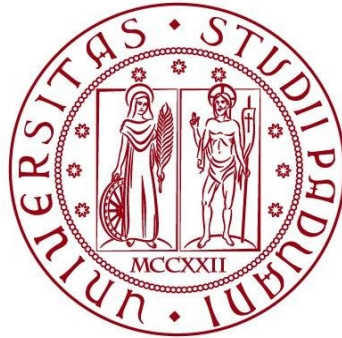


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**ANALISI DELLE PIU' COMUNI MUTAZIONI DI LRRK2 E DEL
LORO IMPATTO SULL'INFIAMMAZIONE PERIFERICA E NEL
SISTEMA NERVOSO CENTRALE**

**Tutor: Prof.ssa Elisa Greggio
Dipartimento di Biologia A.Vallisneri**

**Co-tutor: Luca Ballotto
Dipartimento di Biologia A.Vallisneri**

Laureanda: Emma Zamberlan

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Abstract

Alcune mutazioni di *LRRK2* sono state associate a casi sporadici e familiari della malattia di Parkinson ma anche a patologie infiammatorie croniche intestinali come il morbo di Crohn; altre mutazioni presentano invece un effetto protettivo nei confronti di queste patologie. Queste evidenze suggeriscono che le mutazioni di *LRRK2* possano influire sull'infiammazione periferica e centrale, partecipando alla patogenesi di queste malattie, la cui eziologia rimane ancora sconosciuta. Si esamineranno le principali mutazioni di *LRRK2*, il loro impatto sulla funzionalità della proteina, in particolare sulla sua attività chinasi, e le conseguenze sull'infiammazione centrale e periferica.

Sommario

1. Stato dell'arte.....	2
1.1 La malattia di Parkinson	2
1.2 Malattia di Parkinson e Infiammazione	2
1.3 Il morbo di Parkinson e l'asse intestino-cervello	3
1.4 LRRK2	4
1.4.1 Struttura	4
1.4.2 Funzioni di LRRK2	5
1.5 LRRK2 e infiammazione	5
2. Approccio Sperimentale	6
3. Risultati e Discussione	7
3.1 Mutazioni del dominio chinasico.....	7
3.2 Mutazioni nel dominio ROC.....	13
3.3 Mutazioni nel dominio COR.....	16
3.4 Mutazioni nel dominio WD40.....	17
4. Conclusioni.....	19

1. Stato dell'arte

1.1 La malattia di Parkinson

La malattia, o morbo, di Parkinson (MP) è una malattia progressiva, ad esordio tardivo che si manifesta approssimativamente nell'1% della popolazione sopra i 60 anni (Wallings et al. 2020). È la seconda malattia neurodegenerativa più comune dopo l'Alzheimer. I sintomi più comuni del Parkinson includono bradicinesia, tremori a riposo, rigidità, difficoltà nella deambulazione, problemi di equilibrio e instabilità posturale. Possono inoltre essere presenti anche cambiamenti d'umore, demenza e depressione. I maggiori tratti distintivi della MP sono la specifica e progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici nella *substantia nigra pars compacta*, localizzata nel mesencefalo; la formazione di depositi proteici anomali nei neuroni, chiamati corpi di Lewy e la neuroinfiammazione. La morte dei neuroni dopaminergici comporta una graduale deplezione della dopamina, un importante neurotrasmettitore che regola le funzioni motorie. Questo risulta nella comparsa dei deficit motori caratterizzanti la patologia. L'età in cui si manifestano i sintomi, la velocità con cui la malattia progredisce e la sua gravità, sono molto probabilmente il risultato dell'interazione tra fattori genetici e ambientali. Tuttavia, l'esatta patogenesi della MP rimane ancora lontana dall'essere compresa, anche se l'accumulo di proteine mal ripiegate, la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo sono considerati i principali meccanismi coinvolti nell'insorgenza dei casi sporadici della MP. La maggior parte dei casi di MP (85-90%) sono sporadici, mentre il 5-10% sono geneticamente ereditati (Wallings et al. 2020) e la malattia prende il nome di Parkinson familiare (FPD, *Familiar Parkinson Disease*). I geni legati a FPD possono presentare ereditarietà autosomica dominante oppure recessiva. Esempi di geni recessivi sono *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1*, di cui i primi due sono associati al Parkinson giovanile. Le mutazioni associate al MP con ereditarietà autosomica-dominante più comune coinvolgono il gene *SNCA* (che codifica per la proteina α -sinucleina) e il gene *LRRK2* (Wallings et al. 2020).

