato in modo da ridurre la possibilità di autoligazione.

La reazione di ligazione fra inserto e vettore è stata compiuta utilizzando la T4 DNA ligasi e un rapporto inserto:vettore di 5:1. Il prodotto ottenuto, è stato usato per trasformare cellule competenti DH5 α . Solamente batteri che abbiano internalizzato un plasmide richiuso sono dotati di resistenza alla kanamicina e possono crescere sulla piastra.

Per verificare la presenza del plasmide contenente la sequenza delle 14-3-3 all’interno delle colonie cresciute in seguito alla trasformazione, è stato effettuato uno screening mediante PCR utilizzando i primers T7 in modo da poter amplificare la sequenza codificante le 14-3-3, qualora si fosse inserita, e le sue regioni fiancheggianti.. Come template di questa PCR sono state utilizzate direttamente cellule batteriche che si andranno a lisare nel primo passaggio di denaturazione della doppia elica previsto nel processo, liberando nella *mix* di reazione il DNA batterico. I prodotti amplificati, sono stati fatti correre in un gel di agarosio in modo da controllare le loro dimensioni (**Fig.19**). La dimensione calcolata della regione compresa tra i primers T7, inclusa la sequenza per le 14-3-3 inserita, è pari a circa 1200bp, quindi in base a questo, è stato possibile individuare le colonie positive.

I cloni positivi sono stati sequenziati in modo da verificare il corretto inserimento della sequenza. Con questa prima strategia è stato possibile clonare le isoforme σ , ϵ e β . Per le altre isoforme la ligazione è stata compiuta anche con rapporti inserto:vettore di 10:1 e di 3:1 senza alcun risultato.

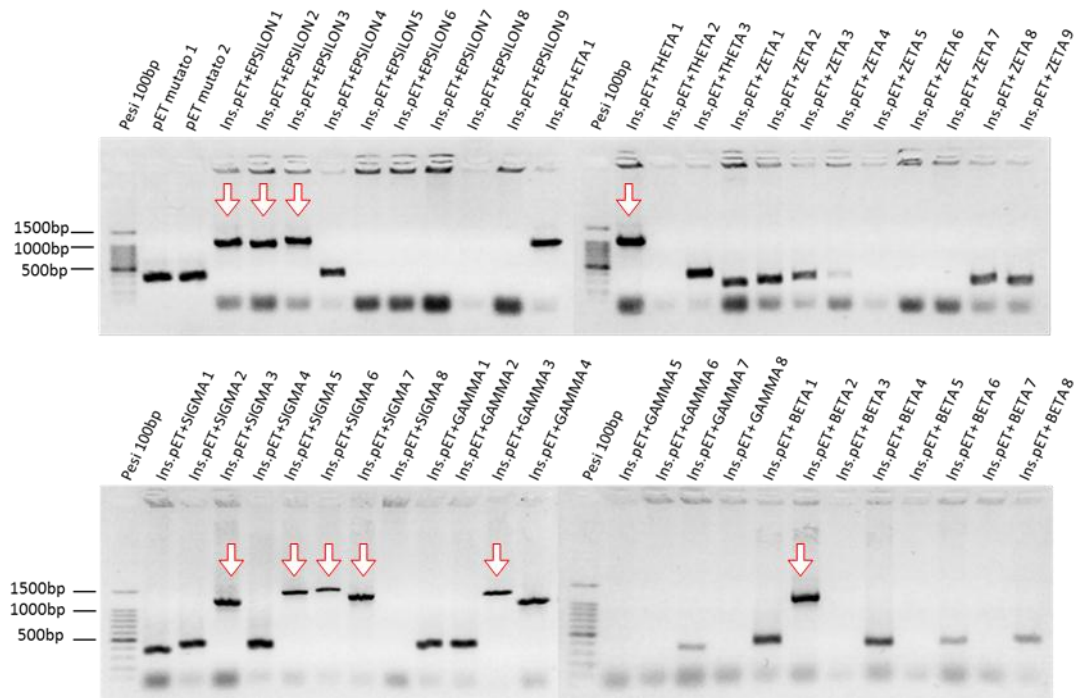


Fig.19 PCR di screening per verificare la presenza della sequenza delle 14-3-3 all'interno del vettore. Le colonie potenzialmente positive che sono state mandate a sequenziare sono indicate da una freccia rossa. Nei primi due pozzetti in alto a sinistra è stato caricato il vettore mutato non digerito come controllo negativo.

3.1.2 Strategia 2

Dato l'esito negativo del clonaggio delle isoforme η , θ , ζ e ϵ utilizzando i siti di restrizione *Bam*HI e *Not*I è stato deciso di cambiare strategia. In questo secondo tentativo è stato utilizzato direttamente il plasmide di partenza non mutagenizzato. Per il clonaggio è stato mantenuto l'enzima *Not*I al C-terminale del cDNA, mentre è stato cambiato quello all'N-terminale sfruttando la presenza del sito di restrizione per l'enzima *Nde*I presente sul pET-28a+ (**Fig.18**). Poiché il sito *Nde*I non era presente negli inserti amplificati, si è proceduto riamplicando il cDNA delle 4 isoforme a partire dal pEBG, utilizzando un primer forward contenente il sito di restrizione *Nde*I. Come primers *reverse*, comune a tutte le isoforme, è stato utilizzato lo stesso progettato per prima strategia di clonaggio, che permette di sfruttare il sito per *Not*I già presente in pEBG. Il plasmide pET-28a+ e le sequenze ottenute per amplificazione sono stati digeriti con l'enzima *Nde*I e con l'enzima *Not*I. Per la ligazione è stato utilizzato un rapporto inserto:vettore di 5:1. La presenza dell'inserto nel plasmide è stata controllata tramite PCR e le colonie positive sono state sequenziate per verificare il corretto inserimento di ciascuna isoforma. Con questa nuova strategia, le 14-3-3 ancora da clonare, ad eccezione dell'isoforma ζ , non si sono inserite con il corretto *frame*. In seguito, sono stati

preparati nuovamente gli inserti digerendo dei frammenti amplificati con primers T7, a partire dai plasmidi con le sequenze delle 14-3-3 inserite non in *frame*. Gli inserti sono stati digeriti ed è stata effettuata la ligazione mantenendo il rapporto inserto:vettore 5:1. Le colonie positive allo screening sono state sequenziate confermando il corretto inserimento delle isoforme η , θ , e ε nel vettore pET28a+.

3.2 Prove di espressione per le 14-3-3

Una volta clonate tutte le 7 isoforme di 14-3-3 nel plasmide pET-28a+, sono stati compiuti alcuni test per vedere quali fossero le migliori condizioni per la loro espressione. Questi costrutti sono stati utilizzati per trasformare cellule BL21 per l'espressione di proteine ricombinanti. Per ogni isoforma è stata testata l'espressione a tre differenti temperature prelevando dei campioni ad intervalli regolari per monitorare la produzione della proteina di interesse. L'espressione è stata condotta a diverse temperature, inferiori rispetto a quella ottimale per la crescita di *E. coli* (37°C). Questo perché, per alcune proteine, basse temperature di espressione sono necessarie per il corretto ripiegamento della catena amminoacidica e perché esse non vengano destinate ai corpi di inclusione per essere eliminate. A titolo esemplificativo sono state riportate le prove relative all'isoforma ζ (Fig.20).

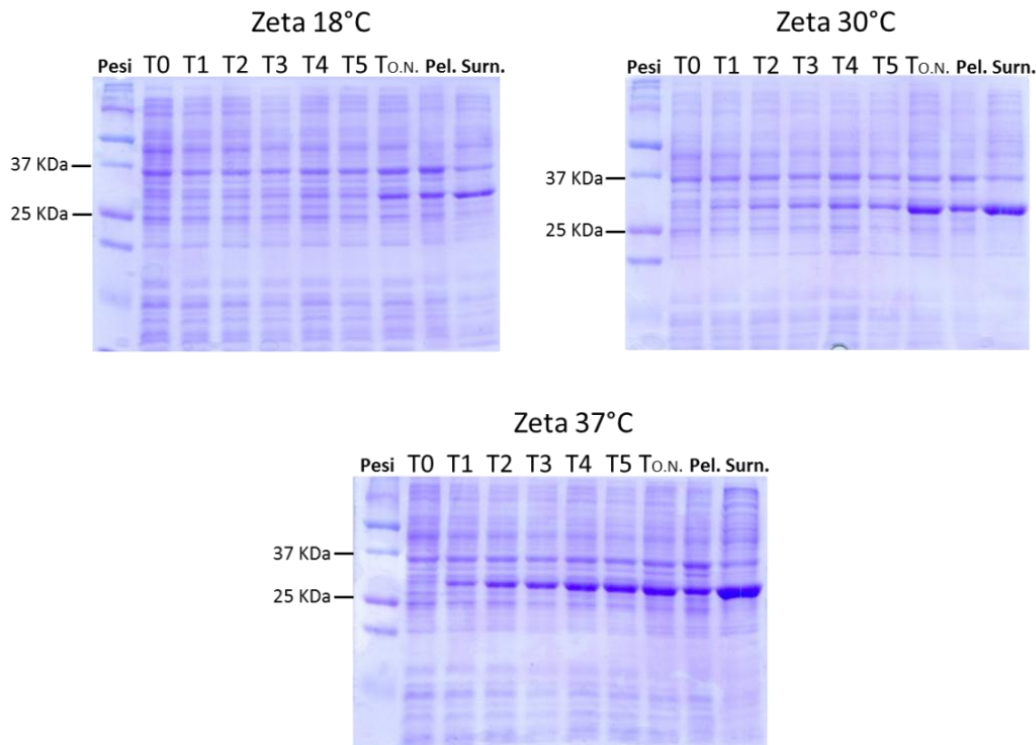


Fig.20 Prove di espressione relative all'isoforma ζ effettuate a diverse temperature (18°C, 30°C e 37°C). I campioni delle colture sono stati prelevati a intervalli regolari e le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, colorato con Blu di Comassie. Negli ultimi due pozzetti di ciascun gel sono stati caricati il pellet e il surnatante ottenuti dalla centrifugazione dei lisati batterici.

L'espressione delle altre isoforme è risultata essere comparabile alla ζ tranne per l'isoforma β . Questa rappresenta un caso particolare in quanto dall'SDS-PAGE non era possibile identificare con certezza delle bande con intensità crescente in modo proporzionale al tempo, relative alla proteina ricombinante. (**Fig.21**).

