

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea in Biotecnologie



Elaborato di Laurea

**Espressione e localizzazione del DNAJC13, una proteina
coinvolta nella malattia di Parkinson**

Tutor: Prof.ssa Elisa Greggio

Dipartimento di Biologia “A. Vallisneri”

Co-tutor: Dott.ssa Giulia Tombesi

Dipartimento di Biologia “A. Vallisneri”

Laureanda: Chiara Bresolin

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

<i>Abbreviazioni</i>	3
<i>Abstract</i>	4
1. Introduzione	5
1.1. Malattia di Parkinson	5
1.1.1. Fattori di rischio.....	6
1.1.2. Approcci terapeutici.....	6
1.1.3. Omeostasi proteica	6
1.2. DNAJC13	7
1.2.1. Struttura	7
1.2.2. Funzioni.....	8
2. Scopo dello studio	10
3. Materiali e metodi	11
3.1. Digestione diagnostica di DNAJC13.....	11
3.2. Colture cellulari.....	12
3.3. Trasfezione	12
3.4. Lisi cellulare	13
3.5. Gel elettroforesi (SDS-PAGE).....	14
3.6. Western Blot.....	13
3.7. Trattamento con EGF	14
3.8. Immunocitochimica (ICC).....	15
4. Risultati	16
4.1. Validazione del plasmide attraverso digestione con l'enzima di restrizione HindIII. 16	
4.2. Caratterizzazione della proteina DNAJC13 tramite Western Blot.....	16
4.3. Osservazione al microscopio a fluorescenza	17
5. Discussione e conclusioni	19
6. Bibliografia	20

Abbreviazioni

SNpc	Substantia Nigra pars compacta
GFP	Green Fluorescent Protein
MP	Malattia di Parkinson
EGF	Epidermal growth factor
SNCA	Synuclein alpha
LRRK2	Leucine rich repeat kinase 2
GBA	Glucosylceramidase beta
L-DOPA	Levodopa
HSP70	Heat Shock Protein 70
PFA	Paraformaldehyde
PBS	Phosphate-Buffered Saline
TAE	Tris-acetate-EDTA
PVDF	Polyvinylidene fluoride
TBS-T	Tris-Buffered Saline - Tween®
WT	Wild Type
GWAS	Genome-wide association study

Abstract

La malattia di Parkinson (MP) è un disturbo neurodegenerativo contraddistinto dalla perdita di neuroni nella *substantia nigra pars compacta* (SNpc) che causa carenza di dopamina striatale. Le cause e i meccanismi alla base di questa malattia non sono ben noti ma si è visto che mutazioni a carico della proteina DNAJC13 comportano un alterato traffico vescicolare contribuendo alla manifestazione della MP.

Lo scopo di questo studio è stato caratterizzare l'espressione di DNAJC13 tramite tecniche di western blot e di immunocitochimica. Nello specifico è stato utilizzato un plasmide condiviso dal ricercatore giapponese Kiyotoshi Sekiguchi per esprimere la proteina DNAJC13 legata ad un tag GFP.

Dopo averlo amplificato con il protocollo MIDI, abbiamo controllato la sua integrità confrontando i risultati della digestione con HindIII in silico con quelli sperimentali; è stata poi osservata la sua espressione nelle cellule HEK293T.

Successivamente le cellule sono state lisate e il DNAJC13-GFP è stato purificato per verificare il peso molecolare della proteina attraverso un western blot.

Infine, è stato eseguito un trattamento con il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) perché da letteratura sembra che il DNAJC13 sia coinvolto nella sua endocitosi. Le cellule sono state sottoposte al protocollo di immunocitochimica e poi analizzate al microscopio a fluorescenza per risalire ad eventuali differenze di localizzazione della proteina in seguito al trattamento con l'EGF.

1. Introduzione

1.1. Malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson è il secondo disturbo neurodegenerativo più comune che colpisce il 2-3% della popolazione di età superiore ai 65 anni. La maggior parte dei casi sono sporadici e solo un 5-10% sono familiari. Le persone affette presentano sintomi motori quali bradicinesia (rallentamento dei movimenti volontari), tremore a riposo, rigidità muscolare e compromissione di postura ma anche molti sintomi non motori, come disturbi del sonno, alterazione dell'olfatto e depressione. I segni distintivi neuropatologici della malattia di Parkinson sono la perdita di neuroni nella SNpc (la substantia nigra è un nucleo dopaminergico situato nel mesencefalo che ha un ruolo importante nella modulazione del movimento motorio), con conseguente carenza di dopamina striatale e la presenza dei corpi di Lewy, inclusioni intracellulari contenenti aggregati di α -sinucleina (l' α -sinucleina è una proteina prodotta dai neuroni, che ha la funzione di regolare il 'traffico' dei neurotrasmettitori a livello delle sinapsi). La patogenesi molecolare alla base di questa malattia coinvolge l'alterazione di molteplici vie e meccanismi: la proteostasi dell' α -sinucleina, la funzione mitocondriale, lo stress ossidativo, l'omeostasi del calcio, il trasporto assonale e la neuroinfiammazione [1].