1.2 Malattia di Parkinson e Infiammazione

Nel corso degli anni si sono accumulate molte evidenze nel ruolo cruciale della neuroinfiammazione nella patogenesi del MP. Questa si manifesta con la presenza di microglia attivata ed elevati livelli di citochine nel SNC dei pazienti, nonché con l'infiltrazione e l'attivazione di cellule del sistema immunitario periferico nel SNC (Wallings et al. 2020). Quest'ultima osservazione ha portato a ipotizzare che l'infiammazione periferica possa giocare un ruolo fondamentale nell'esacerbare la neuroinfiammazione e perpetuare il processo neurodegenerativo. Nel contesto delle malattie neurodegenerative, la microglia può diventare cronicamente reattiva, provocando danni al SNC a causa della formazione di specie reattive all'ossigeno e della secrezione di citochine pro-infiammatorie. Sono stati osservati infatti alterazioni nei livelli di citochine nel cervello di pazienti MP, con un'elevata immunoreattività a IL-1 β , IL-2, TNF, TGF- β 1, soprattutto nelle regioni

dopaminergiche dello striato (Wallings et al. 2020). Nella SNpc è stato notato un significativo incremento della densità delle cellule gliali che esprimono TNF, IL-1 β , e interferone- γ (IFN- γ), insieme ad elevati livelli di TGF- β 1, IL-6, and IL-1 β nel liquido cerebrospinale. Inoltre, livelli elevati delle citochine appena nominate sono stati trovati nel siero dei pazienti con sintomi motori e cognitivi più gravi, indicando che l'infiammazione è correlata ad un decorso della malattia più grave (Wallings et al. 2020). È stato evidenziato come anche l'infiammazione periferica possa contribuire alla patogenesi del Parkinson. Ad esempio, è stato dimostrato che citochine pro-infiammatorie come TNF, IL-1 β e IL-6 sono elevate nel siero di pazienti di MP (Wallings et al. 2020). Inoltre, sono stati riportate alterazioni nelle cellule immunitarie nel sangue di pazienti di MP, come aumento di monociti classici, monociti che esibiscono una risposta maggiore a LPS batterico tramite TLR4 e con un profilo trascrizionale maggiormente infiammatorio (Wallings et al. 2020). Queste evidenze suggeriscono che anche l'infiammazione sistemica, oltre alla neuroinfiammazione, potrebbe contribuire alla patogenesi del MP.

1.3 Il morbo di Parkinson e l'asse intestino-cervello

È stata identificata una relazione tra disbiosi intestinale e il MP, in particolare il cambiamento nel microbiota intestinale è stato collegato ad un aumentato rischio di sviluppo di questa malattia (Herrick & Tansey, 2021). Esiste una correlazione tra il MP e le cosiddette malattie infiammatorie intestinali (IBD, *Inflammatory Bowel Diseases*). Il morbo di Crohn (MC) e la colite ulcerosa (CU) sono i due principali sottotipi di IBD e sono associati con infiammazione in diverse regioni dell'intestino. Una percentuale significativa di pazienti affetti da patologie infiammatorie intestinali ha un rischio più elevato di sviluppare il MP, rispetto a individui sani. Ad esempio, è stato osservato come pazienti affetti da IBD abbiano il 22% incidenza in più di MP rispetto a individui che non presentano IBD (Wallings et al., 2020). I pazienti MP e IBD mostrano fenotipi intestinali simili, specialmente nel contesto dell'infiammazione e della permeabilità intestinale. Infatti, pazienti MP e MC mostrano un'aumentata permeabilità intestinale, dovuta probabilmente dalla diminuita espressione di proteine giunzionali (Wallings et al. 2020). La rottura dell'integrità della barriera intestinale e l'aumento della permeabilità è stato ipotizzato come fattore contribuente all'infiammazione intestinale e periferica, un fenomeno condiviso tra MP e IBD. Citochine pro-infiammatorie come IL-1 β , TNF, IFN γ , IL-2, IL-6 e CXCL8 sono associate con l'inizio e la progressione di IBD, e molte di queste sono le stesse citochine che si trovano aumentate nel siero, nel fluido cerebrospinale e nel cervello dei pazienti PD, rispetto a controlli sani (Wallings et al. 2020). Questi dati supportano l'ipotesi che la disbiosi intestinale possa essere una delle molteplici perturbazioni periferiche che promuovono l'infiammazione gastrointestinale, la quale potrebbe rappresentare un importante fattore contributivo nell'insorgenza della patogenesi di MP. Molto importate è notare che varianti genetiche e mutazioni nel gene *LRRK2* aumentano l'incidenza sia del MP che del MC, mentre altre varianti genetiche di questo gene sono associate ad un