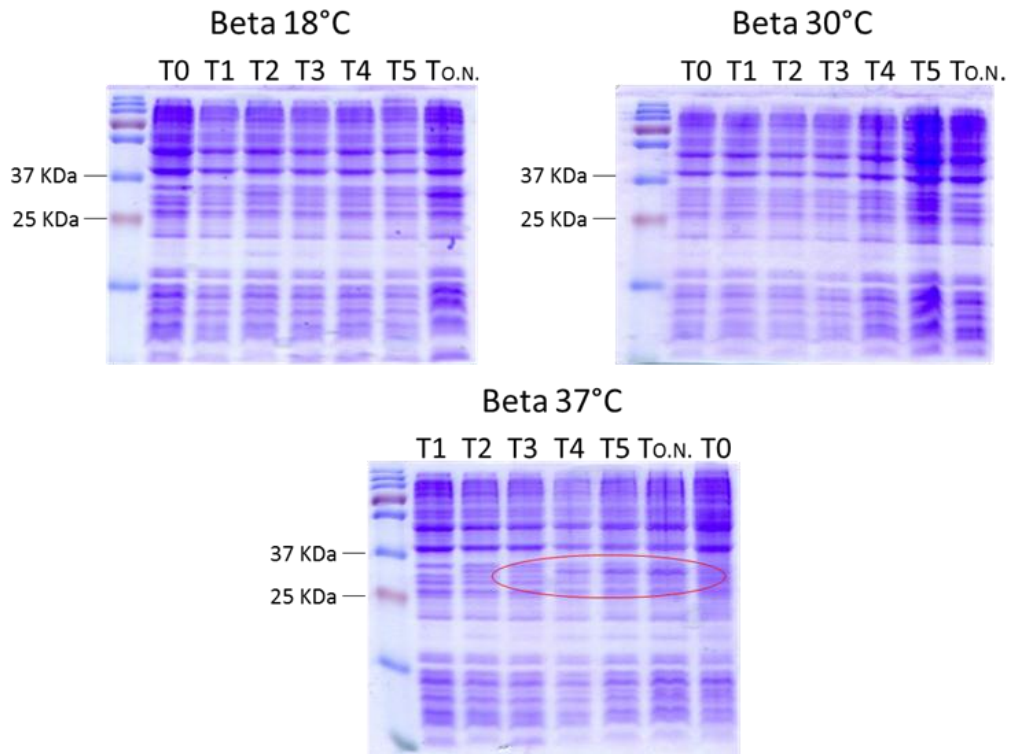


Fig.21 Prove di espressione relative all'isoforma β effettuate a diverse temperature (18°C, 30°C e 37°C). I campioni delle colture sono stati prelevati a intervalli regolari e le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, colorato con Blu di Comassie. In rosso sono cerchiato le bande corrispondenti alla proteina ricombinante.

Per accertare, l'eventuale espressione della 14-3-3 β , i campioni a 37°C sono stati caricati in doppio, per effettuare due Western Blot. Il primo è stato sviluppato utilizzando un anticorpo contro l'His-Tag, mentre per il secondo è stato utilizzato un anticorpo contro una regione conservata in tutte le 14-3-3 (anticorpo Pan). Come controllo, è stato caricato nell'ultimo pozzetto del gel anche un campione dell'isoforma σ purificata (**Fig.21**). Dall'osservazione dei blot, emerge che anche l'isoforma β viene espressa in maniera proporzionale al tempo di induzione. Si nota anche la presenza di una banda prima dell'induzione, al tempo zero, causata da un'espressione costitutiva del plasmide.

A questo punto, sono state provate altre condizioni per aumentare l'espressione di questa isoforma. Sono state eseguite prove con differenti concentrazioni di IPTG, (250 μ M, 500 μ M e 1mM) e anche a 4°C.

Dall'analisi dei campioni delle diverse prove caricati in SDS-PAGE, è emerso che l'espressione indotta a 37°C con una concentrazione di 500 μ M di IPTG risulta essere la soluzione migliore per tutte le isoforme.

In parallelo, tutte le colture sono state pellettate, risospese in tampone e lisate dopo induzione *over night*. La lisi dei batteri è stata effettuata tramite *french press* e il pellet e il surnatante ottenuti dopo aver centrifugato il prodotto della lisi dei batteri, sono stati caricati negli ultimi pozzetti degli SDS-PAGE. La **Fig.22** mostra come nel pellet del lisato sia ancora presente una parte della proteina, che verrebbe persa nella fase di purificazione. Ciò può essere dovuto o ad una lisi parziale dei batteri o all'incorporazione della proteina nei corpi di inclusione. Per questo motivo, mentre inizialmente venivano compiuti solamente 2 cicli di *french press*, al momento della purificazione sono stati effettuati 4 cicli.

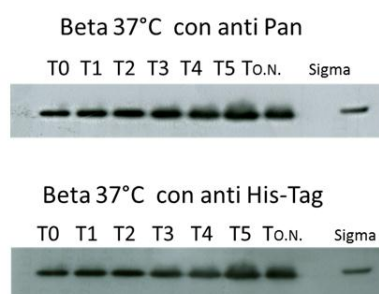


Fig.22 Western Blot sviluppati con anticorpi contro le 14-3-3 per verificare l'espressione dell'isoforma β nei campioni cresciuti a 37°C

3.3 Purificazione delle 7 isoforme di 14-3-3

Per la purificazione delle 14-3-3, una coltura di 500ml di cellule BL21, trasformate con pET-28a+ contenente il cDNA delle varie isoforme, è stata indotta a 37°C con una concentrazione di IPTG di 500 μ M.

Dopo aver centrifugato i batteri, il pellet risospeso è stato lisato tramite 4 passaggi in *french press*, in modo da diminuire la quantità di proteina che rimaneva nel pellet durante le prove. Il lisato è stato centrifugato e caricato in una colonna per cromatografia IMAC per purificare la proteina ricombinante sfruttando la presenza del tag di istidine.

Prima di procedere con la purificazione delle proteine necessarie per gli esperimenti, sono state compiute alcune prove per ottimizzare i parametri della cromatografia. Inizialmente, il gradiente di imidazolo generato per eluire la proteina durava 40 minuti, successivamente è stato ridotto a 20 minuti. Questo perché il cromatogramma e l' SDS-PAGE di controllo, eseguito al termine della purificazione, non hanno rivelato la presenza di altre proteine contaminanti. Come esempio di purificazione tramite IMAC è stato riportato il cromatogramma dell'isoforma θ (**Fig.23**) dove si può notare che il massimo del picco eluisce intorno a 250 mM imidazolo.

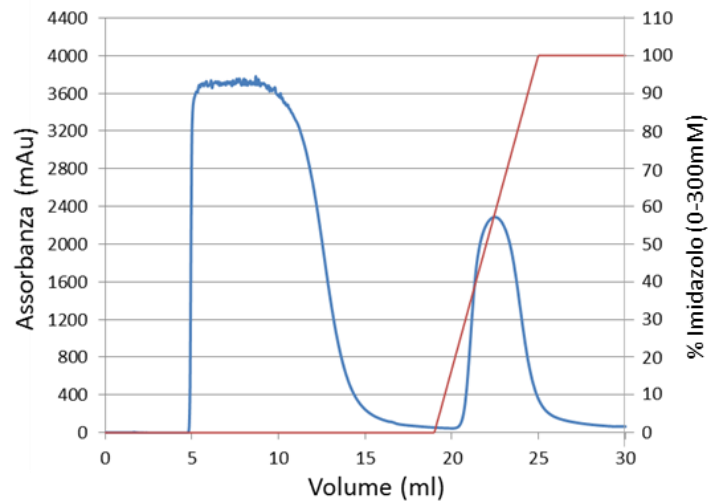


Fig.23 Cromatogramma relativo all'IMAC dell'isoforma θ . In blu è rappresentato l'andamento dell'assorbanza mentre in rosso il gradiente di imidazolo necessario per eluire la proteina.

Il picco eluito è stato dializzato contro buffer PBS per eliminare l'imidazolo, concentrato e successivamente digerito *over night* con trombina per eliminare la coda di istidine. Dopo la digestione è necessario rimuovere il tag dal resto della proteina caricando nuovamente il campione in IMAC in modo che le code restino legate al nickel della fase stazionaria e la proteina digerita possa essere eluita e raccolta. A questo punto, per separare la 14-3-3 dalla trombina, la proteina è stata caricata in gel filtrazione (superdex 75), che separa le proteine in base alle loro dimensioni (**Fig.24**). Il dimero di 14-3-3 ha infatti un peso di circa 56 kDa mentre la trombina ha un peso di 36 kDa.

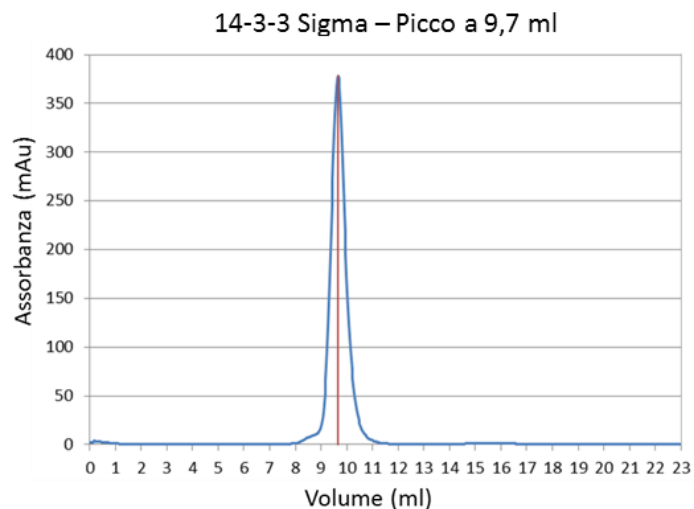


Fig.24 Cromatogramma relativo alla gel filtrazione dell'isoforma σ . In blu è rappresentato l'andamento dell'assorbanza mentre in rosso è evidenziato il volume di eluizione corrispondente al picco

Per accertarsi che le 14-3-3 fossero purificate come dimeri, è stata realizzata una retta di taratura (**Fig.25**) caricando in colonna proteine di peso noto. La retta è stata costruita utilizzando come valore delle ascisse il volume di eluizione relativo ai picchi delle proteine standard e come valore di ordinate il logaritmo del loro peso molecolare. Dalla retta ottenuta è stato possibile calcolare il peso molecolare della 14-3-3 pari a 56,28 kDa, corrispondente a un omodimero della proteina.