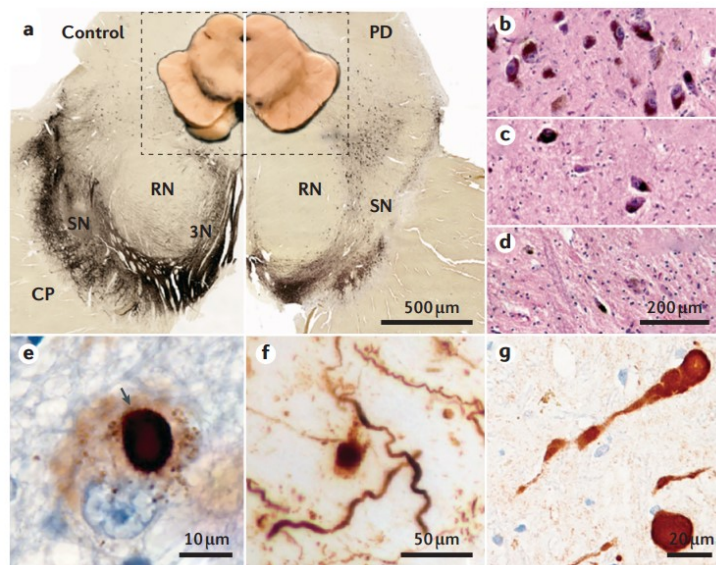


Fig.1 I principali segni patologici della MP. a) La MP è caratterizzata dalla depigmentazione della SNpc. b-d) La colorazione con ematossilina ed eosina della regione ventrolaterale del SN mostra una normale distribuzione dei neuroni pigmentati in un controllo sano (b) e una perdita di cellule pigmentate moderata (c) o grave (d) nella MP. e-g) Nei pazienti la colorazione immunohistochemica della α -sinucleina mostra i corpi di Lewy rotondi e intracitoplasmatici (e), depositi più diffusi e extracellulari di α -sinucleina (f) e sferoidi di α -sinucleina negli assoni (g). Adattata da [1].

1.1.1. Fattori di rischio

L'incidenza dei casi di MP è maggiore in Europa e America rispetto che in Asia, Africa e nei Paesi Arabici. Gli uomini risultano essere più suscettibili delle donne e gli anziani più dei giovani. Inoltre, un altro fattore di rischio è rappresentato dai fattori ambientali. Ad esempio, l'incidenza è significativamente maggiore nei soggetti esposti ai pesticidi e più bassa nei fumatori o nei consumatori di caffeina. Negli ultimi anni si è evidenziato il contributo della genetica all'insorgenza della malattia e sono stati individuati difetti genetici, sia familiari che sporadici, strettamente correlati alla comparsa della malattia. I principali geni coinvolti sono *SNCA*, codificante l' α -sinucleina, *LRKK2* che codifica per l'omonima proteina e *GBA* codificante per l'enzima lisosomiale β -glucocerebrosidasi. Più recentemente hanno attirato l'attenzione anche mutazioni del gene *DNAJC13*, la cui proteina è coinvolta nel traffico vescicolare [1,3].

1.1.2. Approcci terapeutici

Il trattamento della MP si basa sulla sostituzione farmacologica della dopamina striatale ma esistono anche approcci alternativi per alleviare i sintomi motori e non motori come la stimolazione cerebrale profonda nei pazienti che sviluppano complicazioni motorie intrattabili con la levodopa (L-DOPA). La L-DOPA è un profarmaco capace di attraversare la barriera emato-encefalica ed essere biotrasformato in dopamina, supplendo alla carenza patologica di quest'ultima. Questo trattamento è utile a migliorare la vita del paziente ma dopo un dato periodo i neuroni potrebbero non rispondere più alla terapia per una desensitizzazione dei recettori. Recentemente sono diventati obiettivi terapeutici anche l'aggregazione e il trasporto cellulare di α -sinucleina. Attualmente, una delle maggiori sfide è l'identificazione di marcatori per gli stadi prodromici della malattia, che permetterebbero di anticipare l'inizio delle terapie per contrastare la progressione della malattia [1].

1.1.3. Omeostasi proteica

Il misfolding, l'aggregazione e il deposito di proteine sono meccanismi patologici comuni in molte malattie neurodegenerative, tra cui la MP. L'accumulo di proteine danneggiate o modificate in modo errato può perturbare la corretta funzione della cellula e portare infine alla morte cellulare. Quindi, per mantenere l'omeostasi proteica intracellulare i neuroni si affidano ai chaperon molecolari, al sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e alla via autofagico-lisosomiale (ALP) che mediano il refolding o la rimozione delle proteine anormali. Il fallimento di queste vie di degradazione delle proteine, come causa o conseguenza di alterazioni patologiche precoci nei neuroni vulnerabili a rischio, può rappresentare un passo fondamentale nella cascata patologica che porta alla diffusione della neurodegenerazione. Un numero crescente di studi su modelli di malattia e su pazienti ha identificato la

disfunzione dell'UPS e dell'ALP come fattori importanti nella patogenesi della MP e dei disturbi correlati. Decifrare l'esatto meccanismo con cui i diversi sistemi proteolitici contribuiscono all'eliminazione delle proteine patogene, tra cui l' α -sinucleina, è quindi di fondamentale importanza [2].

1.2. DNAJC13

Circa l'1-5% di tutti i casi di MP sono spiegati da mutazioni monogeniche mentre sono stati nominati dal *genome-wide-association study* (GWAS) più di 90 fattori di rischio che contribuiscono alla MP sporadica. È stato proposto che esistano relazioni funzionali tra i geni interessati ed è importante studiare i diversi meccanismi di patogenesi a scopi terapeutici ma anche preventivi.

La famiglia delle proteine DNAJC è una sottoclasse di proteine da shock termico che ha recentemente attirato l'attenzione a causa dell'identificazione di mutazioni legate alla MP. Sono già state verificate associazioni geniche con la MP per DNAJC6, DNAJC12 e DNAJC5 mentre per DNAJC13 sono necessarie ulteriori prove. La mutazione più frequente nel DNAJC13 è la p.N855S ma è stato osservato che altre varianti di patogenicità sconosciuta potrebbero contribuire alla suscettibilità allo sviluppo della malattia, tra cui p.P336A, p.V722L, p.R1266Q e p.T1895M [3,4].

1.2.1. Struttura

Le proteine DNAJC funzionano come co-chaperoni e sono responsabili di gran parte della diversità funzionale delle proteine HSP70. Le proteine DNAJ interagiscono con HSP70 attraverso il loro dominio J altamente conservato, e contengono epitopi peptidici specifici per l'associazione con diversi substrati. DNAJC13/RME-8 è una proteina relativamente grande (> 200 kDa), comprendente oltre 2000 residui di aminoacidi, ed è espressa ubiquitariamente ma non particolarmente abbondante nel sistema nervoso. Strutturalmente, contiene quattro motivi ripetuti IWN di funzione sconosciuta e un dominio centrale di legame Dnaj (dominio J); quindi, questa proteina è etichettata come Dnaj, sottofamiglia C, membro 13. DNAJC13 si localizza alle membrane del sistema endosomiale dove si lega attraverso il suo *DNAJ-domain* al chaperone molecolare heat shock cognate 70 (Hsc70) (HSPA8). HSPA8 è un ATPasi studiata per il suo ruolo nella dissociazione della clatrina dalle vescicole rivestite di clatrina (CCV). HSPA8 è anche reclutata nelle CCV attraverso interazioni con le proteine cofattrici del dominio DNAJ auxilina (DNAJC6) o il suo omologo chinasi associata alla ciclina G (GAK/DNAJC26) [3,6].



