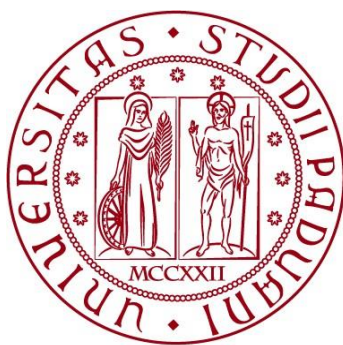


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Valutazione della complessità dell'albero dendritico
in neuroni con mutazione in LRRK2, un gene
associato alla malattia di Parkinson, ed effetto della
sovraespressione della proteina Sec8.**

Tutor: Prof.ssa Elisa Greggio

Dipartimento di Biologia "A. Vallisneri"

Co-tutor: Dott.ssa Lucia Iannotta

Dipartimento di Biologia "A. Vallisneri"

Laureanda: Milena Isabel Godoy Delgado

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

Abbreviazioni	3
Abstract	4
1. Introduzione.....	5
1.1 Malattia di Parkinson	5
1.2 LRRK2	7
1.3 Difetti di branching e neuritogenesi in modelli LRRK2	8
1.4 Sec8: Funzione e interazione con LRRK2.	9
2. Scopo del progetto	11
3. Metodi e materiali.....	12
3.1 Colture primarie di neuroni	12
3.2 Fissaggio dei neuroni	13
3.3 Immunocitochimica	13
3.4 Tracing dei neuriti e Sholl Analysis.....	14
4. Risultati.....	15
4.1 Osservazione delle co-culture dei neuroni	15
4.2 Effetto della mutazione G2019S sulla complessità dell'albero dendritico in vitro	15
4.3 Effetto della sovraespressione di Sec8 sui difetti di branching mediati da Lrkk2 G2019S.....	17
5. Discussione e Conclusioni.....	20
6. Bibliografia.....	21

Abbreviazioni

ANK	Ankyrin-like repeat region
ARM	Amadillo repeat region
COR	C-terminal or Roc
DA	Dopaminergic neurons
FBS	Fetal Bovine Serum
hiPSC	Human Induced Pluripotent Stem Cell
ICC	Immunocytochemistry
iMP	Malattia di Parkinson idiopatica
LRR	Leucine-rich repeat region
LRRK2	Leucine rich repeat kinase 2
MP	Malattia di Parkinson
MT	Microtubules
PAK6	p-21-activated kinase 6
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDL	Poly-D-Lysine
PDZ	PDZ Domain
PSD95	Postsynaptic density protein 95
ROC	Ras of Complex
WT	Wild Type

Abstract

La malattia di Parkinson (MP) è la malattia neurodegenerativa più comune dopo l'Alzheimer. Nelle forme familiari sono state caratterizzate varianti del gene LRRK2. Sebbene i meccanismi alla base della malattia non siano del tutto chiari, la patogenicità di alcune varianti è ben nota. È necessario, perciò, chiarire il ruolo fisiologico della proteina LRRK2 e capire come questa sia coinvolta nella patogenesi della malattia.

G2019S è una delle mutazioni più comuni coinvolte nella malattia di Parkinson-LRRK2. Analisi preliminari effettuate nel laboratorio dove ho svolto il tirocinio hanno dimostrato che questa mutazione causa una diminuzione della lunghezza dei prolungamenti e una arborizzazione meno complessa di cellule primarie. Attraverso la coltura di neuroni, tecniche di immunocitochimica e l'acquisizione di immagini al microscopio a fluorescenza e analisi con il software ImageJ.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di confermare le differenze nei prolungamenti dei neuroni tra il genotipo *wild-type* con LRRK2 G2019S e di valutare se la sovraespressione di Sec8 fosse in grado di correggere il fenotipo associato a LRRK2 mutata.

LRRK2, infatti, interagisce con la proteina Sec8, una subunità del complesso proteico chiamato esocitosi. Queste proteine svolgono un ruolo nel traffico di vescicole secretorie, importante nella fisiologia neuronale.

1. Introduzione

1.1 Malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (MP) è il disturbo neurodegenerativo del movimento più comune. I fattori di rischio includono l'età (è il fattore più importante) e alcuni fattori ambientali. Diverse evidenze indicano il sesso biologico come un fattore rilevante nello sviluppo e nell'espressione fenotipica della malattia di Parkinson. Il rischio di sviluppare la MP è infatti due volte superiore negli uomini rispetto alle donne, ma le donne hanno un tasso di mortalità più alto e una progressione più rapida della malattia.¹

L'eziologia della malattia nella maggior parte dei pazienti è sconosciuta, ma sono state identificate diverse cause genetiche. Molti fattori ambientali e genetici influenzano il rischio della malattia di Parkinson, con diversi fattori che predominano nei diversi pazienti. Questi fattori hanno dei percorsi specifici, tra cui disfunzione mitocondriale, stress ossidativo, aggregazione proteica, alterata autofagia e neuro-infiammazione.

Sebbene le forme familiari della MP rappresentino solo il 5-15% dei casi, gli studi su queste famiglie hanno fornito informazioni interessanti sulla genetica e sulla patogenesi della malattia consentendo l'identificazione dei geni implicati nella sua patogenesi e offrendo spunti critici sui meccanismi della malattia.²

I sintomi motori della MP sono tremore, rigidità, bradicinesia/acinesia e instabilità posturale, ma il quadro clinico include anche sintomi non motori.

Complessivamente, la sintomatologia della MP dipende dalla morte dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta*, integrati in circuiti importanti per il controllo dei movimenti volontari. I corpi di Lewy sono inclusioni intra-neuronali composte principalmente da aggregati di α -sinucleina e ubiquitina.³ È stato dimostrato che fino al 60% dei neuroni dopaminergici sono già degenerati nel momento in cui i sintomi motori compaiono. Inoltre, l' α -sinucleina tende a diffondere attraverso i neuroni in modo simile a un prione e questo meccanismo di trasmissione è probabilmente alla base della progressione delle alterazioni patologiche.

SNCA è il gene che codifica l' α -sinucleina. È stato il primo gene legato alla malattia di Parkinson e A53T è stata la prima mutazione patogena identificata. Questa mutazione, conferisce all' α -sinucleina una maggiore tendenza a ripiegarsi male e ad aggregarsi rispetto alla proteina *wild-type*. Altre mutazioni di SNCA influenzano la quantità di α -sinucleina alterandone la sua espressione, le modifiche post-trascrizionali, la sua interazione con altri organelli cellulari e sistemi di trasporto.^{3,4} (Figura 1)³.