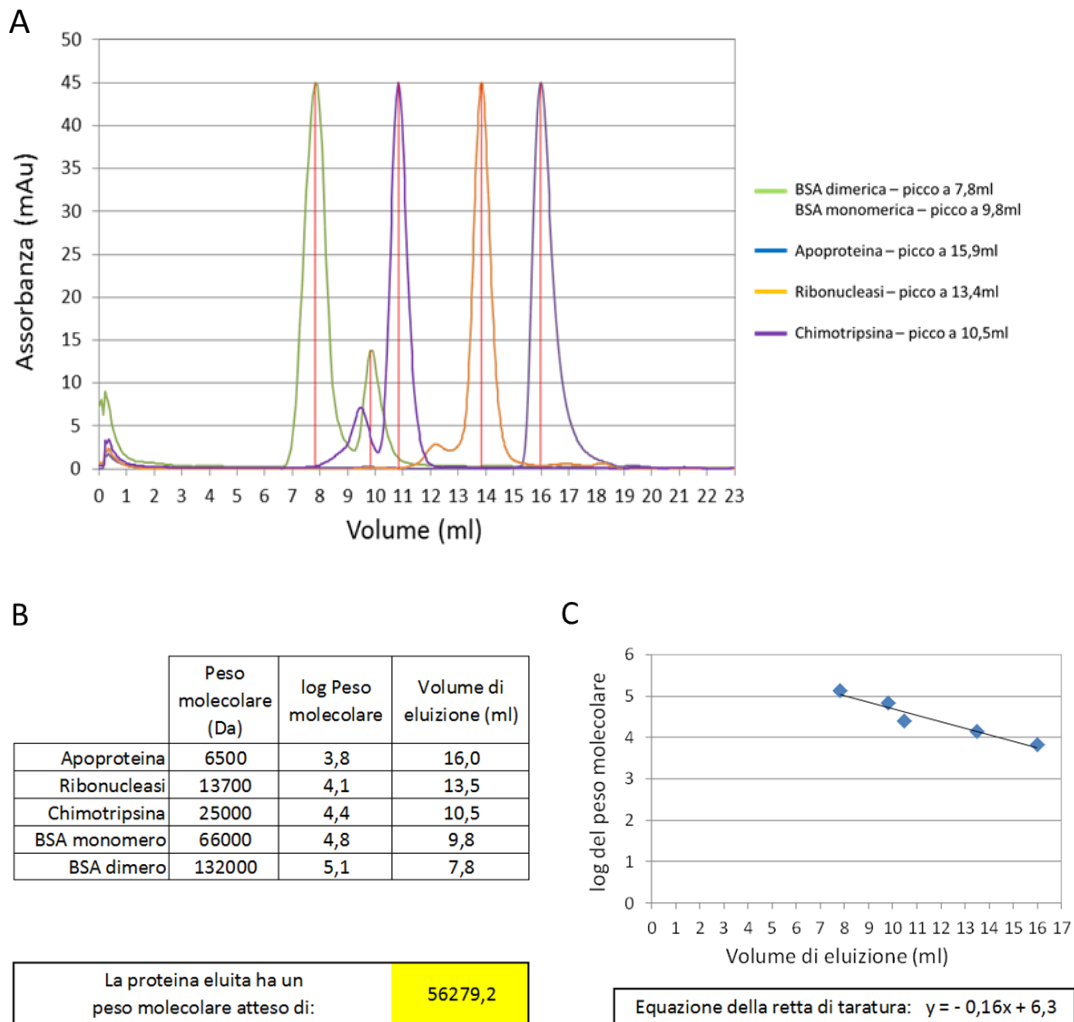


Fig.25 Cromatogrammi relativi alle gel filtrazioni delle proteine utilizzate come standard per la retta di taratura (A). Serie di dati utilizzati per realizzare la retta di taratura e stimare le dimensioni della proteina purificata (B). Retta di taratura (C).

In **Fig.26**, è stato riportato un gel di acrilammide che mostra tutti i vari passaggi della purificazione che portano ad ottenere una proteina isolata priva di contaminanti. L'ottimizzazione del protocollo di purificazione ha permesso di ottenere una resa di circa 4mg di proteina, ottenuta da una coltura iniziale di 500ml. Per l'isoforma β la resa è circa un quarto rispetto alle altre isoforme, quindi 1mg per 500ml di coltura.

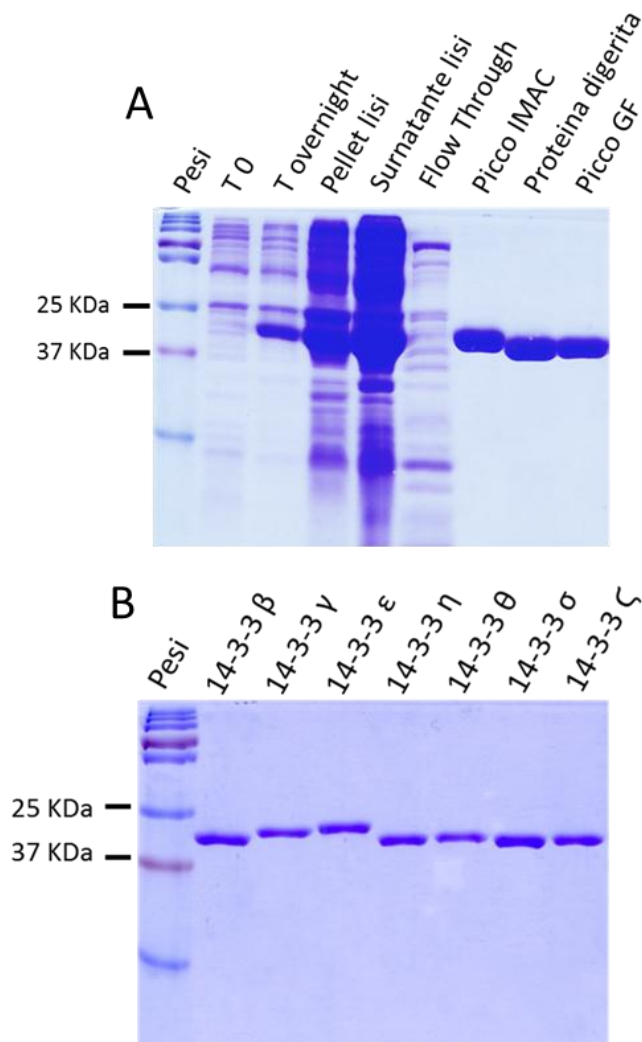


Fig.26 SDS-PAGE al 13% di acrilamide relativa alla purificazione dell'isoforma θ colorato con blu di Comassie (A) SDS-PAGE con tutte le isoforme purificate (B).

3.4 Analisi della struttura secondaria tramite spettropolarimetro

Per accertarsi che le condizioni di espressione o i processi di purificazione non abbiano compromesso la struttura secondaria delle proteine, è stata compiuta un'analisi tramite spettropolarimetro, uno strumento capace di rilevare il tipo di struttura secondaria delle proteine. Come si può vedere nella **Fig.27**, lo spettro di dicroismo circolare di tutte e sette le 14-3-3 purificate, presenta i due minimi caratteristici di proteine con struttura ad α -elica. Dato che le 14-3-3 sono costituite da 9 α -eliche come mostrato dalla struttura cristallografica risolta (**Fig.1**), il risultato ottenuto indica che le proteine purificate con il protocollo ottimizzato presentano un corretto *fold*ing.

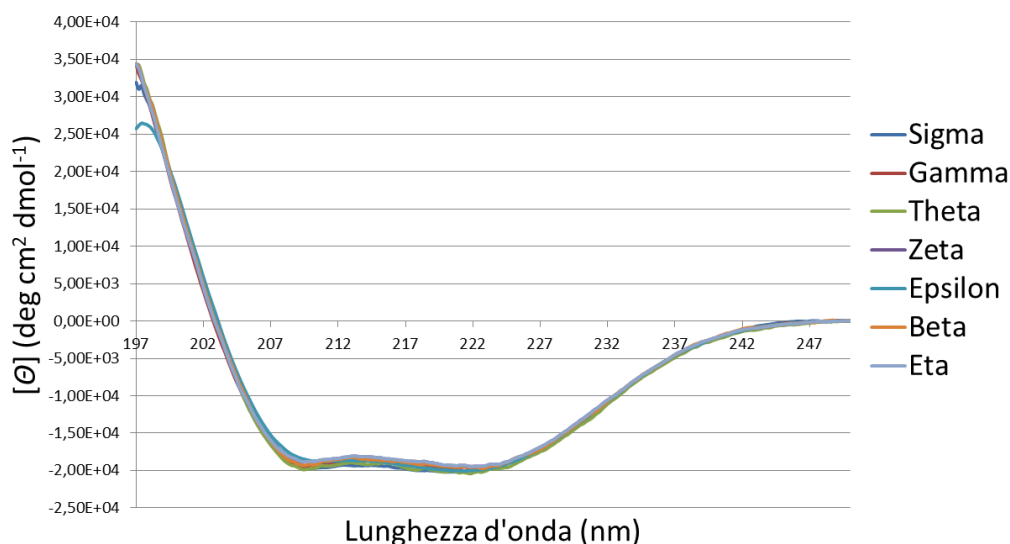


Fig.27 Spettro CD delle 7 isoforme di 14-3-3 purificate

3.5 Purificazione di α -sinucleina

Per la purificazione dell' α -sinucleina clonata in pET28a+ (senza però il tag di istidine) è stato seguito un protocollo perfezionato a partire da quello di Huang et al. 2005 e ampiamente usato in laboratorio. Questo protocollo sfrutta il fatto che la sinucleina prodotta dai batteri, non rimane nel citoplasma ma viene secreta nel periplasma. Al termine dell'induzione *over night*, le cellule sono state pellettate e risospese in un buffer ad alta osmolarità che provoca l'indebolimento della parete batterica. Successivamente al trattamento con acqua deionizzata fredda e $MgCl_2$ il periplasma si lisa rilasciando in soluzione solo le proteine periplasmatiche tra cui α -sinucleina. La soluzione deve essere poi fatta bollire per denaturare la maggior parte delle proteine. L' α -sinucleina, essendo *natively unfolded*, non viene danneggiata. Inoltre, a differenza di molte proteine che tendono ad aggregare precipitando a causa di interazioni di tipo idrofobico, l' α -sinucleina rimane solubile. A questo punto la purificazione procede con due precipitazioni mediante ammonio solfato che sfruttano la diversa solubilità delle proteine in presenza di sali, per eliminare ulteriori contaminanti. Con la prima aggiunta di ammonio solfato precipiteranno i contaminanti meno solubili, le cui molecole hanno un'alta idrofobicità. Nella seconda fase precipiteranno varie proteine fra cui l' α -sinucleina. La frazione precipitata contenente l' α -sinucleina, è stata dializzata contro acqua deionizzata in modo da eliminare l'ammonio solfato. Successivamente il campione, equilibrato in tampone, è stato caricato in cromatografia a scambio ionico (**Fig.28**) (resource Q) che presenta uno scambiatore anionico forte (l'ammonio quaternario) in modo da ottenere una purificazione priva di contaminanti (**Fig.29**). La proteina eluisce con una concentrazione di sale di circa 300 mM.