Fig.2 Struttura della proteina DNAJC13. In grigio è evidenziato il *membran binding domain* e in rosso il *J-domain* [3].

1.2.2. Funzioni

DNAJC13/RME-8 non è una proteina molto studiata ma sembra essere coinvolta in diverse funzioni endosomiali come lo smistamento delle proteine, la tubulazione endosomiale, processi di trasporto, tra cui il trasporto retrogrado dall'endosoma alla rete trans-Golgi (TGN), la formazione di microdomini degradativi endosomiali e il riciclaggio dei recettori di membrana. Inoltre, è stato proposto che DNAJC13 possa agire come uno scaffold per organizzare i complessi retromer e WASH, poiché DNAJC13 interagisce con FAM2, un componente del complesso WASH, e SNX1, un costituente del dimero della nexina di smistamento strettamente legato al nucleo del retromero composto da VPS26, VPS35 e VPS29. C'è un'evidenza crescente di come la disfunzione del retromero sia legata alla neurodegenerazione. È stato dimostrato che il DNAJC13 mutante N855S legato alla MP causa l'accumulo di α -sinucleina nel compartimento endosomiale, presumibilmente a causa di un traffico difettoso del carico dall'endosoma precoce all'endosoma tardivo e/o di riciclo. Esperimenti *in vivo* condotti utilizzando mosche modificate geneticamente in modo da esprimere l' α -sinucleina umana hanno mostrato che il DNAJC13 mutante non solo aumenta la quantità di α -sinucleina insolubile nella testa della mosca ma induce anche la neurodegenerazione dopaminergica, il fenotipo dell'occhio ruvido e il deterioramento locomotorio dipendente dall'età. Insieme, questi risultati suggeriscono che la mutazione p.N855S perturba il traffico endosomiale con conseguente aberrante accumulo endosomiale di α -sinucleina, condizione che potrebbe predisporre al processo neurodegenerativo che porta alla MP. Questa alterazione del traffico endosomiale è stata osservata anche con l'accumulo di transferrina (TF) ed EGF nei compartimenti endosomiali in cellule COS7 (fibroblasti) con la mutazione DNAJC13 p.N855S. Infine, siccome sia il retromero che il complesso WASH sono legati all'autofagia è stato studiato il ruolo di DNAJC13 in questa via di segnale degradativa ed è emerso che la proteina ha un impatto sulla distribuzione subcellulare e il riciclo di ATG9A; la sovraespressione del mutante DNAJC13(N855S), associato alla MP, riduce l'autofagia [5,6,7].

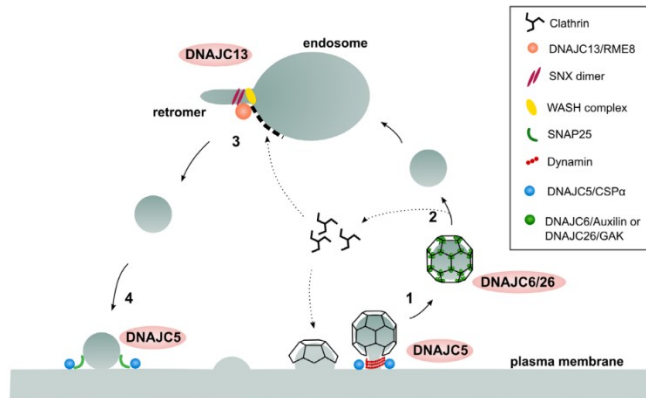


Fig.3 Panoramica del traffico e della dinamica della clatrina nella cellula, con indicazione del coinvolgimento delle proteine DNAJC. (3) Riciclaggio retromero-dipendente del carico dagli endosomi mediato da DNAJC13/RME-8. [3]

2. Scopo dello studio

Mutazioni nel gene che codifica per DNAJC13 sembrano essere implicate nella comparsa della MP ma non è ancora chiaro quale sia il ruolo fisiopatologico di questa proteina all'interno della cellula. Per verificare il ruolo fisiologico e capire in che modo il DNAJC13 potrebbe contribuire all'insorgenza della MP prima di tutto è necessario isolare la proteina e caratterizzarla. In questo studio è stato utilizzato il plasmide pEGFP-C-hRME8 (DNAJC13) con lo scopo di studiare l'espressione e la localizzazione della proteina di interesse.

Dopo averlo amplificato, il plasmide è stato sottoposto a digestione diagnostica per appurarne l'integrità. DNAJC13 è stato quindi trasfettato in cellule HEK293T presenti in laboratorio per verificare che si esprimesse al peso molecolare predetto e infine si è sfruttato il tag GFP per studi di immunocitochimica. Poiché in letteratura è stato visto che DNAJC13 è coinvolto nell'endocitosi dell'EGF abbiamo esposto le nostre cellule alla neurotrofina per indagare tramite ICC e microscopia a fluorescenza se il trattamento inducesse cambiamenti nella localizzazione della proteina di interesse. Da questa analisi preliminare non si sono osservate notevoli differenze ma sicuramente in futuro varrebbe la pena condurre analisi più approfondite utilizzando il microscopio confocale. Normalmente, dopo il legame con il recettore, EGF è inizialmente segregato all'endosoma precoce e poi indirizzato all'endosoma tardivo/lisosoma per la degradazione. In questo studio si è voluto indagare il coinvolgimento della proteina DNAJC13 nel traffico endosomiale poiché conoscere la funzione fisiologica di questa proteina è fondamentale per capire meglio l'aspetto patologico.