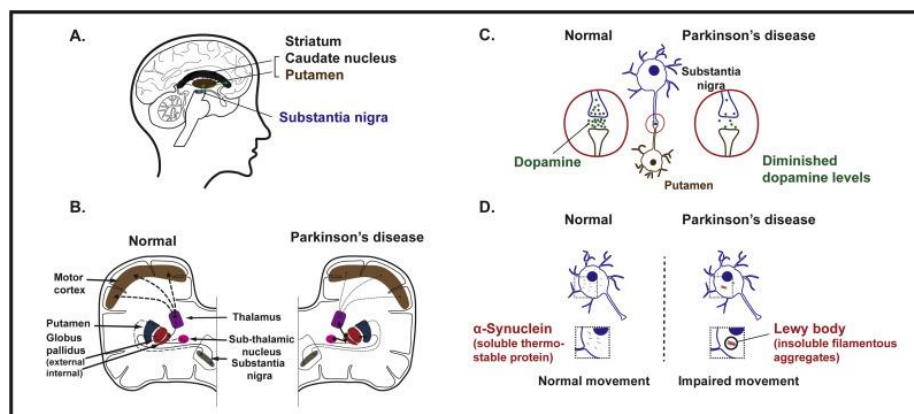


Figura 1. Le vie dopaminergiche, basi neurochimiche e neuropatologiche del morbo di Parkinson. Immagine che illustra la produzione di dopamina da Substantia nigra (blu) e la trasmissione sinaptica (verde) allo striato (A). La via dopaminergica con la normale stimolazione del bersaglio (linee tratteggiate) e la soppressione del bersaglio (linea continua) nel cervello normale, mentre la substantia nigra degenerata nel morbo di Parkinson altera i circuiti cortico-striatali portando all'induzione dei sintomi associati (B). La ridotta produzione di dopamina dai neuroni dopaminergici di Substantia nigra (C) e la formazione di aggregati di α -sinucleina come corpi di Lewy (D) portano ai disturbi del movimento, caratterizzati come sintomi di PD. (Raza, C. & Anjum R. & Shakeel N, 2019, ³)

Un altro meccanismo chiave alterato nella MP è la funzionalità mitocondriale. PINK1 e PARKIN, due geni mutati in forme familiari di MP, interagiscono in una via di controllo della qualità dei mitocondri.⁵

Diverse evidenze indicano il collegamento tra la MP e la disfunzione delle vie di clearance cellulare; diversi geni legati all'autofagia sono stati infatti associati alla MP. Mutazioni nel gene LRRK2 responsabili di forme familiari di malattia, interferiscono con il processo autofagico, rallentando la degradazione dell' α -sinucleina e contribuendo così al suo accumulo.

Le mutazioni in LRRK2 associate a un'attività della chinasi potenziata in modo anomalo sono la causa più comune della forma genetica della MP. Inoltre, studi recenti indicano un ruolo dell'elevata attività della chinasi LRRK2 anche nelle forme di malattia idiopatiche, dove non sono presenti mutazioni in questo gene, supportando ulteriormente il coinvolgimento dell'iperattività di LRRK2 nella malattia. La maggiore attività della chinasi LRRK2 nella MP idiopatica sembra innalzare lo stress ossidativo e lo stress endolisomiale.⁶

L'architettura di LRRK2 influenza l'attivazione della chinasi e una maggiore fosforilazione dei substrati di LRRK2 (un gruppo di GTPasi RAB) potrebbe contribuire alla patogenesi della MP.

Mentre le mutazioni in LRRK2 associate all'aumento dell'attività della chinasi sono la causa più comune della MP autosomica dominante, il ruolo di LRRK2 nella MP idiopatica (iMP), indipendentemente dalle mutazioni, rimane incerto.⁶

1.2 LRRK2

Il gene LRRK2 codifica per una proteina denominata *Leucine-rich repeat kinase 2*, è localizzata nel cervello e altri tessuti del corpo, ma la sua funzione non è ancora del tutto nota. Questa proteina possiede un'attività chinasi, è, infatti, capace di trasferire un gruppo fosfato a specifici amminoacidi di proteine target.

LRRK2 è un grande enzima multi-dominio di 2527 amminoacidi, caratterizzato dalla presenza di un core e diversi domini principalmente coinvolti nelle interazioni proteina-proteina. Il nucleo catalitico è costituito di un dominio serina-treonina chinasi, un dominio Ras-of-complex (ROC) con attività GTPasi e il dominio C-terminale ROC (COR) tra le due unità enzimatiche. Oltre a un nucleo catalitico, LRRK2 ospita anche quattro domini di interazione proteina-proteina conservati: *armadillo repeats* (ARM), *ankyrin repeats* (ANK), *leucine-rich-domain* (LRR) e dominio WD40. Diverse ricerche hanno evidenziato che LRRK2 è parte di una complessa via di segnalazione che modula l'attività neuronale agendo sul meccanismo che regola la trasmissione del segnale nervoso.⁷ (Figura 2)⁷.

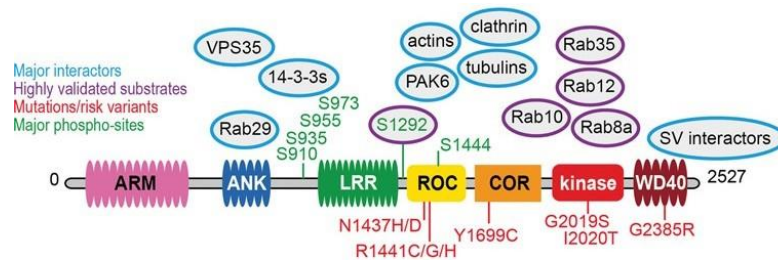


Figura 2: Immagine rappresentativa della localizzazione delle principali varianti di LRRK2 associate alla MP (in rosso) (Iannotta, L. & Greggio, E., 2021, ⁷). Alcune varianti come G2019S si trovano nel dominio chinasi, aumentandone l'attività.

Le mutazioni nel gene LRRK2, che codifica per LRRK2, sono una causa della MP autosomica dominante e il gene è emerso come uno dei più importanti da associare alla MP familiare e idiopatica. A differenza di altre forme monogeniche autosomiche dominanti della MP, come quelle legate a mutazioni nel gene che codifica per l' α -sinucleina, la MP associata a LRRK2 è relativamente comune, in particolare in specifici gruppi etnici. Mutazioni nel dominio chinasi di LRRK2 causano la forma genetica della MP che corrisponde all'1-2% di tutti i casi conosciuti della MP.

La maggior parte dei pazienti con LRRK2 presenta la mutazione G2019S, che è associata a cambiamenti neuropatologici generalmente simili a quello che si verificano nella iMP. Quasi tutte le varianti patogene sono rare e si trovano solo in poche famiglie e in certe popolazioni, mentre la mutazione G2019S, che è la più comune rappresenta il 4% dei casi familiari e l'1% dei casi sporadici della MP nel mondo. Questa mutazione è stata descritta ampiamente negli europei ed è molto comune in alcune popolazioni, come gli ebrei Ashkenaziti o i berberi Nordafricani, in queste popolazioni, rappresenta rispettivamente il 29% e il 37% dei pazienti con MP familiare.