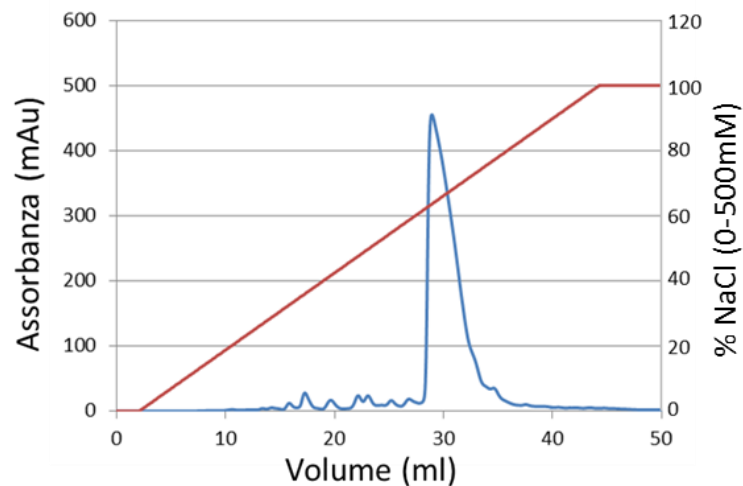


Fig.28 Cromatogramma relativo alla cromatografia a scambio ionico compiuta per purificare l' α -sinucleina. In blu è rappresentato l'andamento dell'assorbanza mentre in rosso il gradiente di NaCl necessario per eluire la proteina.

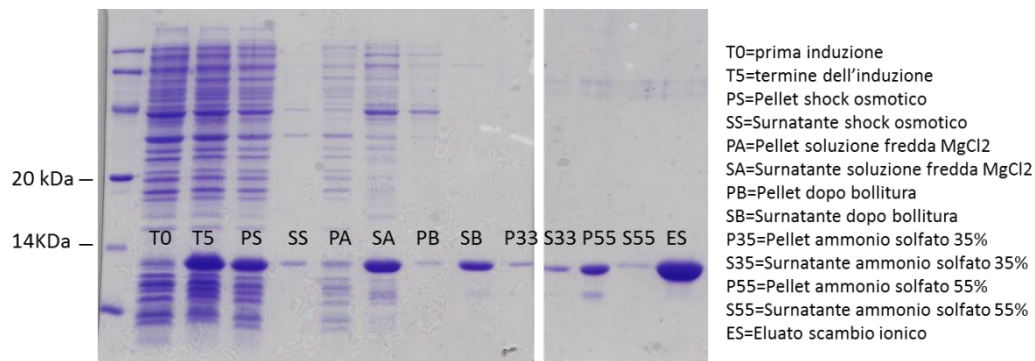


Fig 29 SDS-PAGE relativo alla purificazione dell' α -sinucleina

3.6 Saggi di aggregazione con tioflavina T

L' α -sinucleina, posta in agitazione a 37°C, è in grado di generare delle fibrille simili a quelle che costituiscono i corpi di Lewy presenti nei neuroni dei malati di PD. Utilizzando questo metodo è stato possibile riprodurre e studiare il processo di aggregazione in vitro ed osservare che le fibrille hanno una struttura secondaria a foglietto β . Questa particolare conformazione strutturale permette di poter monitorare il processo di aggregazione grazie all'utilizzo della tioflavina T. Questa molecola infatti, intercalata a strutture β , emette fluorescenza tra i 460nm e 600nm quando viene eccitata a 450nm. Quindi, se una soluzione contenente α -sinucleina e tioflavina T, viene eccitata ad una lunghezza d'onda di 450nm emetterà fluorescenza in modo proporzionale al grado di fibrillazione dell' α -sinucleina. Poiché le 14-3-3 e l' α -sinucleina sono state trovate all'interno dei corpi

di Lewy, è stato condotto un esperimento preliminare per cercare di capire se qualche isoforma di 14-3-3 interferisca nel processo di aggregazione.

Per questo motivo sono stati messi ad incubare in agitazione campioni contenenti le 7 isoforme di 14-3-3 insieme ad α -sinucleina in rapporto 4:1. E' stato utilizzato questo rapporto in quanto, da esperimenti precedenti, effettuati in laboratorio esso rappresenta la soglia minima oltre alla quale è possibile osservare un effetto delle 14-3-3 sul processo di aggregazione. Come controllo positivo è stato preparato un campione contenente solamente α -sinucleina mentre come controllo negativo sono state utilizzate le 7 isoforme di 14-3-3 da sole. A 60h, a 120h, a 240h e dopo 3 settimane sono state prelevate delle aliquote dai campioni in agitazione in modo da monitorare il processo di fibrillazione. Tutti i prelievi sono stati congelati a -80°C e sono stati misurati al fluorimetro dopo l'aggiunta della tioflavina T. I risultati di questi saggi sono mostrati nel grafico che segue (Fig.30)

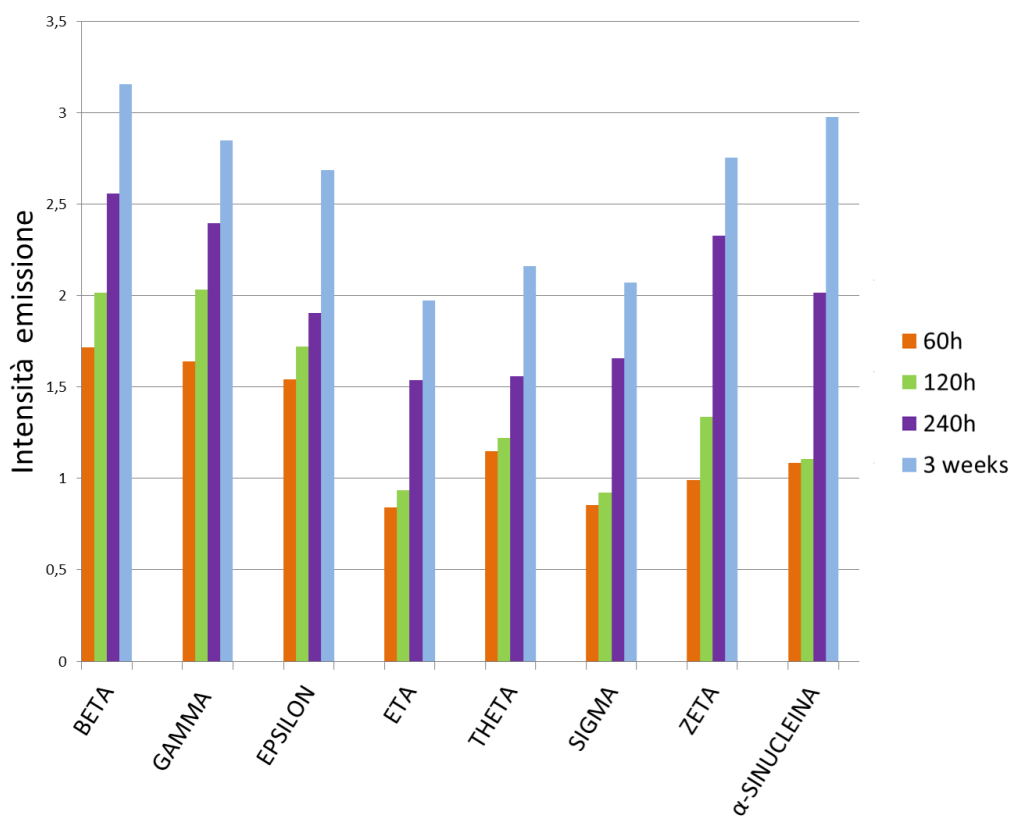


Fig.30 Risultati ottenuti tramite il saggio di aggregazione con tioflavina T. L'altezza di ogni colonna è pari all'intensità massima di emissione dalla tioflavina T, aggiunta nei campioni contenenti α -sinucleina e le diverse 14-3-3, prelevati dopo 60h, 120h, 240h e 3 settimane.

Considerando che l'intensità dell'emissione della tioflavina T è proporzionale alla quantità di proteine aggregate con struttura a foglietto beta, si può concludere che all'aumentare del tempo, aumenta anche la fibrillazione dell' α -sinucleina.

Da questo esperimento preliminare, sembrerebbe che alcune 14-3-3 possano avere un effetto nel processo di aggregazione. Mentre le isoforme η , θ e σ sembrano

rallentare il processo, l'isoforma β potrebbe accelerare la velocità di formazione delle fibrille. Per eliminare i centri di nucleazione, la cui distribuzione influenzerebbe l'inizio dell'aggregazione, la soluzione contenente α -sinucleina utilizzata per l'esperimento è stata filtrata. Nonostante ciò, osservando nel grafico le colonne relative ai i campioni prelevati a 60h e a 120h, sembrerebbe che alcuni campioni abbiano iniziato ad aggregare prima di altri. Dopo tre settimane, ogni campione avrebbe dovuto raggiungere comunque lo stesso grado di fibrillazione, per l'esaurimento dell' α -sinucleina monomerica in soluzione. Il fatto che non siano stati raggiunti gli stessi livelli di intensità denota un probabile effetto di alcune 14-3-3 nel processo.

3.7 Purificazione di LRRK2 WT e di alcuni mutanti

In parallelo al progetto che vede lo studio delle 14-3-3 con α -sinucleina nel processo di aggregazione, è stato seguito anche un secondo progetto che mira a studiare l'interazione delle 7 isoforme con un altro gene coinvolto nel PD: LRRK2. A questo scopo è stato necessario purificare la proteina wild type (WT), il mutante K1906M privo dell'attività chinasi (KD) e il doppio mutante Ser910A/Ser935A in cui le due serine, che, fosforilate, sono necessarie al legame con le 14-3-3. Nel caso di LRRK2, una proteina di 280KDa circa che forma dimeri, non è possibile usare come sistema di espressione *E. coli*. Per questo l'espressione e la purificazione sono state effettuate utilizzando cellule HEK293T applicando un protocollo precedentemente messo a punto in laboratorio che sfrutta la presenza di un tag 3xflag. Dopo due giorni di trasfezione, le cellule sono state raccolte, lisate in presenza di inibitori di proteasi e fosfatasi e, dopo centrifugazione, il lisato è stato incubato con una resina che presenta un anticorpo che riconosce il flag legato covalentemente a *beads* di agarosio. Dopo l'incubazione con la resina over night, sono stati eseguiti una serie di lavaggi con concentrazioni decrescenti di NaCl per eliminare altre proteine contaminanti. Infine la proteina è stata eluita per competizione aggiungendo il peptide 3xflag in soluzione ed è stata caricata su SDS-PAGE. Nel gel di poliacrilamide rappresentato in **Fig.31** sono stati caricate le tre proteine purificate e la resina di una purificazione indipendente prima dell'eluizione. Nei pozzetti in cui è stata caricata la resina si possono osservare due bande aggiuntive oltre alla banda relativa a LRRK2, che corrispondono alla catena leggera e a quella pesante dell'anticorpo coniugato alla resina. Nonostante questo protocollo sia stato perfezionato, si può osservare come alla resina rimanga legata almeno metà della proteina presente complessivamente nel lisato. Per quanto la quantità di peptide flag sia molto superiore a quella che potrebbe essere legata alla resina, non porta al completo distacco di LRRK2 dall'anticorpo. Per poter recuperare una quantità maggiore di proteina è possibile eseguire una seconda eluizione.