3. Materiali e metodi

3.1. Digestione diagnostica di DNAJC13

Questo plasmide non era mai stato testato e prima di procedere con la trasfezione ci siamo assicurati fosse integro e che non avesse ricombinato. È stata dunque condotta una digestione in silico per fare una predizione di quelli che sono i frammenti che si ottengono con diversi enzimi di restrizione. La nostra scelta è ricaduta su HindIII e abbiamo poi confermato i risultati sperimentalmente. Il plasmide, purificato da batteri con NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (ThermoFisher Scientific™), è stato quindi digerito con l'enzima di restrizione HindIII e le bande ottenute sono state osservate con una corsa elettroforetica in gel d'agarosio. Questo metodo consente di separare il DNA, carico negativamente, grazie all'applicazione di un campo elettrico; i frammenti più piccoli migrano verso il catodo più velocemente rispetto a quelli più grandi. La reazione di digestione è stata condotta per 60 minuti a 37°C utilizzando i seguenti reagenti:

10X Buffer E (Promega)	1 μl
DNA	0,5 μg
HindIII (Promega)	1 μl
H ₂ O	a volume (10 μl totali)

È stato anche preparato un campione senza aggiungere l'enzima di restrizione, per avere il controllo non digerito. I campioni sono stati caricati su un gel d'agarosio all' 1% [0,2g di agarosio in 20ml di TAE1X (tampone Tris-Acetato-EDTA)] e prima della solidificazione del gel è stato aggiunto il colorante per gli acidi nucleici (EuroSafe Nucleic Acid Stain, Euroclone). È conveniente mettere il colorante direttamente nel gel per ridurre l'errore perché anche il colorante ha un proprio peso molecolare e rischierebbe di rendere meno precise le bande. Nel primo pozzetto è stato caricato il marker, nel secondo pozzetto sono stati caricati 5 μl di campione digerito con 1 μl di gel Loading Dye (6X) e nel terzo 5 μl di DNA non digerito con 1 μl di gel Loading Dye (6X). È stata fatta partire la corsa a 100 Volt per mezz'ora. Il Loading Dye (6X) contiene due diversi coloranti (blu di bromofenolo e xilene cianolo FF) che consentono di seguire visivamente la migrazione del DNA durante l'elettroforesi.

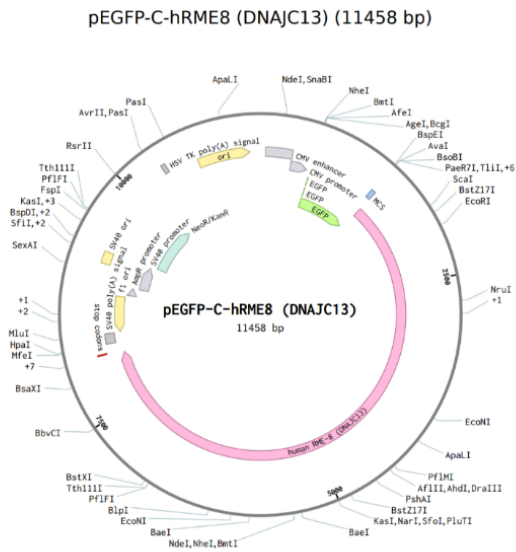


Fig.4 Plasmide DNAJC13

3.2. Colture cellulari

In questo studio sono state utilizzate cellule HEK293T, cellule embrionali umane del rene immortalizzate. Le linee cellulari sono state coltivate in flask T-75 con terreno di coltura costituito da Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ThermoFisher Scientific™), supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS, ThermoFisher Scientific™) e l'1% di antibiotico Penicillina-Streptomicina (P/S, ThermoFisher Scientific™). Il terreno di coltura è stato rimosso ed è stato eseguito un lavaggio con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, ThermoFisher Scientific™). Le cellule sono poi state staccate attraverso l'azione enzimatica della tripsina (0,1X, ThermoFisher Scientific™) che è stata lasciata agire per 2 minuti in modo da rompere le proteine di adesione cellulare. Dopo aver inattivato la tripsina aggiungendo il terreno di coltura nella fiasca, le cellule sono state prelevate e centrifugate per 5 minuti a 1500rpm; il surnatante è stato poi rimosso e le cellule sono state risospese in terreno di coltura fresco. Per potere eseguire la conta cellulare in modo da piastrare un numero definito di cellule, 10µL della sospensione cellulare sono stati prelevati ed inseriti nella cameretta di Burkner. Al fine di ottenere una buona efficienza di trasfezione si è deciso di seminare le cellule con una confluenza del 60% su una piastra da 12 pozzetti (per western blot) e su una piastra da 24 pozzetti (per ICC).

3.3 Trasfezione

La trasfezione è stata condotta utilizzando come terreno l'Opti-MEM™ e come agente di trasfezione il PEI (polietilenimmina). L'Opti-MEM™ è un terreno minimo essenziale che consente di ridurre l'integrazione di FBS senza comportare variazioni nel tasso di crescita o della morfologia delle cellule. Il PEI è uno dei polimeri cationici maggiormente usati come sistema per il trasferimento di DNA esogeno all'interno delle cellule. Sono state preparate le MIX DNA (0,88 µl

DNAJC13 in 150 µl di terreno Opti-MEM™) e PEI (3,75 µl PEI in 150 µl di Opti-MEM™) con il PEI in un rapporto 1:2 (µg). Dovendo lavorare su 6 pozzetti della piastra da 12 tutti i valori sono stati moltiplicati per 6,5; moltiplicare per un fattore di eccesso consente di prelevare tutta la quantità desiderata dalle eppendorf e minimizzare gli errori.

Dopo 5 min le due MIX sono state unite e lasciate ad incubare a temperatura ambiente per ulteriori 20 min. Il terreno di coltura contenuto nei pozzetti è stato sostituito con uguale volume di Opti-MEM™ e allo scadere dell'incubazione la MIX di trasfezione (DNAJC13+PEI) è stata aggiunta goccia a goccia coprendo gli interi pozzetti. Per la trasfezione delle cellule in 9 pozzetti della piastra da 24 i valori di riferimento delle MIX sono stati moltiplicati per 10; inoltre, 3 pozzetti sono stati riempiti con una MIX diversa contenente GFP+PEI da usare come controllo positivo.