LRRK2 è una proteina grande multifunzionale che ha vari domini di interazione, la mutazione G2019S si trova nel dominio della chinasi, adiacente al dominio GTPasi *Ras-of-complex* (Roc), dove si trovano le mutazioni A1441C/G/H. Altre mutazioni si trovano in altri domini. Studi recenti dimostrano che la mutazione G2019S causa un aumento tossico dell'attività della chinasi LRRK2, dato questo aumento patologico della funzione della chinasi, attuali approcci terapeutici si sono concentrati sullo sviluppo di inibitori della chinasi LRRK2. Sono state infatti sviluppati delle molecole che sono attualmente al vaglio attraverso sperimentazione clinica.

La proteina LRRK2 è espressa prevalentemente nel tessuto nervoso, sistema respiratorio, sistema immunitario e nei reni, quindi l'inibizione della chinasi potrebbe portare a effetti periferici. Infatti, studi tossicologici nei roditori e in primati, però, hanno evidenziato effetti avversi nei polmoni e nei reni.

È importante segnalare che l'età di esordio della MP associata alla mutazione G2019S è leggermente inferiore a quella di iMP. Diversi studi suggeriscono anche che la tipica predominanza maschile tra pazienti con iMP non si riscontri nella MP-LRRK2.⁸

Studi hanno evidenziato che la progressione dei sintomi motori è più lenta negli individui con la mutazione G2019S, rispetto a quelli con iMP. Esiste una fase premotoria o prediagnostica in cui alcuni sintomi e segni di neuro-degenerazione sono evidenti, ma sono per lo più sintomi non motori, come iposmia, costipazione, disturbi del sonno e depressione. Questa fase precede l'insorgenza dei sintomi motori classici nella maggior parte dei casi di iMP. Diversi studi dimostrano che l'iposmia è meno comune tra i pazienti con mutazione in LRRK2 rispetto ai pazienti con iMP.⁸

MP-LRRK2 e iMP rispondono in modo simile al trattamento dopaminergico. Anche la risposta di LRRK2 alla stimolazione cerebrale profonda è simile a quella di iMP.

1.3 Difetti di branching e neuritogenesi in modelli LRRK2

La MP è caratterizzata principalmente dalla progressiva perdita di neuroni dopaminergici (DA) nella *substantia nigra pars-compact*, con conseguente diminuzione del rilascio di dopamina e insorgenza di disfunzioni motorie.

LRRK2 interagisce e fosforila i microtubuli (MT) in vitro, la fosforilazione degli MT promuove la loro stabilizzazione. Questa attività potrebbe contribuire alla neuritogenesi. Un eccesso di attività chinasica in presenza della mutazione G2019S provoca l'accorciamento dei neuriti precedentemente dimostrato nel nostro laboratorio¹⁰ e in altri laboratorio.

È stato fatto un esperimento con delle cellule umane staminali pluripotenti (hiPSC) derivate da biopsie cutanee di pazienti portatori della mutazione G2019S. In questi studi i DA sono stati differenziati dalle hiPSC e per vedere se fosse possibile osservare i difetti dello sviluppo precoce nei neuroni DA, sono stati riprogrammati gli hiPSC di tre donatori sani e tre pazienti non imparentati con diagnosi di MP familiare portatori della mutazione G2019S. Si è dimostrato che nelle prime fasi della differenziazione, i neuroni DA differenzianti G2019S presentano una

significativa riduzione della lunghezza neuritica totale, un albero neuritico più complesso rispetto ai controlli e infine morte cellulare apoptotica. Al contrario, i neuroni carenti di LRRK2 hanno processi neuritici con una maggiore ramificazione.⁹

È presente un'altra proteina chiamata *p21-activated kinase 6* (PAK6) che interagisce con il dominio GTPasi/ROC di LRRK2. Le chinasi attivate da p21 sono serina-treonina chinasi e fungono da bersagli per le piccole proteine leganti GTP Cdc42 e Rac1, queste proteine sono state implicate in diversi processi morfogenetici attraverso il rimodellamento del citoscheletro di actina come la formazione di sinapsi e la neuritogenesi. PAK6 è un regolatore positivo della crescita dei neuriti.¹⁰

La PAK6 interagisce con LRRK2. In condizioni normali, PAK6 regola la complessità dei neuriti nel cervello e LRRK2 è necessario per la sua funzione. È stato anche scoperto che PAK6 è iperattivo nel cervello *post mortem* G2019S e MP idiopatico (iMP) rispetto ai controlli normali, evidenziando PAK6 come un nuovo bersaglio farmacologico nella MP.¹⁰

1.4 Sec8: Funzione e interazione con LRRK2.

L'esocisti è un complesso proteico eteroottomero conservato che include alcune subunità, tra cui Sec8. Questa subunità ha un ruolo molto importante nel traffico dinamico delle vescicole secretorie verso domini di membrana specializzati sia durante la crescita dei neuriti e la sinaptogenesi, che nelle sinapsi mature. Nei neuroni questo processo è molto importante perché sia la localizzazione proteica regolata sulla membrana plasmatica di assoni e dendriti sia il corretto rilascio di proteine mediano la comunicazione neuronale e sono alla base di tutte le funzioni del sistema nervoso.

L'esocitosi e i suoi sottocomplessi fungono da piattaforme fisiche che coordinano l'assemblaggio degli organelli con l'attivazione delle cascate regolatorie necessarie per l'esecuzione di programmi biologici cellulari distinti come la migrazione cellulare, la formazione di invadopodi, la citochinesi, l'assorbimento del glucosio e lo sviluppo neurale.

Il gene che codifica per Sec8 è una proteina multidominio da 110kDa e contiene 974 aminoacidi. Sec8 è espresso in tutto il cervello e non c'è alcuna variazione regionale significativa nelle diverse aree cerebrali. Il knockout del gene Sec8 nel topo è letale negli stadi iniziali di sviluppo embrionale: infatti, gli embrioni mutanti iniziano la gastrulazione ma non sono in grado di progredire oltre lo stadio della stria primitiva.