minor rischio d'insorgenza di una o entrambe queste patologie. Queste varianti ed il loro effetto, verranno discusse in seguito.

1.4 LRRK2

Il gene LRRK2 (leucine-rich-repeat-kinase 2) occupa approssimativamente 144 kb nel cromosoma 12 umano, nel locus Park8. Contiene 51 esoni ed ha un'espressione ubiquitaria, anche se la sua espressione è più abbondante nel fegato, nei reni e nel cervello. (Seol et al., 2007).

1.4.1 Struttura

La proteina LRRK2 è composta da 2527 aminoacidi, ed il suo peso molecolare è approssimativamente 285 kDa. È una proteina multidominio che appartiene alla famiglia delle proteine ROCO, caratterizzate dalla presenza del bidominio ROC (*Ras of Complex proteins*) e COR (*C-terminal of ROC*) (Russo et al., 2022).

La porzione N-terminale presenta i domini di interazione proteina-proteina *armadillo* (ARM), *ankyrin* (ANK) e *leucin-rich-repeat* (LRR), i quali svolgono un ruolo di *scaffold* durante la trasduzione del segnale e sono anche coinvolti nella dimerizzazione di LRRK2. All'estremità C-terminale è presente il dominio WD40, che è stato dimostrato essere cruciale per il ripiegamento della proteina e la sua funzione principale è quella di formare complessi multiproteici. WD40 sembra avere anche un ruolo nella dimerizzazione ed essere coinvolto nelle interazioni proteina-lipidi, suggerendo una possibile interazione tra LRRK2 e le membrane fosfolipidiche (Ho et al., 2016).

Il cuore catalitico è formato da:

- dominio ROC, il quale funziona come una GTPasi, che ha minor affinità con il GTP rispetto alle piccole GTPasi, seguito da COR, composto da due domini scaffold COR_A e COR_B, il quale si pensa sia coinvolto nel processo di dimerizzazione della proteina. La proteina sembra avere maggior funzionalità chinasi come dimero.
- dominio chinasi serina/treonina (KIN), il quale autofosforila la proteina in *cis* in multipli residui, come S1292, e fosforila un sottoinsieme di Rab GTPasi per regolare una varietà di pathway cellulari, soprattutto riguardanti il traffico vescicolare.

L'attività chinasi di LRRK2 dipende dal dominio GTPasico e richiede sia il legame al GTP che l'idrolisi di questa molecola per la corretta dell'attività (Seol et al., 2007). Non è del tutto chiaro però come il dominio GTPasico e il dominio chinasi siano legati l'uno all'altro funzionalmente. Si ipotizza che il dominio GTPasico regoli l'attività chinasi, e alcune evidenze suggeriscono che il legame al GTP aumenti l'attività chinasi. Infatti, è stato notato come i mutanti funzionali che non possono legare il GTP (come K1347A o T1348N) mostrino una deregolazione dell'attività chinasi (Usmani et al., 2021). La dimerizzazione di LRRK2 avviene tramite interazioni costitutive tra il dominio COR, che tiene i due domini ROC in stretta prossimità. Il legame del GTP ai domini ROC risulta nella dimerizzazione della proteina permettendo il legame alle proteine effettrici. L'idrolisi del GTP sfavorisce la dimerizzazione dei domini ROC, portando alla dissociazione del

dimero, interrompendo la funzionalità della proteina, ed è per questo che le mutazioni che aumentano la capacità di idrolisi del GTP sono associate a una minor attività della proteina (Usmani et al., 2021).