3.4. Lisi cellulare

Dopo aver rimosso il terreno di coltura dalla piastra da 12 pozzetti, è eseguito un lavaggio in PBS1X. Le cellule esprimenti la proteina DNAJC13 sono state lisate in 60µL di RIPA (20mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% NPO4; 1% sodiodeossicolato), buffer di lisi al quale sono stati aggiunti gli inibitori di fosfatasi (2.5mM sodioprofosfato, 1mM β-glicerofosfato, 1mM sodio ortovanadato) e il 2% di inibitori di proteasi. Con uno scraper è stata favorita la lisi cellulare e i lisati così ottenuti sono stati posizionati in ghiaccio per 30 minuti. I campioni sono stati quindi centrifugati per 30 minuti alla massima velocità (>12.000rpm) ad una temperatura di 4°C e il surnatante è stato raccolto e conservato nel freezer a -80°C.

3.5. Gel elettroforesi (SDS-PAGE)

L'SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) è una tecnica che permette di separare le proteine all'interno di una matrice polimerica, applicandovi una differenza di potenziale, grazie alla presenza di SDS che consente la denaturazione proteica. L'operatore determina la percentuale di acrilammide in base alle proteine che desidera separare: alte percentuali permettono una maggiore separazione delle proteine a basso peso molecolare, mentre per le proteine di dimensioni maggiori sono sufficienti percentuali minori. DNAJC13 è una proteina ad alto peso e dunque è stato preparato un gel di poliacrilammide con una percentuale all' 8% (RUN: H2O; Acryl 40%; Tris 1,5M; SDS 10%; APS 10%; Temed. STACK: H2O; Acryl 40%; Tris 0,3M; SDS 10%; APS 10%; Temed.). La corsa elettroforetica è stata eseguita in Tris-Glycine Running Buffer (Tris Base 25mM, Glicina 250mM, SDS 0,1%) ad un voltaggio di 100-150V.

3.6. Western Blot

Il western blot è una tecnica che permette di identificare una determinata proteina mediante il riconoscimento di uno specifico anticorpo, il quale è, a sua volta, riconosciuto da un anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano. DNAJC13 è stato trasferito su una membrana di fluoruro di polivinilidene (PVDF) attivata in metanolo. È stato usato il transfer buffer 1X (5X Trans-Blot® Turbo™ Transfer Buffer, Bio-Rad®; 25mM Tris; 192mM Glicina; pH 8.3, con 20% di etanolo in dH₂O) e selezionato il programma di trasferimento High Molecular Weight per 20 min. Terminato il trasferimento, la membrana è stata prelevata, riattivata in metanolo e lavata in TBS-T 1X (20X TBS, 3M NaCl; 200mM Tris; pH 7.4 con aggiunta di 0,1% Tween) per rimuovere i sali; successivamente è stata trasferita in latte (latte scremato in polvere sciolto al 5% in TBS-T al 5%) per saturare i siti aspecifici. Infine, la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario specifico per la proteina di interesse a 4°C overnight [α -GFP, 1: 2000 (11814460001, Sigma-Aldrich®)]. Il giorno successivo, l'eccesso di anticorpo primario è stato rimosso eseguendo 3 lavaggi da circa 10 minuti l'uno in costante agitazione con TBS-T per poi incubare la membrana con l'anticorpo secondario [α -mouse IgG-HRP, 1: 16000 (A9044, Sigma-Aldrich®)] per un'ora a temperatura ambiente e in agitazione costante. Dopo altri 3 lavaggi da 10 minuti in TBS-T a temperatura ambiente e in agitazione, le membrane sono state osservate allo strumento VMR® Imager CHEMI Premium (Bio-Rad) utilizzando il reagente Immobilon® Enhanced Chemiluminescence (ECL) per rilevare il segnale relativo alle proteine di interesse.

In seguito all'acquisizione dell'immagine sono stati aggiunti nella stessa membrana l'anticorpo primario che riconosce la β -tubulina [anti- β tubulin, 1:50000 (abcam ab6046)] e il relativo anticorpo secondario [α -rabbit IgG – HRP, 1:80000 (A9169, Sigma-Aldrich®)] per la normalizzazione del caricamento. Questo procedimento, detto *housekeeping*, permette di minimizzare gli effetti derivanti dagli errori sperimentali, nella preparazione o nel caricamento del campione, che comprometterebbero le conclusioni ottenute dai dati del western blot. È stata utilizzata la β -tubulina come controllo interno perché è una proteina espressa costitutivamente, agli stessi livelli, negli esperimenti.

3.7. Trattamento con EGF

Nella piastra da 24 pozzetti le cellule sono state piastrate su 12 vetrini precedentemente trattati con poly-L-Lysine 1X (Sigma-Aldrich®) per favorire l'adesione cellulare. Il terreno di coltura è stato scartato e sostituito con terreno di coltura senza FBS per essere sicuri che l'effetto ottenuto fosse dovuto esclusivamente al trattamento con EGF. È stato aggiunto l'EGF in 6 pozzetti, in 3 pozzetti per 5 minuti e in 3 per 30 minuti; dei 6 pozzetti rimanenti, 3 sono stati usati

come controllo mentre in 3 pozzetti le cellule sono state trasfettate con la GFP al posto di DNAJC13 come controllo della trasfezione. Al termine del trattamento il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state fissate in paraformaldeide (PFA) per 20 minuti a temperatura ambiente dopo un lavaggio in PBS. Terminata la fissazione, i residui di PFA sono stati rimossi con tre lavaggi in PBS da 5 minuti l'uno, lasciando l'ultimo all'interno dei pozzetti.