Sec8 si lega alla proteina di densità postsinaptica 95 (PSD95) dalla regione c-terminale, che contiene un dominio di legame PDZ. PSD95 svolge un ruolo fondamentale della struttura sinaptica e nella plasticità sinaptica. Inoltre, Sec8 è essenziale per il targeting appropriato alla membrana cellulare del recettore AMPAR e il recettore NMDAR. Quest'ultimo è mediato dall'interazione del dominio di legame Sec8 PDZ con la proteina associata alla sinapsi (SAP) 102. Infine, le subunità eso70 e Sec8 del complesso dell'esocisti si associano

direttamente al dominio intracellulare di NCAM140. NCAM promuove la fosforilazione di Sec8 ed è necessaria nel complesso di esocisti nei coni di crescita. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che LRRK2 potrebbe avere un ruolo importante nel traffico di vescicole, probabilmente dalla fosforilazione di Rab, che a sua volta è importante nella fisiologia neuronale.¹¹ L'alterazione del traffico di vescicole sinaptiche sembra infatti un meccanismo patologico comune nella MP. Molti interattori proteici LRRK2 appartengono a famiglie di proteine coinvolte nella regolazione del traffico di vescicole, ad esempio Rab3, EndoA, NSF, sinapsina I e proteine implicate nella dinamica del citoscheletro.⁷ LRRK2 interagisce con Sec8, regolando l'assemblaggio della subunità e a sua volta la sovraespressione di Sec8 corregge l'effetto patologico del mutante G2019S in cellule PC12.¹¹ Infatti, LRRK2 potrebbe avere importanti implicazioni per decodificare il ruolo complesso che LRRK2 svolge nella fisiologia neuronale. Tuttavia, sono necessari esperimenti futuri per identificare nel dettaglio il meccanismo molecolare mediante il quale il dominio della chinasi LRRK2 regola l'assemblaggio e la funzione del complesso di esocisti. È stato dimostrato che Sec8 e LRRK2 fanno parte dello stesso complesso proteico. Infatti, la mancanza della parte c-terminale della proteina Sec8 porta alla perdita dell'interazione della proteina LRRK2. Così come l'assenza del dominio chinasi di LRRK2 riduce fortemente il legame con Sec8, sebbene questa interazione non sia completamente persa, suggerendo che altri domini proteici di LRRK2 siano coinvolti nell'interazione. Sec8 è inoltre un substrato diretto dell'attività della chinasi LRRK2.¹¹

2. Scopo del progetto

Studi precedenti eseguiti in diversi laboratori, tra cui quello dove ho svolto il tirocinio, hanno permesso di evidenziare LRRK2 come possibile protagonista nell'insorgenza della malattia di Parkinson. Questa patologia è principalmente dovuta alla morte progressiva dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra*. Normalmente, grazie al trasportatore della dopamina (DAT), le fibre di neuroni nigrostriatali sono in grado di riassorbire il neurotrasmettitore dopamina nello spazio sinaptico, e così, di condurre la trasmissione dopaminergica lungo le aree del SNC preposte al controllo del movimento. Nei pazienti affetti dalla malattia di Parkinson, però, la perdita delle innervazioni dopaminergiche causa una diminuzione di dopamina rilasciata in grado di stimolare i neuroni nigrostriatali coinvolti nel controllo del movimento volontario, e una conseguente alterazione nella normale via di segnalazione. Una disfunzione precoce a livello del riassorbimento (da parte del DAT) di neurotrasmettitori potenzialmente tossici, come la dopamina, potrebbe contribuire alla degenerazione neuronale.

Mutazioni nel gene LRRK2 sono una delle principali cause della MP genetico, e numerosi studi indicano che l'elevata attività della chinasi giochi un ruolo chiave nell'insorgenza della MP familiare, mentre il ruolo di LRRK2 associato alla MP idiopatica rimane ancora sconosciuto. Per questo motivo è fondamentale capire come la proteina LRRK2 mutata sia coinvolta nella MP, attraverso lo studio della sua funzione in condizioni normali e patologiche.

In questo lavoro di tirocinio, si è indagato se i neuroni primari isolati da topi con la mutazione G2019S knockin presentino il difetto di branching come è stato visto nei neuroni che over-esprimono LRRK2 mutata. A questo proposito, dati preliminari ottenuti dal laboratorio nel quale questo progetto di tesi è stato svolto, hanno dimostrato che i neuroni con la mutazione G2019S mostrano una significativa riduzione della lunghezza neuritica totale e un arborizzazione meno complessa, fenotipo che potrebbe contribuire alla patogenesi della malattia.

Un interattore importante di LRRK2 è la proteina Sec8. Questa proteina è coinvolta nell'omeostasi sinaptica, nel traffico vescicolare ed è stata dimostrata la sua interazione con LRRK2. Il secondo scopo di questo progetto è stato quello di verificare se Sec8 promuove il branching nei neuroni con la mutazione G2019S, correggendo quindi il fenotipo patologico.

3. Metodi e materiali

3.1 Colture primarie di neuroni

Durante il procedimento delle colture primarie è stata usata una piastra Multiwell da 24 pozzetti contenenti vetrini rotondi, precedentemente trattato con 0,5mL di poli-D-lisina (PDL, una molecola che facilita l'adesione cellulare perché in grado di variare le cariche superficiali della piastra), per due ore e a 37°C. Successivamente i vetrini sono stati sciacquati per tre volte con acqua distillata e PBS, e sono stati lasciati ad asciugare al buio.

In seguito alla preparazione di tutte le soluzioni (le cui composizioni si trovano nella (Tabella1) e i materiali necessari, si può procedere con la dissezione di 12 cervelli di cuccioli di topo (6 per ogni genotipo, topi wild-type LRRK2 e topi knock-in per LRRK2). I pups sono stati anestetizzati in ghiaccio, disinfettati con etanolo al 70% e sacrificati tramite decapitazione. Dopo aver estratto il cervello, il cranio è stato tagliato in modo da poter accedere al cervello ed estrarlo. Quest'ultimo è stato estratto con una pinza a punta piatta e poi appoggiato su piatti contenente PBS freddo, sono stati utilizzati due piatti per separare i due genotipi. Successivamente, con l'utilizzo del microscopio stereoscopico sono state separate le diverse regioni del cervello tramite dissezione al fine di isolare le cortecce. Dopo aver rimosso il PBS, gli emisferi della corteccia sono stati suddivisi (a due a due) in modo da ottenere 3 colture indipendenti per ogni genotipo e triturati in piccoli pezzi.

In condizioni di sterilità, i tessuti triturati sono stati, quindi, trasferiti in una provetta Falcon contenente la Papain solution per ottenere una migliore separazione delle cellule. La soluzione ottenuta è stata risospesa per 10 volte con una pipetta da 5mL, ed infine incubata a 37°C per 40 minuti, mixando tramite inversione ogni 10 minuti. Successivamente, il pellet è stato risospeso un'altra volta per 10 volte con un'altra pipetta da 5mL, incubato per 10 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugato a 1000rpm per 5 minuti per poi rimuovere il surnatante. In seguito, sono stati aggiunti 3mL di STOP solution in ogni tubo Falcon, in modo da bloccare l'attività enzimatica, e, dopo aver risospeso il tutto per tre volte, le provette sono state incubate a temperatura ambiente per 10 minuti, per decantare eventuali pezzi tissutali non dissociati. A quel punto, il surnatante è stato prelevato e trasferito in una provetta Falcon contenente 5mL di soluzione 10/10, necessaria per inibire eventuali proteasi rilasciate dalla dissociazione meccanica dei tessuti e così, evitare la loro azione su proteine cellulari. Quest'ultima è stata centrifugata a 800rpm per 10 minuti; infine, il surnatante è stato scartato e il nuovo pellet di cellule è stato risospeso in 5mL di Neurobasal® complete medium.