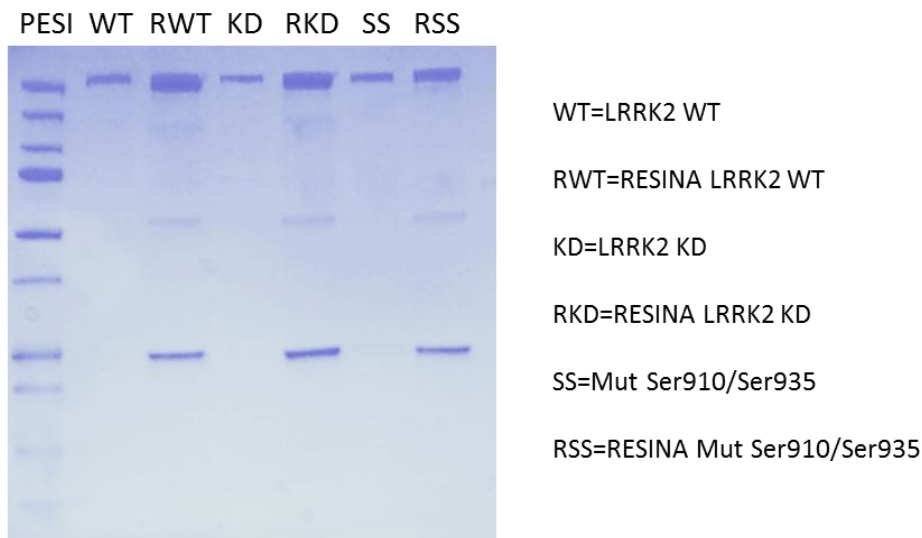


Fig. 31 SDS-PAGE con campioni della purificazione di LRRK2 WT, LRRK2 KD e del doppio mutante Ser910/Ser935. Sono state caricate le proteine eluite e le rispettive resine. La freccia in rosso indica le bande corrispondenti alle proteine purificate.

3.8 Possibile copurificazione della PKA insieme a LRRK2

In esperimenti compiuti in laboratorio era stato osservato che la sinapsina 1, una proteina coinvolta nell'ancoraggio delle vescicole sinaptiche al citoscheletro di actina, una volta incubata con LRRK2 veniva fosforilata anche in presenza dell'inibitore per l'attività chinasi di LRRK2. La fosforilazione avveniva anche utilizzando il mutante KD di LRRK2 privo della funzione chinasi. Questo ha fatto supporre che una chinasi venisse copurificata con LRRK2. Dati in letteratura mostrano come la sinapsina sia substrato della protein chinasi A (PKA) (Menegon et al. 2006), una chinasi che fosforila fra l'altro anche LRRK2 a livello della S935 in vitro (Li 2011). Per questo motivo abbiamo effettuato un controllo per verificare se la PKA venisse copurificata con LRRK2. In un SDS-PAGE sono stati caricati LRRK2 WT, il mutante KD e una serie di diluizioni di PKA commerciale per identificare il range di sensibilità dell'anticorpo ed eventualmente stimare la quantità di PKA copurificata con LRRK2. Successivamente è stato fatto un western blot utilizzando un anticorpo contro la PKA. Il test non è risultato significativo in quanto l'anticorpo si è dimostrato poco sensibile e la PKA potrebbe essere presente al di sotto della soglia di rivelabilità (**Fig 32**). Per questo motivo non è stato possibile confermare o escludere che la PKA venga copurificata con LRRK2.

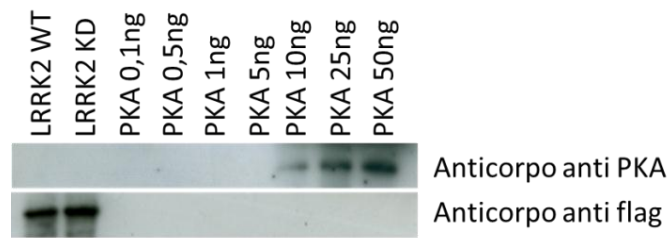


Fig.32 Westernblot per verificare la presenza della PKA in campioni di LRRK2 purificata. Come controllo della sensibilità dell'anticorpo sono statecaricate concentrazioni differenti di PKA bovina

3.9 Valutazione del livello di fosforilazione delle Ser910/Ser935 in LRRK2 WT e in LRRK2 KD

Dovendo studiare le interazioni fra le 14-3-3 e LRRK2, è necessario valutare il livello di fosforilazione delle due serine di LRRK2 coinvolte nel legame. Esperimenti preliminari, sembravano evidenziare un maggior livello di fosforilazione nel mutante KD. La presenza di un mutante con un alto livello di fosforilazione alle Ser910 e Ser935 potrebbe essere utilizzato come controllo positivo per esperimenti di interazione fra LRRK2 e le 14-3-3. Per questo motivo, dopo aver purificato e portato alla stessa concentrazione LRRK2 WT e KD è stato confrontato il loro livello di fosforilazione. Per fare ciò le due proteine sono state caricate in SDS-PAGE, trasferite su membrana e sviluppate per diversi anticorpi. Sono stati utilizzati un anticorpo anti α -flag come controllo della proteina totale, e due anticorpi specifici, capaci di riconoscere la pSer910 e la pSer935, in modo da poter poi valutare il livello di fosforilazione dei singoli amminoacidi grazie alla misurazione dell'intensità della bande generate sulla lastra.(**Fig.33A**). Questo esperimento è stato realizzato in triplicato ed ha dimostrato che le serine di LRRK2 WT e KD sono fosforilate e che non ci sono differenze significative nel livello di fosforilazione fra le due proteine purificate (**Fig.33B**).

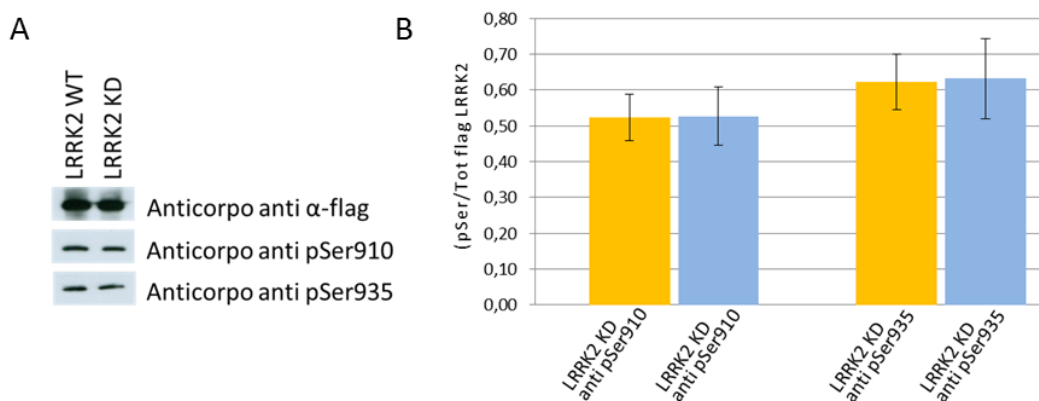


Fig.33 Western Blot per la quantificazione dei livelli di fosforilazione delle Ser910 e Ser935(A). Grafici ottenuti come media dell'intensità delle bande di tre repliche di blot sviluppati con anticorpi anti pSer910 e pSer935. I valori dell'intensità sono stati normalizzati per la quantità di proteina purificata caricata nel gel (B).

3.10 Affinità delle diverse 14-3-3 con LRRK2

Per testare l'affinità delle diverse 14-3-3 per LRRK2, è stato compiuto un saggio preliminare di co-immunoprecipitazione (Co-IP). Per prima cosa le proteine purificate sono state incubate insieme, in agitazione, con un rapporto molare di 2:1. Successivamente i campioni sono stati incubati con un anticorpo anti-flag e successivamente con la proteina G coniugata alle beads per immunoprecipitare LRRK2. Una volta immunoprecipitato LRRK2, sono stati fatti 3 lavaggi della resina con un tampone con concentrazione di NaCl di 150mM, questo per evitare interazione aspecifiche tra LRRK2 e le 14-3-3 co-immunoprecipitate. Dopo di che, i campioni sono stati caricati in un SDS-PAGE e trasferito su membrana. Questa è stata sviluppata con anticorpo anti Pan 14-3-3 e con anticorpo anti α -flag. L'esperimento è stato eseguito incubando anche il mutante di LRRK2 a cui sono state sostituite le due serine, necessarie al legame con le 14-3-3, come controllo negativo e con il KD . I blot hanno evidenziato che il protocollo utilizzato deve essere ottimizzato provando ad effettuare dei lavaggi stringenti, in quanto, come si può notare dalla **Fig.34** c'è stata co-immunoprecipitazione di alcune isoforme di 14-3-3 anche con il controllo negativo.

Per verificare che le apparenti differenze nella concentrazione delle 14-3-3 non dipendano dalla diversa affinità dell'anticorpo alle varie isoforme, è stato eseguito un altro Western Blot , caricando campioni delle 7 14-3-3, la cui concentrazione è stata nuovamente controllata. Il risultato ottenuto ha mostrato come l'anticorpo non abbia la stessa affinità per le varie isoforme. Per questo motivo sarà necessario ripetere l'esperimento utilizzando 14-3-3 con His-tag, in modo da poter utilizzare un anticorpo con la stessa affinità per tutte le isoforme.

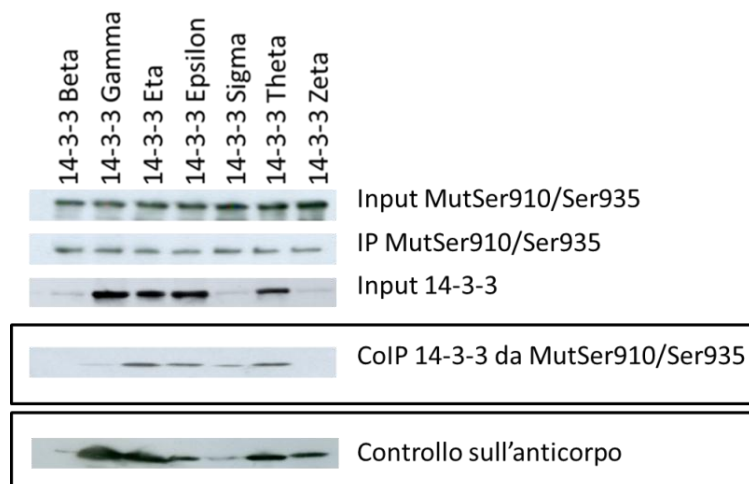


Fig.34 Western Blot relativo alla Co-IP del mutante Ser910/Ser935 sviluppato prima per l'anticorpo anti α -flag e successivamente per anticorpo anti 14-3-3. Sono stati cerchiati il controllo negativo, ovvero la Co-IP con il mutante per le Ser910/Ser935, e il controllo sull'affinità dell'anticorpo..