3.8. Immunocitochimica (ICC)

Le cellule HEK293T trasfettate nella piastra da 24 pozzetti sono state sottoposte ad un protocollo di immunocitochimica. Innanzitutto, le cellule sono state permeabilizzate per 20 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di 0.1% Triton X-100 in PBS 1X. Il Triton X-100 è un detergente che crea dei pori a livello delle membrane delle cellule fissate in modo da permettere all'anticorpo di penetrare in esse e legare l'antigene specifico. In seguito, è stata rimossa la soluzione di Triton X-100 e, dopo due lavaggi in PBS 1X, i vetrini sono stati incubati per 45 min a temperatura ambiente in soluzione di blocking (5% FBS in PBS 1X). Questo passaggio serve a mascherare i siti aspecifici presenti sulle proteine cellulari. La procedura rende più specifica l'azione degli anticorpi primari usati successivamente diminuendo l'insorgenza di background aspecifico nella visualizzazione al microscopio. I vetrini sono poi stati incubati overnight a 4°C con l'anticorpo primario [anti-GFP, 1:200 (11814460001, Sigma-Aldrich®)] utilizzando la tecnica della cameretta umida. In particolare, è stato posizionato del parafilm in due Petri dish opportunamente siglati dove sono state aggiunte 12 gocce formate da 30 µl della soluzione di blocking con l'anticorpo anti-GFP; è stato quindi posto un vetrino preso dai pozzetti sopra ognuna di esse. Per evitare l'evaporazione dell'anticorpo è stato appoggiato un pezzetto di carta bagnato con acqua attorno alla piastra. Conclusa l'incubazione overnight, i vetrini sono stati riposizionati nei 12 pozzetti della piastra da 24 per eseguire 3 lavaggi con PBS 1X. È stato utilizzato il metodo della cameretta umida anche per l'anticorpo secondario [α -rabbit, 1:200 Alexa Fluor® 568 (ThermoFisher Scientific™)] e in questo caso l'incubazione è stata eseguita al buio (coprendo i vetrini con carta di alluminio) per 1 ora a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, i vetrini sono stati lavati nuovamente nei corrispondenti pozzetti per 2 volte con PBS 1X. I nuclei sono stati colorati tramite incubazione con il DAPI, un intercalante del DNA, diluito 1:10000 in PBS1X. Dopo ulteriori 3 lavaggi con PBS 1X, i vetrini sono stati montati su vetrini porta oggetto da microscopio con 3µl di montante Mowiol®.

4. Risultati

4.1. Validazione del plasmide attraverso digestione con l'enzima di restrizione HindIII

La digestione con l'enzima di restrizione HindIII eseguita per verificare l'integrità del plasmide e l'assenza di ricombinazione è avvenuta correttamente (Fig.5). Nello specifico, dalla digestione del DNA plasmidico si è ottenuto il pattern di bande atteso (6.5 Kb, 2 Kb, 1.5 Kb, 850 pb, 150 pb). Nel terzo pozzetto è stato caricato il DNA non digerito; infatti, si può apprezzare una sola banda ad alto peso molecolare.

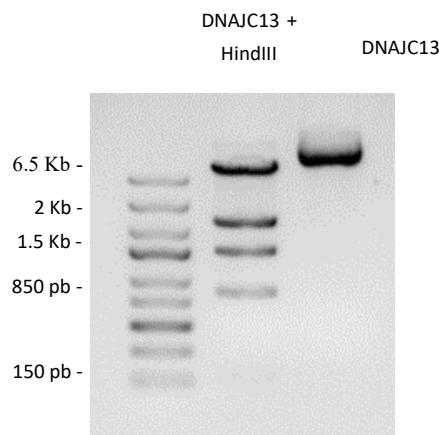


Fig.5: Digestione del plasmide pEGFP-C-hRME8 (DNAJC13) con l'enzima di restrizione HindIII (line centrale) e campione non digerito (line di destra) caricato su gel di agarosio all'1%.

4.2. Caratterizzazione della proteina DNAJC13 tramite Western Blot

Per caratterizzare il peso molecolare della proteina DNAJC13 è stato eseguito un western blot su lisati di cellule HEK293T precedentemente trasfettate con il plasmide di interesse. Abbiamo caricato il marker dei pesi molecolari e due quantità diverse di lisato (15 μ g e 30 μ g) in quanto non eravamo a conoscenza del livello di espressione del nostro plasmide. Lo sviluppo ha evidenziato la presenza di una banda in corrispondenza del peso molecolare di 250kDa (Fig.6). Dobbiamo considerare che la proteina che viene prodotta nelle cellule in seguito a trasfezione è legata ad un tag GFP, per cui il peso a cui corre la banda nel western blot sarà leggermente più alto di quello reale. Successivamente abbiamo aggiunto l'anticorpo anti- β tubulina per riconoscere la tubulina e poi incubato la membrana con il relativo anticorpo secondario. Questo ci ha permesso di normalizzare i valori delle bande relative al DNAJC13 sul segnale della β -tubulina ed essere in questo modo sicuri che il maggior segnale rilevato nei campioni di 30 μ g fosse dovuto ad una quantità maggiore di lisato proteico caricato.

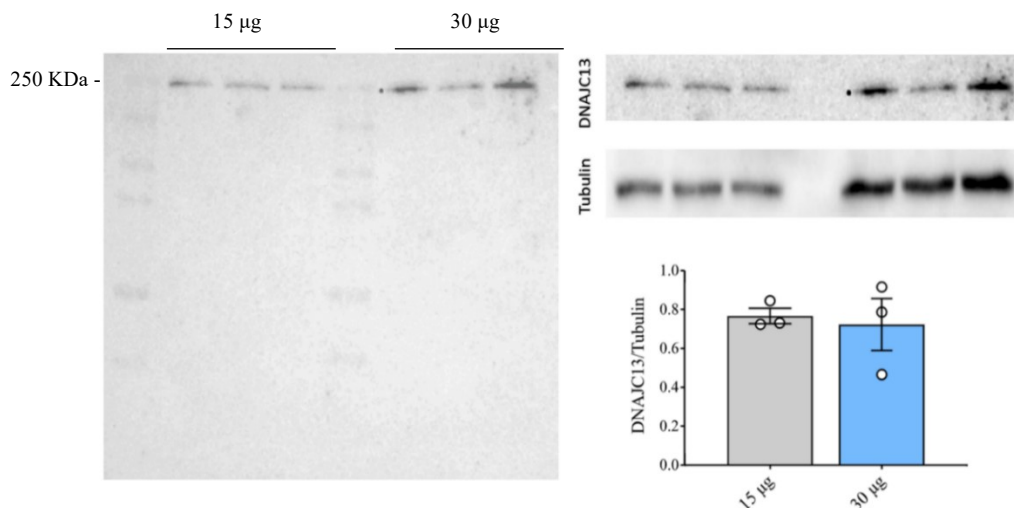


Fig.6: Western blot che illustra il peso molecolare del DNAJC13, normalizzazione con la β -tubulina e relativa quantificazione.