A questo punto, dopo averle diluite in Trypan blue (con una diluizione di 1:10), le cellule sono state contate grazie all'utilizzo della camera di Burker ed il numero totale delle cellule presenti nella preparazione è stato calcolato mediante la formula:

$$\text{cellule / ml} = \text{media cellule contate} * \text{fattore di diluizione} * 10000$$

Una volta ottenuto il numero totale di cellule per ogni genotipo, sono stati seminati 1.5 milioni di neuroni in una piastra da 6 pozzetti e 200 000 neuroni in una piastra da 24 pozzetti contenenti i vetrini copri-oggetto preparati in precedenza. Le piastre

contenenti le colture sono quindi state poste in incubatore in condizioni costanti di temperatura (37°C) e CO₂ (5%). Ogni 4 giorni a partire dal giorno della preparazione delle colture, il terreno condizionato è stato prelevato e filtrato attraverso l'utilizzo di una siringa e un filtro da siringa da 0.45µm in modo da eliminare eventuali detriti cellulari e, allo stesso tempo, trattenere fattori di crescita prodotti e rilasciati dai neuroni necessari per il corretto sostentamento della coltura cellulare. Il terreno filtrato, è stato mescolato con terreno fresco in proporzione 1:1.

Tabella 1: Soluzioni utilizzate per realizzare le colture primarie di neuroni

Soluzione	Composizione
<i>Dissection medium</i>	500ml HBSS, 5ml 1M HEPES pH7.3, 0.1% D-glucose, 5ml Sodium pyruvate
<i>DNase solution</i>	500ul/vial EBSS
<i>Papain solution</i>	5ml/vial EBSS, 250ul DNase solution
<i>Trypsin inhibitor solution</i>	15.5mg Trypsin inhibitor
<i>STOP solution</i>	5.4ml EBSS, 250ul DNase solution, 600ul Trypsin inhibitor solution
<i>10/10 solution</i>	10ml EBSS, 0.1g Trypsin inhibitor, 0.1g BSA
<i>Plating medium</i>	48.5ul Neurobasal (Gibco), 125ul L-Glutamine (Gibco), 1ml B27 (Gibco), 0.5ml Pen/Strep (Gibco)

3.2 Fissaggio dei neuroni

Passati 7 giorni (DIV 7), i neuroni sono stati lavati 3 volte con PBS 1X e fissati con 300ml di paraformaldeide (PFA) al 4% per 20 minuti a temperatura ambiente (RT). Al termine dell'incubazione, la PFA è stata rimossa, i neuroni sono stati lavati 3 volte con PBS 1X e quindi processati per l'analisi di immunocitochimica.

3.3 Immunocitochimica

I neuroni fissati sono stati sottoposti a un protocollo di immunocitochimica usando diversi anticorpi primari, con i quali è possibile analizzare i neuroni al microscopio a fluorescenza, visualizzando la loro morfologia e, nello specifico, la struttura, lunghezza e arborizzazione delle ramificazioni.

Dopo la fissazione, i neuroni sono stati permeabilizzati utilizzando la soluzione di 0.1% Triton X-100 in PBS 1X per 20 minuti a temperatura ambiente (RT), Triton X-100 è un detergente che permette di destabilizzare le membrane delle cellule fissate, permettendo così all'anticorpo di entrare nelle cellule e legare l'epitopo specifico. Successivamente, è stata preparata la soluzione di blocking (5% di siero fetale bovino (FBS) in PBS 1X) e le piastre sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente. Questo passaggio è importante perché aiuta a mascherare i siti aspecifici presenti sulle proteine cellulari, al fine di facilitare il riconoscimento anticorpo primario-sito target, riducendo l'eventuale comparsa di un background.

In seguito, i vetrini sono stati incubati per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo primario (anti-Flag #F1804, Sigma Aldrich) diluito in soluzione di blocking in proporzione 1:400. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, i vetrini sono stati lavati tre volte con PBS 1X e incubati con l'anticorpo secondario di anti-mouse Alexa Fluor568 (Thermo Fisher Scientific) diluito in proporzione di 1:200 (Tabella 2). Dopo 1 ora a temperatura ambiente, i vetrini sono stati lavati tre volte con PBS 1X e incubati con il colorante Hoechst diluito 1:10 000 in PBS 1X per 5 minuti a temperatura ambiente per marcare i nuclei. Dopo altri tre lavaggi con PBS 1X, i vetrini copri oggetto sono stati quindi montati su vetrini porta-oggetto con 3 μ L di Mowiol (Calbiochem). Le immagini, sono state acquisite ad un ingrandimento 40X, sono state acquisite utilizzando un microscopio a fluorescenza Leica DM6.

Tabella 2: Anticorpi primari e secondari utilizzati per l'immunocitochimica

<i>Anticorpo primario</i>	<i>Diluizione</i>
Anti-flag #F1804	1:400
<i>Anticorpo secondario</i>	<i>Diluizione</i>
Anti-mouse Alexa Fluor 568	1:200

3.4 Tracing dei neuriti e Sholl Analysis

Per determinare la differenza nella lunghezza, arborizzazione e numero delle ramificazioni tra i neuroni wild-type e i neuroni LRRK2 G2019S, le immagini sono state analizzate utilizzando il software ImageJ. Nel dettaglio, tramite l'utilizzo del suo plug-in NeuronJ, sono state tracciate manualmente le ramificazioni dei diversi neuroni e il programma automaticamente ha misurato e fornito i dati riguardanti la loro lunghezza. Utilizzando inoltre un altro plug-in del software ImageJ, chiamato Sholl Analysis, è stato possibile valutare l'arborizzazione e la complessità dei neuroni: sfruttando i parametri stabiliti dall'operatore (raggio del cerchio = 5 μ m, raggio finale = 500 μ m), questo plug-in realizza diversi cerchi concentrici a distanza fissa che partono dal soma del neurone e restituisce il numero di intersezioni dei dendriti con i diversi cerchi.

4. Risultati

4.1 Osservazione delle co-culture dei neuroni

Dopo il trattamento mediante il protocollo di immunocitochimica, i neuroni derivati dalle colture primarie dei due genotipi oggetto di studio (WT e knock-in per LRRK2), scegliendo di utilizzare l'anticorpo primario anti-flag F1804 che è stato riconosciuto da un anticorpo secondario anti-rabbit Alexa Fluor568, sono stati osservati al microscopio a fluorescenza Leica DM6. Sono state ottenute quindi delle immagini che sono state successivamente analizzate mediante l'utilizzo dell'applicazione Fiji, estensione del programma ImageJ.