5. DISCUSSIONE

Spesso, in letteratura, il termine 14-3-3 è usato per indicare genericamente l'intera famiglia di proteine, senza però considerare che la lunga storia evolutiva delle diverse isoforme le ha probabilmente portate a ricoprire ruoli differenti.

Dovendo compiere uno studio su queste proteine, è stato necessario clonare, esprimere e purificare tutte le 7 isoforme umane in batteri. Per il clonaggio sono state messe a punto due strategie: con la prima è stato possibile ottenere i vettori per l'espressione di 3 isoforme (σ , ϵ e β) mentre con la seconda sono state clonate le rimanenti (ζ , θ , η e γ).

I primi esperimenti intrapresi dopo il clonaggio di tutte e 7 le isoforme di 14-3-3 erano mirati a studiare le relazioni fra le 14-3-3 e l' α -sinucleina, la principale proteina costituente i corpi di Lewy. Il rapporto fra queste due proteine non è stato ancora ben chiarito. Ci sono studi discordanti sul fatto che queste proteine possano interagire direttamente, anche se si ritiene che la fosforilazione della Ser129 giochi un ruolo importante per il loro possibile legame. Ci sono molte ipotesi sulle conseguenze della loro interazione. (Sato 2006) Sato et al. per esempio, sostengono che la 14-3-3 η inibisca l'attività di parkin, una E3-ubiquitina-ligasi responsabile dell'indirizzamento di proteine verso il proteosoma. In condizioni fisiologiche l' α -sinucleina sarebbe in grado di legare la 14-3-3 η impedendo che questa possa inibire parkin. I mutanti patologici di α -sinucleina non sarebbero in grado di legare la 14-3-3 η portando ad un'inibizione del sistema ubiquitina-proteosoma e ad un accumulo di proteine nella cellula (Sato et al. 2006).

Un'altra ipotesi, alternativa al fatto che ci possa essere un'interazione specifica fra l' α -sinucleina e le 14-3-3, è che queste vengano semplicemente intrappolate nella trama di fibrille generata dall' α -sinucleina. Quest'interazione potrebbe impedire ad alcune 14-3-3 di legare e mantenere inattiva la proteina pro-apoptotica Bad favorendo così la morte dei neuroni (Steinacker 2011). Come già discusso nell'introduzione, il sequestro di alcune 14-3-3 ad opera dell' α -sinucleina sembrerebbe causare anche l'inibizione della TH e di conseguenza la riduzione della sintesi della dopamina (Kleppe 2011).

In ogni caso, è ancora da chiarire se la presenza della 14-3-3 negli aggregati di α -sinucleina abbia una funzione protettiva come sostengono Yacoubian et al. (Yacoubian 2010). Questo gruppo, ha studiato il processo di aggregazione utilizzando cellule H4 di neuroglioma transfettate con α -sinucleina coniugata alla EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) al c-terminale troncata e sinfilina in modo da riprodurre la formazione di inclusioni citoplasmatiche. Cellule H4 co-trasfettate con le 14-3-3 ϵ , γ e θ hanno dimostrato di avere al loro interno il 40% in meno di inclusioni citoplasmatiche rispetto a cellule non co-trasfettate. Questo suggerisce che queste tre isoforme abbiano un effetto protettivo rallentando l'aggregazione della α -sinucleina.

In laboratorio, l'influenza delle isoforme η e γ (purificate con un altro costrutto) sul processo di aggregazione dell' α -sinucleina era già stato studiato in via preliminare. Questi esperimenti avevano suggerito come l'isoforma η rallentasse l'aggregazione.

I dati preliminari presentati in questa tesi mostrano che molto probabilmente le 14-3-3 influenzano il processo di aggregazione dell' α -sinucleina. Si nota come alcune isoforme, come η , σ e θ , rallentino l'aggregazione, mentre altre accelerino il processo. Ovviamente questi esperimenti dovranno essere ripetuti per confermare o meno il risultato ottenuto in questa prova preliminare. Inoltre si potrebbe ampliare lo studio affiancando altre tecniche, quali misurazioni con il microscopio a forza atomica e immagini di microscopia elettronica, mirate a caratterizzare i prodotti di aggregazione. Inoltre questi esperimenti andranno ripetuti in parallelo utilizzando anche α -sinucleina fosforilata a livello della Ser 129 per capire se questa modifica post-traduzionale influenzi l'interazione fra 14-3-3 e α -sinucleina e di conseguenza il processo di aggregazione. In futuro si potrebbe anche fosforilare l'isoforma beta, in quanto, quando questa è presente nel cervello, è fosforilata a livello della Ser6.

Da notare comunque che studiare il processo di aggregazione dell' α -sinucleina in vitro presenta molta variabilità. Infatti è stato dimostrato che il tipo di superficie con cui la soluzione posta ad aggregare viene a contatto ed il pH sono fattori determinanti per il processo. Perché si possano formare fibrille è necessario che la superficie presenti cariche negative e che il pH non sia superiore a 7. La presenza di cariche negative su una superficie simulerebbe l'interazione fra l' α -sinucleina e la membrana plasmatica, limitando la mobilità della proteina monomerică o di piccoli oligomeri e favorendo l'aggregazione (Zhu 2002). In ogni caso, vista la grande variabilità di questo tipo di analisi, sarà necessario spostarsi su un modello cellulare o neuronale per poter concludere che una determinata isoforma è in grado di rallentare la formazione dei corpi di Lewy.

Dopo aver studiato l'influenza delle 14-3-3 nel processo di fibrillazione dell' α -sinucleina, sono state compiute delle indagini sul rapporto fra le 14-3-3 e LRRK2, una proteina le cui mutazioni rappresentano la più comune causa di Parkinson autosomico dominante con insorgenza tardiva. Recentemente è stato dimostrato che alcune mutazioni patologiche di LRRK2, come ad esempio R1441G, Y1699C e G2019S, hanno un livello di fosforilazione della Ser935 e della Ser910 inferiore rispetto al wild type. Di conseguenza in questi casi di PD, potrebbe esserci una ridotta interazione di LRRK2 con le 14-3-3 (Nichols et al. 2010). Il meccanismo che regola l'interazione fra LRRK2 e le 14-3-3, non è stato ancora completamente chiarito. Si ipotizza che la fosforilazione della Ser935 avvenga per azione della PKA, essendo già stato dimostrato che LRRK2 non può autofosforilarsi in questi siti. Inoltre, anche in questa tesi, abbiamo verificato che il livello di fosforilazione delle due serine è indipendente dall'attività chinasi di LRRK2, essendo entrambe fosforilate anche nel mutante KD.

Il controllo che è stato compiuto per vedere se la PKA venisse copurificata con LRRK2 sarebbe servito, oltre che a confermare l'interazione fra le due proteine, anche ad escludere, in caso negativo, un possibile legame delle 14-3-3 alla PKA piuttosto che a LRRK2. Dato che la 14-3-3 γ , ed i suoi eterodimeri, si legano alla PKA attivandola tramite cambiamento conformazionale (Kent 2010), esperimenti di interazione fra LRRK2 e 14-3-3 avrebbero potuto essere perturbati dalla presenza della PKA.

Per quanto riguarda il protocollo testato per la co-immunoprecipitazione di LRRK2 e delle 14-3-3, sono stati individuati diversi punti da perfezionare. Come prima cosa, sarebbe opportuno utilizzare 14-3-3 coniugate all'His-tag anziché quelle tagliate con la trombina. In questo modo sarebbe possibile utilizzare l'anticorpo anti His-tag il quale, legandosi ad una regione perfettamente identica in tutte le isoforme, permetterebbe di rilevare le diverse 14-3-3 con la stessa sensibilità. Inoltre, è necessario compiere un maggior numero di lavaggi o aumentare la loro stringenza, per eliminare interazioni aspecifiche fra le due proteine. Questo perché alcune isoforme co-immunoprecipitano anche con LRRK2 doppio mutante Ser910Ala/Ser935Ala.

Ottimizzato il protocollo per la co-immunoprecipitazione, sarà possibile confermare o meno gli studi presenti in letteratura che suggeriscono come ci sia una maggior affinità da parte di LRRK2 per le isoforme di 14-3-3 β , η e θ (Nichols 2010). Se tali risultati fossero confermati sarebbe interessante studiare in maniera approfondita l'interazione fra 14-3-3 η e LRRK2, visto l'effetto che questa isoforma ha sul processo di aggregazione dell' α -sinucleina.

La funzione del legame delle 14-3-3 con LRRK2 non è ancora stata chiarita, tuttavia evidenze mostrano che potrebbe influenzare la stabilità del dimero di LRRK2 e la sua attività chinasi (Rudenko 2010). Un'ipotesi alternativa è che il legame moduli la localizzazione di LRRK2 mantenendola nel citoplasma (Nichols 2010).

Qualora i risultati preliminari, venissero confermati, e le 14-3-3 venissero sequestrate durante l'aggregazione dell' α -sinucleina, emergerebbe un nuovo scenario nella patogenesi del PD. Il sequestro delle 14-3-3, ad opera dell' α -sinucleina, comporterebbe una disregolazione di LRRK2.

In conclusione, in questi mesi sono state clonate le 7 isoforme di 14-3-3 all'interno di un plasmide per l'espressione batterica ed è stato successivamente ottimizzato un protocollo per la loro purificazione. Inoltre è stata allestita una cinetica di aggregazione preliminare che ha permesso di individuare potenziali isoforme che sembrano rallentare il processo di aggregazione della sinucleina.

Infine è stata intrapresa la messa a punto di un protocollo per la Co.IP delle 14-3-3 e LRRK2 che presenta però ancora diversi punti da perfezionare.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Aitken, A. 2003, "Protein consensus sequence motifs", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 211, pp. 465-485.
- 2 Aitken, A. 2002, "Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants", *Plant Molecular Biology*, vol. 50, no. 6, pp. 993-1010.
- 3 Berg, D., Holzmann, C. & Riess, O. 2003, "14-3-3 proteins in the nervous system", *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 4, no. 9, pp. 752-762.
- 4 Drolet, R.E. 2011, "Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Cellular Biology: A Review of Recent Advances in Identifying Physiological Substrates and Cellular Functions", *Journal of neurogenetics*, vol. 25, no. 4, pp. 140-151.
- 5 Dzamko, N., Inesta-Vaquera, F., Zhang, J., Xie, C. & Cai, H. 2012, "The IkappaB Kinase Family Phosphorylates the Parkinson's Disease Kinase LRRK2 at Ser935 and Ser910 during Toll-Like Receptor Signaling", *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, pp. 1-15.
- 6 Gardino, A.K. 2006, "Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: A comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms", *Seminars in cancer biology*, vol. 16, no. 3, pp. 173-182.
- 7 Giurleo, J.T. 2008, "beta-lactoglobulin assembles into amyloid through sequential aggregated intermediates", *Journal of Molecular Biology*, vol. 381, no. 5, pp. 1332-1348.
- 8 Haavik, J. & Toska, K. 1998, *Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease*, Humana Press Inc.
- 9 Iaccarino, C. 2007, "Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death", *Human molecular genetics*, vol. 16, no. 11, pp. 1319-1326.
- 10 Inglis, K.J. 2009, "Polo-like Kinase 2 (PLK2) Phosphorylates alpha-Synuclein at Serine 129 in Central Nervous System", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 5, pp. 2598-2602.
- 11 Johnson, C. 2010, "Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites", *Biochemical Journal*, vol. 427, no. 1, pp. 69-78.