4.3. Osservazione al microscopio a fluorescenza

In seguito al trattamento mediante il protocollo di immunocitochimica descritto in precedenza le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza. In figura 7 si possono apprezzare le immagini più rappresentative, scelte per confrontare la localizzazione di DNAJC13 prima e dopo il trattamento con EGF (5 minuti e 30 minuti). La colorazione con il DAPI evidenzia in blu i nuclei di tutte le cellule HEK293T, in verde si possono osservare le cellule che hanno introdotto al loro interno il plasmide DNAJC13-GFP e in rosso è rappresentato l'anticorpo secondario. Facendo un merge dei segnali fluorescenti verde e rosso, si può notare come le due colorazioni vengano pressoché a coincidere. Inoltre, si può subito osservare che il DNAJC13-GFP ha una localizzazione citoplasmatica. Più nello specifico, realizzando degli ingrandimenti, si può apprezzare come la proteina si accumuli in date aree della cellula. Tuttavia, il trattamento con il fattore di crescita non sembra determinare differenze significative nella localizzazione di DNAJC13. Ulteriori studi, come ad esempio l'utilizzo del microscopio confocale, potrebbero aiutare ad ottenere informazioni più dettagliate su questo aspetto e a chiarire la funzione della proteina.

Le immagini sotto riportate suggeriscono anche un cambiamento conformazionale della proteina DNAJC13. Nel controllo e dopo soli 5 minuti di trattamento con l'EGF, il segnale di fluorescenza rosso presenta dei "vuoti" in corrispondenza delle zone in cui c'è un accumulo di GFP, come se l'anticorpo anti-GFP non riuscisse a legare la proteina. Nell'immagine ottenuta dopo 30 minuti di trattamento con EGF, invece, c'è una maggiore sovrapposizione tra le colorazioni, indice che l'anticorpo riesce a raggiungere meglio il suo target.

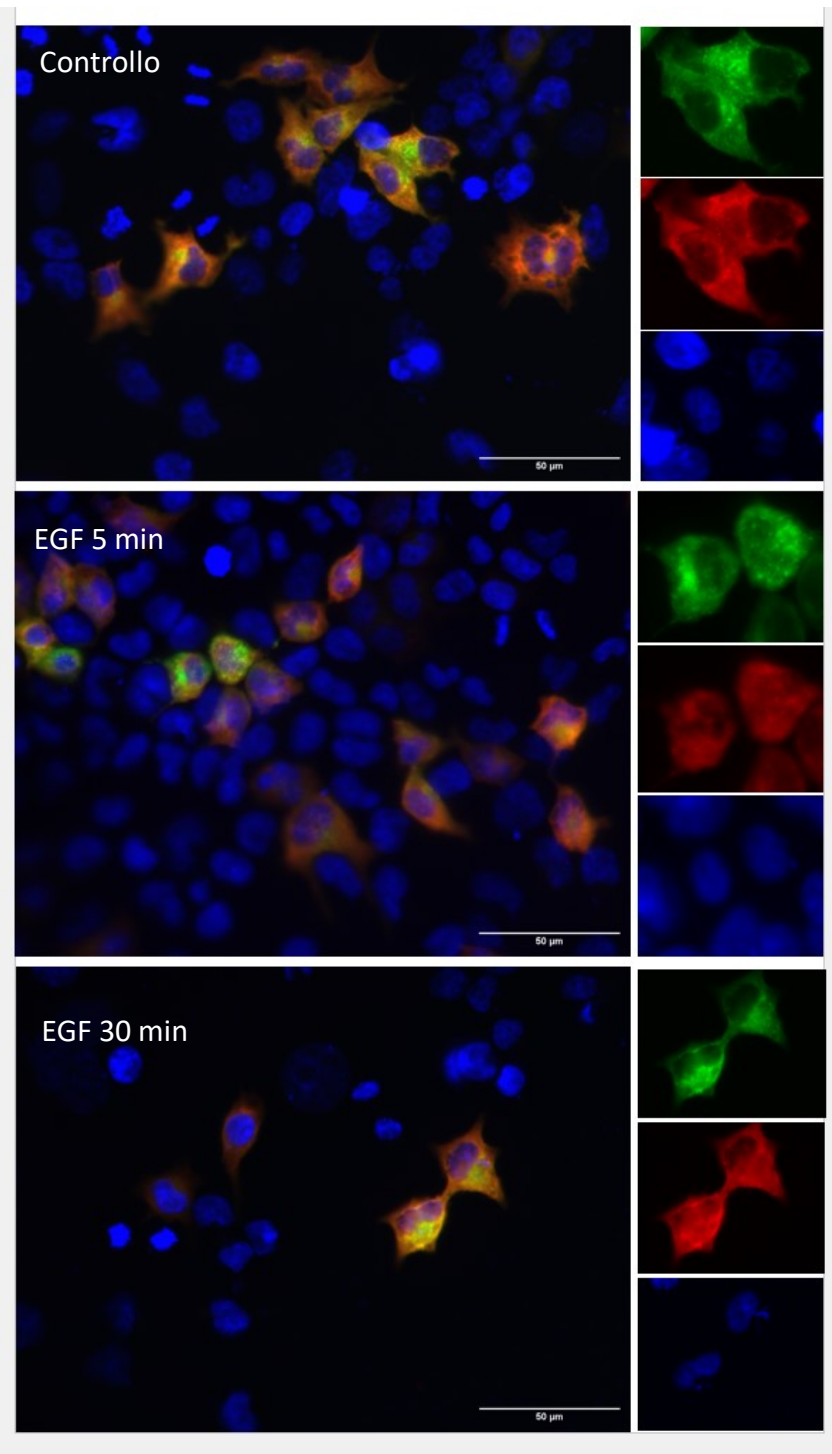


Fig.7: immagini delle cellule HEK293T ricavate al microscopio a fluorescenza. In blu sono visibili tutti i nuclei; in verde, sono visibili solo le cellule che hanno introdotto il plasmide DNAJC13-GFP; in rosso, è visibile il segnale dell'anticorpo anti-GFP. A sinistra, è riportata l'immagine ottenuta mediante la sovrapposizione dei tre segnali fluorescenti. A destra, sono riportate le immagini utilizzate per analizzare differenze di intensità delle singole fluorescenze, quindi possibili cambiamenti conformazionali e di localizzazione della proteina di interesse in seguito al trattamento.