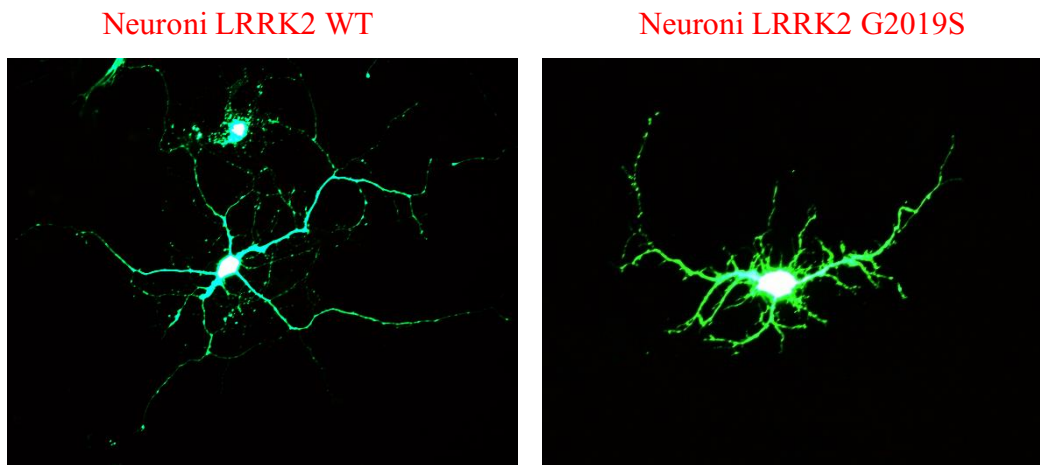


Figura 3: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza Leica DM6 che rappresentano neuroni *wild-type* (sinistra) e neuroni knock-in G2019S Lrkk2.

È stato possibile osservare i due tipi cellulari e la grande differenza dei loro prolungamenti, le ramificazioni dei neuroni LRRK2 G2019S sono più corte e si trovano in maggiore quantità. Questo potrebbe non permettere ai neuroni di assicurare una corretta neurotrasmissione di impulsi, di informazione e comunicazione con altri neuroni.

4.2 Effetto della mutazione G2019S sulla complessità dell'albero dendritico in vitro

Dopo aver eseguito la trasfezione neuronale con un plasmide codificante per GFP in grado di tracciare accuratamente il citoplasma e l'osservazione al microscopio a fluorescenza, sono state acquistate immagini, di neuroni WT, neuroni con la mutazione LRRK2 G2019S. I neuroni portatori della mutazione LRRK2 G2019S mostrano una significativa riduzione della lunghezza neuritica totale (Figura 5). Ognuna delle immagini acquisite al microscopio a fluorescenza è stata analizzata mediante il programma NeuronJ: per ogni neurone, si sono tracciati manualmente i prolungamenti dei neuriti, una volta finita l'operazione di tracing, il programma ha fornito i dati riguardanti la lunghezza di ogni singolo tracciato e anche il numero totale.

Successivamente è stata condotta un'analisi statistica, mediante t-test, ponendo il limite di significatività $p = 0.05$, al fine di confrontare le due condizioni sperimentali (genotipo WT vs G2019S) e verificare se un'eventuale differenza fosse pura casualità o potesse rappresentare un risultato significativo, questo test ha consentito di confrontare i risultati riferiti alle due diverse condizioni di crescita. (Figura 5). Il test statistico indica che i processi dei neuroni G2019S sono significativamente più corti.

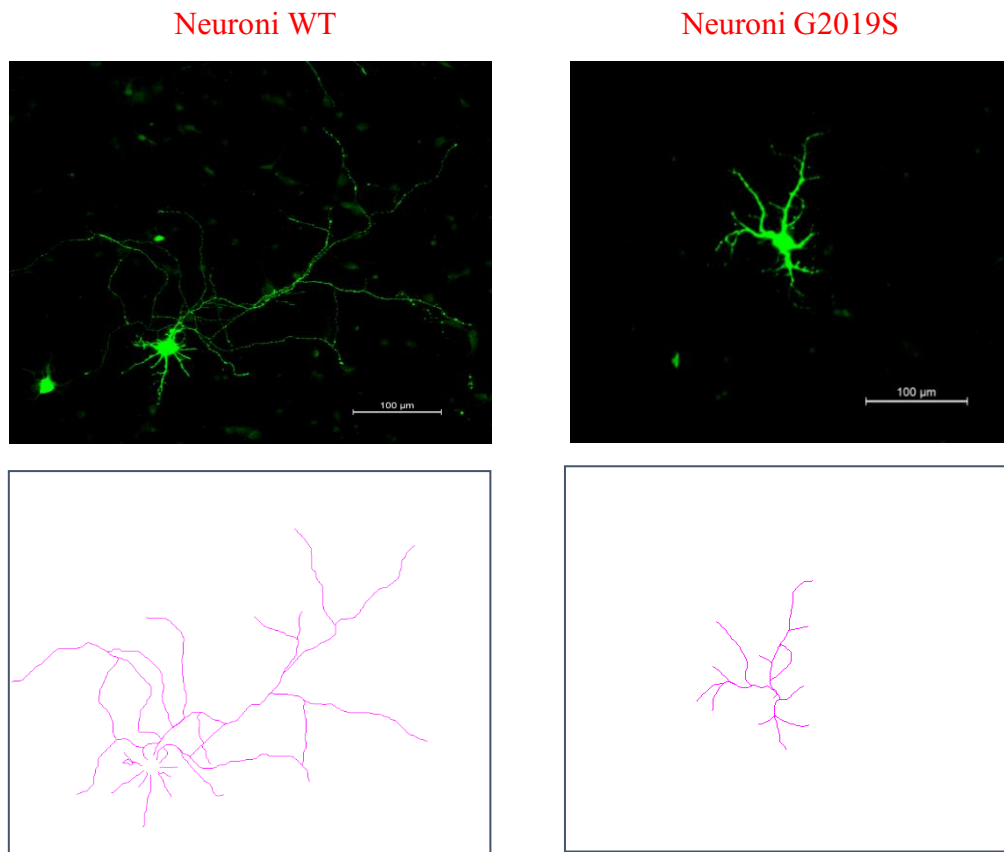


Figura 4: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza, lavorando sul canale specifico per visualizzare la GFP. Rappresentazione di un neurone wild-type (in alto a sinistra) e di un neurone con la mutazione G2019S (in alto a destra). Entrambe le immagini sono accompagnate dal rispettivo tracciato di neuriti (in basso).