1.4.2 Funzioni di LRRK2

LRRK2 è espressa in diversi tipi cellulari ed è presente in una varietà di compartimenti subcellulari e organelli. Le funzioni principali di LRRK2 riguardano meccanismi come il traffico vescicolare, la fagocitosi e l'autofagia, la riorganizzazione del citoscheletro, l'apoptosi, l'omeostasi proteica, le risposte immunitarie, soprattutto innate, e l'infiammazione (Bae & Lee, 2015). LRRK2 interagisce anche con FADD, una proteina adattatrice di morte critica per l'attivazione dell'apoptosi, e inibendo le funzioni di FADD si previene la morte cellulare mediata da LRRK2 in colture di cellule neuronali primarie. Diversi studi hanno mostrato come LRRK2 possa essere coinvolta anche in pathways di segnale importanti per il direzionamento dell'assone (*axon guidance*), la formazione delle sinapsi e il mantenimento neuronale (Seol et al., 2007). LRRK2 esiste principalmente come monomero inattivo nel citosol, mentre è maggiormente presente come dimero attivo legato alla membrana e in conformazione di dimero mostra una maggior attività chinasi rispetto a LRRK2 citosolica (Seol et al. 2007).

1.5 LRRK2 e infiammazione

LRRK2 è altamente espressa nelle cellule del sistema immunitario, tra cui linfociti B, monociti, cellule dendritiche e macrofagi. Diversi studi hanno confermato che potrebbe essere coinvolta nella maturazione dei monociti, ma anche nella produzione di citochine infiammatorie durante le risposte immunitarie innate e potrebbe quindi avere un ruolo cruciale nella regolazione di pathway infiammatori (Bae & Lee, 2015). LRRK2 contribuisce all'attivazione della componente microgliale (la componente del sistema nervoso centrale di monociti/macrofagi) regolando l'attività del fattore nucleare NF- κ B, un fattore di trascrizione coinvolto nella produzione di segnali pro-infiammatori grazie all'induzione all'espressione di citochine infiammatorie come TNF- α o IL-6 (Bae & Lee, 2015). LRRK2 è stata identificata come un componente essenziale di un complesso di proteine che inibisce l'attività di NFAT, il fattore trascrizionale nucleare delle cellule T attivate che regola l'immunità, e questo meccanismo potrebbe avere implicazioni nell'attivazione del sistema immunitario in molte malattie (Bae & Lee, 2015). Sono stati eseguiti molti studi sulla funzione di LRRK2 come un regolatore della risposta immunitaria sia nel sistema nervoso centrale (SNC) che nella periferia; tuttavia, non è ancora del tutto chiaro se il ruolo di LRRK2 durante le infezioni sia benefico oppure deleterio. Coerentemente, diverse mutazioni in LRRK2 possono aumentare oppure diminuire il rischio di sviluppare malattie infiammatorie croniche intestinali oppure malattie infiammatorie periferiche come la lebbra, mentre alcune varianti che aumentano l'attività chinasi della proteina sono associate ad un maggior rischio di sviluppare il MC e il MP. Questo suggerisce che un aumento cronico dell'infiammazione sistemica causata dall'iperattività di LRRK2, possa avere un impatto deleterio anche a livello centrale, sia nelle cellule microgliali che nei neuroni dopaminergici.