5. Discussione e conclusioni

DNAJC13 è una proteina non molto studiata e poco conosciuta le cui mutazioni contribuiscono all'insorgenza della MP alterando il traffico endosomiale, con conseguente accumulo di proteine misfolded come l' α -sinucleina. La proteina DNAJC13 è coinvolta sia nel trasporto delle proteine misfolded dagli endosomi precoci a quelli tardivi che nel riciclo di recettori di membrana dagli endosomi precoci alla superficie cellulare. Inoltre, si pensa coordina l'attività del complesso WASH, il quale promuove la formazione di patch di F-actina la cui polimerizzazione influenza la forma e la maturazione degli endosomi, e del dimero retromero/SNX che lavora nel riciclaggio dei recettori transmembrana dagli endosomi al trans-Golgi (TGN).

In questo progetto di tesi è stato utilizzato il plasmide DNAJC13-GFP per verificare l'espressione della proteina nelle cellule HEK293T attraverso tecniche di western blotting e immunofluorescenza. In particolare, gli esperimenti di immunofluorescenza hanno permesso di investigare il coinvolgimento di DNAJC13 nel traffico del recettore del fattore di crescita EGF. Come prima cosa abbiamo verificato che DNAJC13 si esprimesse correttamente in cellule e che il suo peso molecolare fosse superiore ai 200 kDa.

Dalle immagini ottenute al microscopio a fluorescenza si può osservare la formazione di clusters di DNAJC13-GFP in seguito alla stimolazione con EGF; questo suggerisce la partecipazione della proteina nell'internalizzazione del recettore dell'EGF.

Inoltre, dopo 30 minuti di trattamento con l'EGF, si riducono le discrepanze tra i segnali di fluorescenza emessi dalla GFP e dall'anticorpo secondario che fanno supporre un cambiamento di conformazione di DNAJC13 con conseguente esposizione del sito antigenico.

In studi futuri sarà interessante seguire il cambiamento di localizzazione cellulare e di conformazione della proteina attraverso il microscopio confocale e la colocalizzazione con diversi marker della via endolisomiale come le GTPasi RAB.

Per comprendere meglio i meccanismi molecolari che consentono alla proteina DNAJC13 di partecipare alla degradazione e/o riciclo di proteine target potrebbe essere interessante valutare la sua interazione con le altre proteine coinvolte nel traffico endosomiale. In aggiunta, si potrebbero comparare immagini ottenute da cellule trasfettate con il plasmide wild-type con quelle di cellule che possiedono la mutazione più frequente p.N855S, utilizzando, oltre alle HEK293T anche neuroni o astrociti in coltura per avere informazioni più rilevanti nell'ambito della malattia di Parkinson.

6. Bibliografia

- 1] Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 23;3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13. PMID: 28332488.
- 2] Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, McLean PJ. Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathol*. 2012 Aug;124(2):153-72. doi: 10.1007/s00401-012-1004-6. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22744791; PMCID: PMC3417142.
- 3] Roosen DA, Blauwendraat C, Cookson MR, Lewis PA. DNAJC proteins and pathways to parkinsonism. *FEBS J*. 2019 Aug;286(16):3080-3094. doi: 10.1111/febs.14936. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31120186; PMCID: PMC9048129.
- 4] Vilariño-Güell C, Rajput A, Milnerwood AJ, Shah B, Szu-Tu C, Trinh J, Yu I, Encarnacion M, Munsie LN, Tapia L, Gustavsson EK, Chou P, Tatarnikov I, Evans DM, Pishotta FT, Volta M, Beccano-Kelly D, Thompson C, Lin MK, Sherman HE, Han HJ, Guenther BL, Wasserman WW, Bernard V, Ross CJ, Appel-Cresswell S, Stoessl AJ, Robinson CA, Dickson DW, Ross OA, Wszolek ZK, Aasly JO, Wu RM, Hentati F, Gibson RA, McPherson PS, Girard M, Rajput M, Rajput AH, Farrer MJ. DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*. 2014 Apr 1;23(7):1794-801. doi: 10.1093/hmg/ddt570. Epub 2013 Nov 11. PMID: 24218364; PMCID: PMC3999380.
- 5] Yoshida S, Hasegawa T, Suzuki M, Sugeno N, Kobayashi J, Ueyama M, Fukuda M, Ido-Fujibayashi A, Sekiguchi K, Ezura M, Kikuchi A, Baba T, Takeda A, Mochizuki H, Nagai Y, Aoki M. Parkinson's disease-linked DNAJC13 mutation aggravates alpha-synuclein-induced neurotoxicity through perturbation of endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*. 2018 Mar 1;27(5):823-836. doi: 10.1093/hmg/ddy003. PMID: 29309590.
- 6] Besemer AS, Maus J, Ax MDA, Stein A, Vo S, Freese C, Nalbach K, von Hilchen C, Pfalzgraf IF, Koziollek-Drechsler I, Silva B, Huesmann H, Boukhallouk F, Florin L, Kern A, Behl C, Clement AM. Receptor-mediated endocytosis 8 (RME-8)/DNAJC13 is a novel positive modulator of autophagy and stabilizes cellular protein homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Jan;78(2):645-660. doi: 10.1007/s00018-020-03521-y. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32322926; PMCID: PMC7873018.
- 7] Freeman CL, Hesketh G, Seaman MN. RME-8 coordinates the activity of the WASH complex with the function of the retromer SNX dimer to control endosomal tubulation. *J Cell Sci*. 2014 May 1;127(Pt 9):2053-70. doi: 10.1242/jcs.144659. Epub 2014 Mar 18. PMID: 24643499; PMCID: PMC4004978.