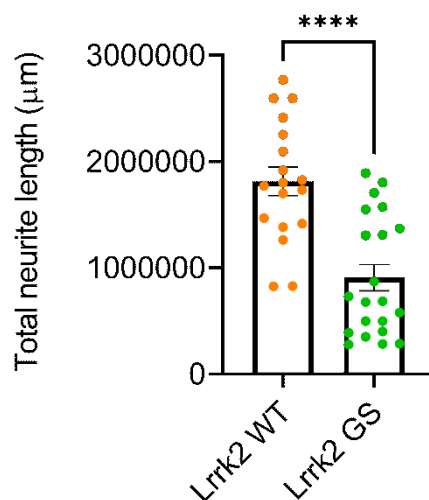


Figura 5: Quantificazione del numero di neuriti wild-type (in arancione) e con la mutazione G2019S (in verde) per LRRK2. **** indica il livello di significatività statistica, per cui, in questo caso, $p < 0.0001$.

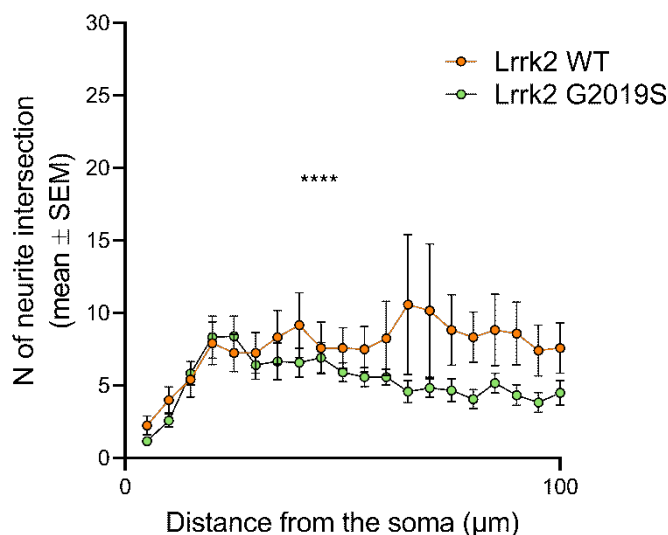


Figura 6: Grafico rappresentativo del numero di intersezioni di wild-type e LRRK2 G2019S mediante analisi di Sholl. Si può vedere che i processi dei neuroni LRRK2 G2019S presentano un numero ridotto di intersezioni rispetto ai neuroni wild-type.

4.3 Effetto della sovraespressione di Sec8 sui difetti di branching mediati da Lrrk2 G2019S

I neuroni WT e G2019S sono stati anche trasfettati Sec8, pertanto è stato valutato se Sec8 fosse in grado di recuperare i difetti di branching nei neuroni G2019S. Dopo l'acquisizione delle immagini ottenute al microscopio a fluorescenza, è stato visto che Sec8, promuove il branching e la crescita dei neuroni WT. Mentre che Sec8 promuove la crescita dei neuriti in WT, nella condizione con la mutazione G2019S, che parte già con meno neuriti, Sec8 non riesce a correggere questo difetto. Sembra essere che la capacità di Sec8 di far crescere i neuriti sia indipendente dal

difetto di LRRK2 G2019S nel bloccare questa crescita. Per questo tipo di analisi abbiamo utilizzato la Sholl analysis (Plugin NeuronJ) che fornisce indicazioni sulla complessità (numero di intersezioni).

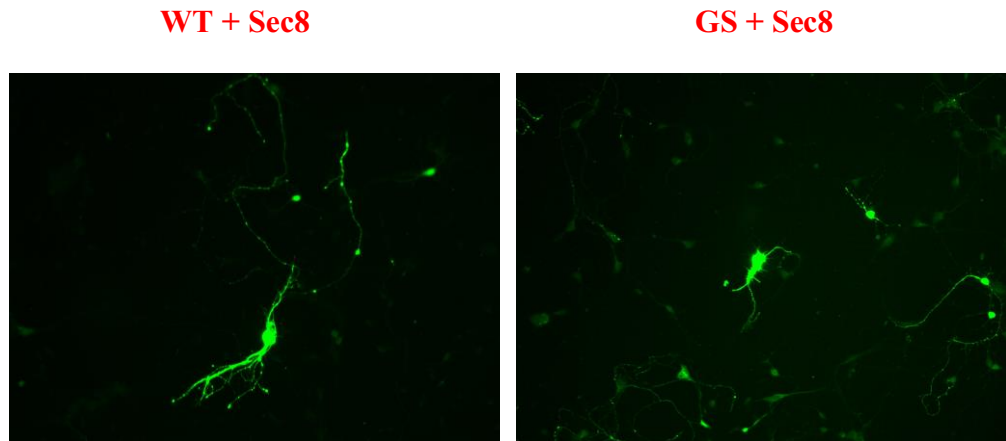


Figura 7: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza, lavorando sul canale specifico per visualizzare la GFP. Rappresentazione di un neurone wild-type con la proteina Sec8 (a sinistra) e un neurone con la mutazione G2019S e la proteina Sec8.

Osservando le immagini, si può notare che Sec8 favorisce il branching nei neuroni wild-type, mentre che nei neuroni con la mutazione G2019S questo non avviene, i neuroni G2019S comunque presentano un branching ridotto sia nel numero che nella lunghezza dei loro neuriti rispetto ai neuroni wild-type.

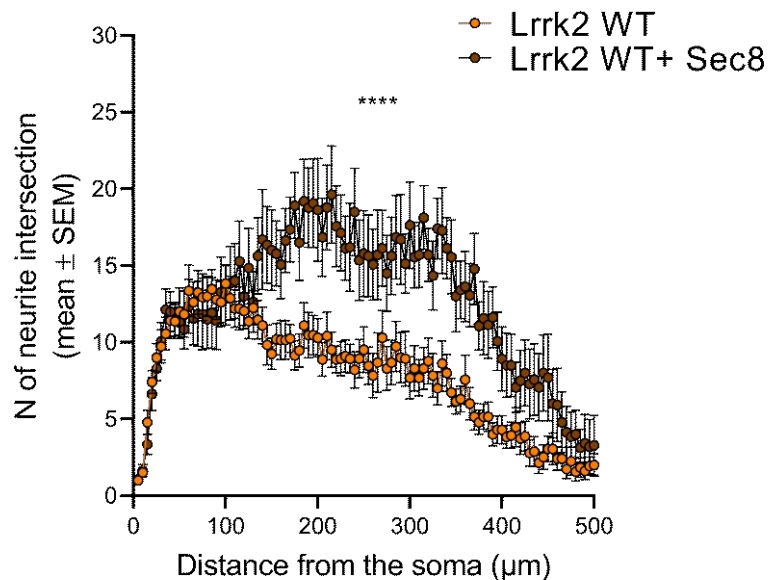


Figura 8: Grafico rappresentativo del numero di intersezioni (analisi di Sholl) dei processi di LRRK2 wild-type e LRRK2 WT+Sec8