- 12 Kent, C.B. 2010, "14-3-3 Proteins Regulate Protein Kinase A Activity to Modulate Growth Cone Turning Responses", *Journal Of Neuroscience*, vol. 30, no. 42, pp. 14059-14067.
- 13 Kleppe, R. 2011, "The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism", *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 22, no. 7, pp. 713-719.
- 14 Kurz, A. 2012, "A53T-alpha-synuclein-overexpression in the mouse nigrostriatal pathway leads to early increase of 14-3-3 epsilon and late increase of GFAP", *Journal of neural transmission*, vol. 119, no. 3, pp. 297-312.
- 15 Lashuel, H. 2002, "alpha-Synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils", *Neurobiology of aging*, vol. 23, no. 1, pp. 409-S409.
- 16 Li, X.T. 2011, "Phosphorylation-Dependent 14-3-3 Binding to LRRK2 Is Impaired by Common Mutations of Familial Parkinson's Disease", *PLOS ONE*, vol. 6, no. 3.
- 17 Maroteaux, L., Campanelli, J.T. & Scheller, R.H. 1988, "Synuclein: A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal", *The Journal of Neuroscience*, vol. 8, pp. 2804-2815.
- 18 Megidish, T. 1998, "A novel sphingosine-dependent protein kinase (SDK1) specifically phosphorylates certain isoforms of 14-3-3 protein", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 34, pp. 21834-21845.
- 19 Menegon, A., Bonanomi, D., Albertinazzi, C., Lotti, F., Ferrari, G., Kao, H.T., Benfenati, F., Baldelli, P. & Valtorta, F. 2006, "Protein kinase A-mediated synapsin I phosphorylation is a central modulator of Ca²⁺-dependent synaptic activity", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 26, no. 45, pp. 11670-11681.
- 20 Merlini, G. & Bellotti, V. 2003, "Molecular Mechanisms of Amyloidosis", *N Engl J Med*, vol. 349, no. 6, pp. 583-596.
- 21 Michael, R.R. & Dianna, J.B. 1999, "Fusicocin, 14-3-3 Proteins, and Defense Responses in Tomato Plants", *Plant Physiology*, vol. 119, pp. 1243-1250.
- 22 Nichols, R.J., Dzamko, N., Morrice, N.A., Campbell, D.G., Deak, M., Ordureau, A., Macartney, T., Tong, Y., Shen, J., Prescott, A.R. & Alessi, D.R. 2010, "14-3-3 binding to LRRK2 is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization", *Biochemical Journal*, vol. 430, pp. 393-404.

- 23 Obsil, T. 2011, "Structural basis of 14-3-3 protein functions", *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 22, no. 7, pp. 663-672.
- 24 Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J. & Oecking, C. 2007, "Structure of a 14-3-3 Coordinated Hexamer of the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase by Combining X-Ray Crystallography and Electron Cryomicroscopy", *Molecular cell*, vol. 25, no. 3, pp. 427-440.
- 25 Paisan-Ruiz, C. 2004, "Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease", *Neuron*, vol. 44, no. 4, pp. 595-600.
- 26 Pavan, K.A., Caraveo, G. & Lindquist, S. 2010, " α -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 26, pp. 211-233.
- 27 Recchia, A., Debetto, P., Negro, P., Guidolin, D., Skaper, S.D. & Giusti, P. 2004, " α -Synuclein and Parkinson's disease ", *The FASEB Journal*, vol. 18, no. 6, pp. 617-626.
- 28 Rosenquist, M., Sehnke, P., Ferl, R.J., Sommarin, M. & Larsson, C. 2000, "Evolution of the 14-3-3 protein family: Does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity?", *Journal of Molecular Evolution*, vol. 51, no. 5, pp. 446-458.
- 29 Rudenko, I.N. & Cookson, M.R. 2010, "14-3-3 proteins are promising LRRK2 interactors", *The Biochemical journal*, vol. 430, no. 3, pp. e5-6.
- 30 Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N. & Tanaka, K. 2006, "14-3-3 β is a Novel Regulator of Parkin Ubiquitin Ligase", *The EMBO journal*, vol. 25, no. 1, pp. 211-221.
- 31 Satoh, J., Onoue, H. & Arima, K.Y.,T. 2005, "The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein.", *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 64, no. 10, pp. 858-868.
- 32 Shin, N. 2008, "LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis", *Experimental cell research*, vol. 314, no. 10, pp. 2055-2065.
- 33 Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. 1998, " α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no. 11, pp. 6469-6473.
- 34 Steinacker, P., Aitken, A. & Otto, M. 2011, "14-3-3 proteins in neurodegeneration", *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 22, no. 7, pp. 696-704.

- 35 Wang, J., Lou, H., Pedersen, C.J., Smith, A.D. & Perez, R.G. 2009, "14-3-3 Contributes to Tyrosine Hydroxylase Activity in MN9D Cells", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 21, pp. 14011-14019.
- 36 Wu, M. 2006, "SWTY - A general peptide probe for homogeneous solution binding assay of 14-3-3 proteins", *Analytical Biochemistry*, vol. 349, no. 2, pp. 186-196.
- 37 Xu, J. 2002, "Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease", *Nature medicine*, vol. 8, no. 6, pp. 600-606.
- 38 Yacoubian, T.A., Slone, S.R., Harrington, A.J., Hamamichi, S., Schieltz, J.M., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A. & Standaert, D.G. 2010, "Differential neuroprotective effects of 14-3-3 proteins in models of Parkinson's disease", *Cell death & disease*, vol. 1, pp. e2.
- 39 Yagi, H., Kusaka, E., Hongo, K., Mizobata, T. & Kawata, Y. 2005, "Amyloid Fibril Formation of α -Synuclein Is Accelerated by Preformed Amyloid Seeds of Other Proteins", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 46, pp. 38609-38616.
- 40 Yano, M., Nakamuta, S., Wu, X., Okumura, Y. & Kido, H. 2006, "A Novel Function of 14-3-3 Protein: 14-3-3 ζ Is a Heat-Shock-related Molecular Chaperone That Dissolves Thermal-aggregated Proteins", *Mol Biol Cell*, vol. 17, no. 11, pp. 4769-4779.
- 41 Zannis Hadjopoulos, M. 2008, "14-3-3 cruciform-binding proteins as regulators of eukaryotic DNA replication", *Trends in biochemical sciences*, vol. 33, no. 1, pp. 44-50.
- 42 Zhao, J. 2011, "14-3-3 proteins as potential therapeutic targets", *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 22, no. 7, pp. 705-712.
- 43 Zhu, M., Souillac, P.O., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S.A. & Fink, A.L. 2002, "Surface-catalyzed amyloid fibril formation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 52, pp. 50914-50922.

APPENDICE

Sequenze nucleotidiche e amminoacidiche delle isoforme di 14-3-3

In giallo sono segnalati i siti di riconoscimento per BamHI, in verde quelli per NotI, in viola sono evidenziati i codoni iniziali mentre in rosso i codoni di stop

14-3-3 EPSILON (ϵ)

ggatccatggatgatcgagaggatctggtgtaccaggcgaagctggccgagcaggctgag
G S M D D R E D L V Y Q A K L A E Q A E
cgatacgcagaaatgggtggagtcaatgaagaaagtagcagggatggatgtggagctgaca
R Y D E M V E S M K K V A G M D V E L T
gttgaagaaagaacctcctatctggtgcatataagaatgtgattggagctagaagagcc
V E E R N L L S V A Y K N V I G A R R A
tcctggagaataatcagcagcattgaacagaaagaagaaaacaagggaggagaagacaag
S W R I I S S I E Q K E E N K G G E D K
ctaaaaatgattcgggaatatcggaatgggttgagactgagctaaagttaatctgttgt
L K M I R E Y R Q M V E T E L K L I C C
gacattctggatgtactggacaaacacctcattccagcagctaacactggcgagtccaag
D I L D V L D K H L I P A A N T G E S K
gttttctattataaaatgaaaggggactaccacaggtatctggcagaatcttgcacagga
V F Y Y K M K G D Y H R Y L A E F A T G
aacgacaggaaggaggctgcggaagaacagccttagtggcttataaagctgctagtgatatt
N D R K E A A E N S L V A Y K A A S D I
gcaatgcagaacttccaccaacgcacatcctattcgcttaggtcttgcctcaatctttcc
A M T E L P P T H P I R L G L A L N F S
gtattctactacgaaattcttaattcccctgaccgtgcctgcaggttggcaaaagcagct
V F Y Y E I L N S P D R A C R L A K A A
tttgatgatgcaactgcagaactggatagcgtgagtgagaagaagctataaggactctaca
F D D A I A E L D T L S E E S Y K D S T
cttatcatgcagttgttacgtgataatctgacactatggacttcagacatgcaggggtgac
L I M Q L L R D N L T L W T S D M Q G D
ggatgaagagcagaataaagaagcgtgagcagcgtggaagacgaaaatcagtgagcggcc
G E E Q N K E A L Q D V E D E N Q - A A
gc

14-3-3 BETA (β)

ggatccatggacaatggataaaagtgagctggtacagaaagccaaactcgctgagcaggct
G S M T M D K S E L V Q K A K L A E Q A
gagcgatatgatgatatggctgcagccatgaaggcagtcacagaacaggggcatgaactc
E R Y D D M A A A M K A V T E Q G H E L
tccaacgaagagagaaaatctgctctctggtgcttacaagaatgtggtagggccccggcc
S N E E R N L L S V A Y K N V V G A R R
tcttctggcgtgtcatctccagcattgagcagaaaacagagaggaatgagaagaagcag
S S W R V I S S I E Q K T E R N E K K Q
cagatgggcaaaagagtaccgtgagaagatagaggcagaactgcaggacatctgcaatgat
Q M G K E Y R E K I E A E L Q D I C N D
gttctggagctggtggacaaatatcttattcccgaatgctacacaaccagaaagtaaggtg
V L E L L D K Y L I P N A T Q P E S K V
tttacttgaaaatgaaaggagattatctttaggtatcttctgaaagtggcatctggagac
F Y L K M K G D Y F R Y L S E V A S G D
aacaacaaaccactgtgtcgaactcccagcaggttaccaggaagcatttgaaattagt

N K Q T T V S N S Q Q A Y Q E A F E I S
 aagaagaaatgcagcctacacaccaattcgtcttggctctggcactaaatttctcagtc
 K K E M Q P T H P I R L G L A L N F S V
 ttttactatgagattctaaactctcctgaaaaggcctgtagcctggcaaaaacggcattt
 F Y Y E I L N S P E K A C S L A K T A F
 gatgaagcaattgctgaattggatacgcctgaatgaagagtcttataaagacagcactctg
 D E A I A E L D T L N E E S Y K D S T L
 atcatgcagttacttagggacaatctcactctgtggacatcggaaaaccagggagacgaa
 I M Q L L R D N L T L W T S E N Q G D E
 ggagacgctggggagggagagaaacaaagcggccgc
 G D A G E G E N - A A

14-3-3 SIGMA (σ)

ggatccatggagagagccagctctgatccagaaggccaagctggcagagcaggccgaacgc
 G S M E R A S L I Q K A K L A E Q A E R
 tatgagacatggcagccttcatgaaaggcccgctggagaagggcgaggagctctcctgc
 Y E D M A A F M K G A V E K G E E L S C
 gaagagcgaaacctgctctcagtagcctataagaacgtggtggggcggccagagggctgcc
 E E R N L L S V A Y K N V V G G Q R A A
 tggaggggtgctgtccagtattgagcagaaaaagcaacgaggagggctcggaggagaagggg
 W R V L S S I E Q K S N E E G S E E K G
 cccgaggtgctgtagtaccgggagaaggtggagactgagctccagggcgtgtgacacacc
 P E V R E Y R E K V E T E L Q G V C D T
 gtgctgggcctgctggacagccacctcatcaaggaggccggggacgcccagagcggggtc
 V L G L L D S H L I K E A G D A E S R V
 ttctacctgaagatgaaggggtgactactaccgctacctggccgaggtggccaccgggtgac
 F Y L K M K G D Y Y R Y L A E V A T G D
 gacaagaagcgcattgactcagcccgtcagcctaccaggaggccatggacatcagc
 D K K R I I D S A R S A Y Q E A M D I S
 aagaaggagatgccgccaccaaccccatccgctgggctggccctgaacttttccgctc
 K K E M P P T N P I R L G L A L N F S V
 ttccactacgagatcgccaacagccccgaggaggccatctctctggccaagaccactttc
 F H Y E I A N S P E E A I S L A K T T F
 gacgagccatggctgatctgcacaccctcagcagaggactcctacaaagacagcaccctc
 D E A M A D L H T L S E D S Y K D S T L
 atcatgcagctgctgagagacaacctgacactgtggacggccgacaacgcccggggaagag
 I M Q L L R D N L T L W T A D N A G E E
 gggggcgaggctccccaggagccccagagctgagcggccgc
 G G E A P Q E P Q S - A A

14-3-3 GAMMA (γ)

ggatccatgggtgaccgcgagcaactggtgcagaaagcccggctggccgagcaggcggag
 G S M V D R E Q L V Q K A R L A E Q A E
 cgctacgacgacatggcccgccatgaagaacgtgacagagctgaatgagccactgtgc
 R Y D D M A A A M K N V T E L N E P L S
 aatgaggaacgaaaccttctgtctgtggcctacaagaacgttgtgggggacgcccgtct
 N E E R N L L S V A Y K N V V G A R R S
 tcctggaggggtcatcagtagcattgagcagaagacatctgcagacggcaatgagaagaag
 S W R V I S S I E Q K T S A D G N E K K
 attgagatggctccgtgctgacccgggagaagatagagaaggagttggaggctgtgtgccag
 I E M V R A Y R E K I E K E L E A V C Q
 gatgtgctgagcctgctggataactacctgatcaagaattgcagcagacccagtagcag
 D V L S L L D N Y L I K N C S E T Q Y E

agcaaagtgttctacctgaagatgaaaggggactactaccgctacctggctgaagtggcc
S K V F Y L K M K G D Y Y R Y L A E V A
accggagagaaaagggcgacgggtgggtggagtcctctgagaaggcctacagcgaagcccac
T G E K R A T V V E S S E K A Y S E A H
gagatcagcaaagagcacatgcagcccacccacccatccgattaggcctggctcttaac
E I S K E H M Q P T H P I R L G L A L N
tactccgtcttctactatgagatccagaacgccccagagcaagcgtgccacttggccaag
Y S V F Y Y E I Q N A P E Q A C H L A K
accggttgcagcagccatcgccgagcttgacaccctcaacgaggactcctacaaggac
T A F D D A I A E L D T L N E D S Y K D
tccacgctcatcatgcagctcctccgcgacaacctcacgctctggacgagcgcaccagcag
S T L I M Q L L R D N L T L W T S D Q Q
gacgacgatggcggcgaaggcaacaat **taagcgggccgc**
D D D G G E G N N - A A

14-3-3 ETA (η)

ggatccatggggggaccgggagcagctgctgcagcgggcgcggtggccgagcaggcggag
G S M G D R E Q L L Q R A R L A E Q A E
cgctacgacgacatggcctccgctatgaaggcggtgacagagctgaatgaacctctctcc
R Y D D M A S A M K A V T E L N E P L S
aatgaagatcgaaatctcctctctgtggcctacaagaatgtggttggtgccaggcgatct
N E D R N L L S V A Y K N V V G A R R S
tcttgagggggtcattagcagcattgagcagaaaacctggctgatggaaacgaaaagaaa
S W R V I S S I E Q K T M A D G N E K K
ttggagaaaagttaaagcttaccgggagaaagattgagaaggagctggagacagtttgcaat
L E K V K A Y R E K I E K E L E T V C N
gatgtcctgtctctgcttgacaagttcctgatcaagaactgcaatgatttccagtatgag
D V L S L L D K F L I K N C N D F Q Y E
agcaaggtgttttacctgaaaatgaagggtgattactaccgctacttagcagaggtcgcct
S K V F Y L K M K G D Y Y R Y L A E V A
tctgggggagaagaaaaacagtggtggtcgaagcttctgaagctgcctacaaggaagccttt
S G E K K N S V V E A S E A A Y K E A F
gaaatcagcaaagagcagatgcaacccacgcacccatccggctgggctggccctcaac
E I S K E Q M Q P T H P I R L G L A L N
ttctccgtgttctactatgagatccagaatgcacctgagcaagcctgcctcttagccaaa
F S V F Y Y E I Q N A P E Q A C L L A K
caagccttgcagatgacatagctgagctggacacactaaacgaggattcctataaggac
Q A F D D A I A E L D T L N E D S Y K D
tccacgctgatcatgcagttgctgcgagacaacctcacctctggacgagcgcaccagcag
S T L I M Q L L R D N L T L W T S D Q Q
gatgaagaagcaggagaaggcaac **tgagcgggccgc**
D E E A G E G N - A A

14-3-3 ZETA (ζ)

ggatccgataaaaatgagctggttcagaaggccaaactggccgagcaggctgagcgatat
G S D K N E L V Q K A K L A E Q A E R Y
gatgac **atg**gcagcctgcatgaagtctgtaactgagcaaggagctgaattatccaatgag
D D M A A C M K S V T E Q G A E L S N E
gagaggaatcttctcagttgcttataaaaatggtttaggagcccgtaggatccttgg
E R N L L S V A Y K N V V G A R R S S W
agggctcgtctcaagtattgaacaaaagacggaaggtgctgagaaaaaacagcagatggct
R V V S S I E Q K T E G A E K K Q Q M A
cgagaatacagagagaaaattgagacgggagcctaagagatatctgcaatgatgtactgtct

R E Y R E K I E T E L R D I C N D V L S
 cttttggaaaagttcttgatccccaatgcttcacaagcagagagcaaagtcttctatttg
 L L E K F L I P N A S Q A E S K V F Y L
 aaaatgaaaggagattactaccgttacttggctgaggttgccgctggtgatgacaagaaa
 K M K G D Y Y R Y L A E V A A G D D K K
 gggattgtcgatcagtcacaacaagcataccaagaagcttttgaaatcagcaaaaaggaa
 G I V D Q S Q Q A Y Q E A F E I S K K E
 atgcaaccaacacatcctatcagactgggtctggcccttaacttctctgtgttctattat
 M Q P T H P I R L G L A L N F S V F Y Y
 gagattctgaactccccagagaaaagcctgctctcttgcaaagacagcttttgatgaagcc
 E I L N S P E K A C S L A A K T A F D E A
 attgctgaacttgatacattaagtgaagagtcatacaaagacagcagcctaataatgcaa
 I A E L D T L S E E S Y K D S T L I M Q
 ttactgagagacaacttgacattgtggacatcgataccaaggagacgaagctgaagca
 L L R D N L T L W T S D T Q G D E A E A
 ggagaaggaggggaaaatcaaggatcc
 G E G G E N - G S

14-3-3 THETA (θ)

ggatccatggagaagactgagctgatccagaaggccaagctggccgagcaggccgagcgc
 G S M E K T E L I Q K A K L A E Q A E R
 tacgacgacatggccacctgcatgaaggcagtgaccgagcagggcgccgagctgtccaac
 Y D D M A T C M K A V T E Q G A E L S N
 gaggagcgaacctgctctccgtggcctacaagaacgtggtcgggggcccaggtccgcc
 E E R N L L S V A Y K N V V G G R R S A
 tggagggctcatctctagcatcgagcagaagaccgacacctccgacaagaagttgcagctg
 W R V I S S I E Q K T D T S D K K L Q L
 attaaggactatcgggagaaaagtgagtcaggagctgagatccatctgcaccacgggtgctg
 I K D Y R E K V E S E L R S I C T T V L
 gaattgttgataaaatatttaataagccaatgcaactaatccagagagtaaggtcttctat
 E L L D K Y L I A N A T N P E S K V F Y
 ctgaaaatgaagggtgattacttccggtaccttgctgaagttgcgtgtggtgatgatcga
 L K M K G D Y F R Y L A E V A C G D D R
 aaacaaacgatagataattcccaaggagcttaccaagaggcatttgatataagcaagaaa
 K Q T I D N S Q G A Y Q E A F D I S K K
 gagatgcaacccacacacccaatccgcctggggcttgccttaacttttctgtattttac
 E M Q P T H P I R L G L A L N F S V F Y
 tatgagattcttaataaccagagcttgctgcagctggctaaaacggcttttgatgag
 Y E I L N N P E L A C T L A K T A F D E
 gccattgctgaacttgatacactgaatgaagactcatacaaagacagcaccctcatcatg
 A I A E L D T L N E D S Y K D S T L I M
 cagttgcttagagacaacctaacactttggacatcagacagtgaggagaagaatgtgat
 Q L L R D N L T L W T S D S A G E E C D
 gcggcagaaggggctgaaaacaaagcggccgc
 A A E G A E N - A A