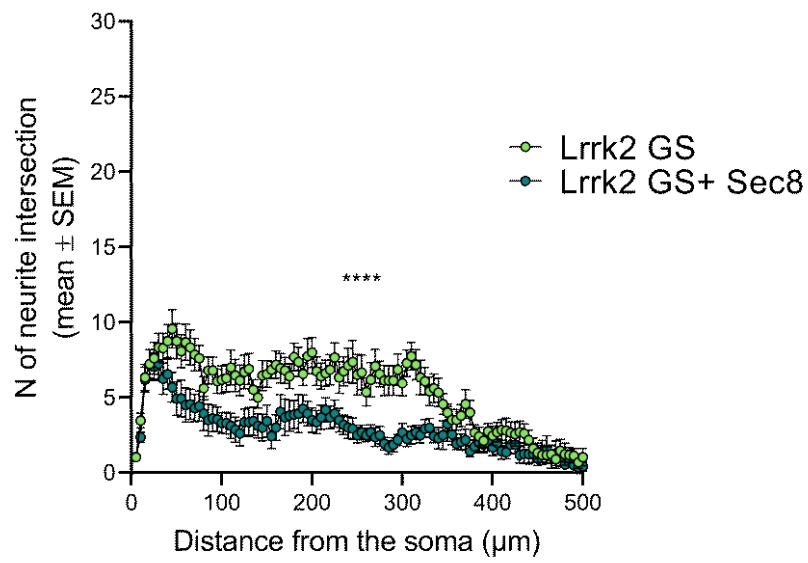


Figura 9: Grafico rappresentativo del numero di intersezioni (analisi di Sholl) dei processi di LRRK2 G2019S e LRRK2 GS+Sec8.

5. Discussione e Conclusioni

In questo studio, si è investigata la funzione fisiologica di LRRK2, in particolare, l'influenza che ha la mutazione G2019S sulle ramificazioni dei neuroni. I risultati ottenuti dalle immagini acquisite al microscopio a fluorescenza e dalle analisi statistiche hanno rivelato che c'è una diminuzione nella lunghezza dei neuriti e l'albero dendritico appare più complesso in presenza della mutazione G2019S.

LRRK2 interagisce con varie proteine, tra cui Sec8. Nei neuroni wild-type la presenza di Sec8 promuove il branching dei neuriti. Questo progetto ha testato l'ipotesi che Sec8 riuscisse a promuovere il branching in LRRK2 G2019S, correggendo quindi il fenotipo patologico. Partendo dal fatto che l'interazione fisica tra Sec8 e LRRK2 era stata precedentemente suggerita da dei collaboratori,¹¹ il nostro obiettivo è stato quello di verificare se oltre all'interazione fisica ci fosse anche un'interazione funzionale. Infatti le due proteine partecipano a processi comuni nell'ambito della fisiologia sinaptica e neuronale.

Durante il lavoro di tesi non è stato possibile confermare quest'ipotesi perché sembra che Sec8 non riesca a correggere il difetto di G2019S. Mentre Sec8 favorisce la crescita dei neuriti wild-type, nella mutazione G2019S questo non avviene.

Una possibilità è che LRRK2 e Sec8 non interagiscono funzionalmente, ovvero che non lavorano nello stesso pathway molecolare perché Sec8 non riesce a correggere i difetti causati da G2019S. La capacità di far crescere i neuriti da parte di Sec8 è indipendente dal difetto di LRRK2 G2019S nel bloccare questa crescita. Confermare quest'ipotesi con esperimenti futuri sarà importante per definire se Sec8 sia o meno un target terapeutico in pazienti con mutazioni del LRRK2. Le analisi effettuate durante il mio tirocinio indicano che non sia un target utile, ma studi futuri saranno necessari per confermare questi risultati.

Infatti, i risultati ottenuti in questo studio sono da considerarsi preliminari. A questi esperimenti dovranno essere affiancati altri studi, questo tipo di esperimento dovrà essere ripetuto facendo un numero maggiore di repliche per confermare il risultato. In generale, sarà importante compiere ulteriori studi che vadano ad investigare i diversi aspetti del ruolo di Sec8 nella regolazione del branching in LRRK2 G2019S.

6. Bibliografia

1. Cerri, S. & Mus, L & Blandini F. Parkinson's disease in women and men: what's the difference?. *Journal of Parkinson's Disease* 9, 501-515. (2019).
2. Balestrino, R. & Schapira, A H V. Parkinson disease. *European Journal of Neurology* 27, 27-42. (2019).
3. Raza, C. & Anjum R. & Shakeel N. Parkinson's disease: mechanisms, trasnlationale models and management strategies. *Life Sciences* 226, 77-90. (2019).
4. Xiao-Yu Du & Xi-Xi Xie & Rui-Tian Liu. The role of α .Synuclein oligomers in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 8645. (2020).
5. Quinn, P & Moreira, P & Ambrosio, A & Alves, H. PINK1/PARKIN signaling in neurodegeneration and neuroinflammation. *Acta Neuropathologica Communicatioins*. 8, 189 (2020).
6. Rocha, E. & Keeney, M. & Di Maio, R. & De Miranda, B. & Greenamyre, T. LRRK2 and idiopathic Parkinson's disease. *Trend in Neuroscience*. 45, 224-236 (2020).
7. Iannotta, L. & Greggio, E. LRRK2 signaling in neurodegeneration: two decades of progress. *Essays in Biochemistry* 65, 859–872 (2021)
8. Tolosa, E. & Vila, M. & Klein, C. & Rascol, O. LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials. *Nature Reviews Neurology*. 16, 97-107 (2020).
9. Borgs , L. & Peyre, E. & Alix, F. & Hanon, K. & Grobarczyk, B. & Godin, J. & Purnelle, A. & Krusy, N. & Maquet, P. & Lefebvre, P. & Seutin, V. & Malgrange, B. & Nguyen, L. Dopaminergic neurons differentiating from LRRK2 G2019S induced pluripotent stem cells show early neuritic branching defects. *Scientific reports*. 6, 33377, (2016).
10. Civiero, L. & Cirnaru, M. & Beilina, A. & Rodella, U. & Russo, I. & Belluzzi, E. & Lobbestael, E. & Reyniers, L. & Hondhamuni, G. & Lewis, P. & Van den Haute, C. & Baekelandt, V. & Bandopadhyay, R. & Bubaco, L. & Piccoli, G. & Cookson, M. & Taymans, J. & Greggio, E. Leucine- rich repeat kinase 2 interacts with p21-activates kinase 6 to control neurite complexitu in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*. 135, 1242-1256. (2015).
11. Fais, M. & Sanna, G. & Galioto, M. & Duyen Nguyen, T. & Thi Tran, M. & Sini, P. & Carta, F. & Turrini, F. & Xiong, Y. & Dawson, Ted. & Dawson, V. & Crosio, C. & Iaccarino, C. LRRK2 modulates the Exocyst Complex Assembly by interacting with Sec8. *Cells*. 10, 203. (2021).