2. Approccio Sperimentale

Nel presente studio è stata effettuata una ricerca bibliografica delle mutazioni più comuni di LRRK2, con l'obiettivo di correlare l'alterata attività enzimatica della proteina con le conseguenze nell'infiammazione centrale e sistemica. È stato utilizzato principalmente il database PubMed, un database internazionale che contiene una raccolta di articoli scientifici, disponibile al link <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Dapprima è stata effettuata una ricerca generale sulle caratteristiche della proteina LRRK2, utilizzando come parole chiave: *LRRK2, structure, domains*. A seguire ci si è concentrati sulle funzioni della proteina, utilizzando le parole chiave: *LRRK2, functions, kinase, GTPase, inflammation*. Poiché LRRK2 è legata alla malattia del Parkinson e anche a malattie infiammatorie intestinali, come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, per approfondire il ruolo di questa proteina in queste malattie è stata effettuata una ricerca utilizzando come parole chiave: *Parkinson disease, LRRK2, inflammation, Crohn disease, IBD*. Per concentrarsi invece sul ruolo di LRRK2 nell'infiammazione sono state utilizzate parole chiave come *LRRK2, mutation, inflammation, cytokine release*.

Basandosi sulle informazioni raccolte dagli articoli è stata realizzata una tabella riassuntiva in cui le diverse mutazioni di LRRK2 sono state messe in relazione alle rispettive conseguenze a livello infiammatorio, qualora riportate in letteratura.

Mutazione	Dominio	Attività GTPasica	Attività chinasi	Dimerizzazione	Malattia associata	Impatto sull'infiammazione	Riferimenti bibliografici
G2019S	Kin	=WT	+++	/	MP causing	Aumento infiammazione periferica e centrale	(Ren et al., 2019) (Bae & Lee, 2015) (Wallings et al., 2020) (Ho et al., 2018) (Chen et al., 2022) (Ahmadi Rastegar et al., 2022)
I2020T	Kin	+	++	=WT	MP causing	Assenza di dati	(Gloeckner et al., 2016) (Ho et al., 2016)
N2081D	Kin	=WT	+	/	Allele di rischio per MP e MC	Aumento infiammazione periferica e centrale	(Lin et al., 2016) (Mikocka-Walus & Andrews et al., 2018) (Nui et al., 2018)
N1437H	ROC	-	+	+	MP causing	Assenza di dati	(Asley et al., 2010) (Huand et al., 2019)
R1441G/C/H	ROC	-	+ (indiretto)	/	MP causing	Aumento infiammazione centrale	(Tsika & Moore et al., 2013) (Fan et al., 2021) (Gillardon et al., 2012)
N551K	ROC	/	/	/	Protettiva verso MP e MC	Diminuzione infiammazione periferica e centrale	(Hui et al. 2018) (Gopalai et al., 2019)
R1398H	ROC	+	-	/	Protettiva verso MP e MC	Diminuzione infiammazione periferica e centrale	(Hui et al., 2018) (Gopalai et al., 2019)
Y1699C	COR	-	/	/	Allele di rischio per MP	Assenza di dati	(Nguyen & Moore et al., 2017)
R1628P	COR	/	+ (indiretto)	/	MP	Aumento infiammazione periferica	(Gopalai et al., 2014) (Shu et al., 2016)
G2385R	WD40	/	-	-	MP	Assenza di dati	(Aasly et al., 2010) (Tezuka et al., 2022) (Ho et al., 2016) (Rudenko et al., 2012)
M1397T	WD40	/	/	/	MC	Aumento infiammazione periferica	(Fujioka et al., 2017) (Weyopf et al., 2019) (Fava et al., 2016)

Figura 1: Tabella riassuntiva delle principali mutazioni patogene di LRRK2, messe in relazione con il loro impatto sull'attività chinasi e GTPasica e con le relative conseguenze sull'infiammazione

3. Risultati e Discussione

Diversi studi hanno mostrato che esistono numerose mutazioni nel gene *LRRK2*, arrivando fino a quasi 100 varianti, tra le quali, almeno sette sono legate alla malattia di Parkinson e considerate patogenetiche (Kalogeropoulou et al., 2022). La maggior parte di queste varianti sono molto rare e quasi per nulla studiate; mentre varianti come G2019S, R1441G, R1441C, R1441H, Y1699C e I2020T sono più comuni e sono state confermate essere patogeniche (Kalogeropoulou et al., 2022). Tra queste varianti R1441G/H/C sono localizzate nel dominio ROC GTPasico, mentre Y1699C è localizzato nel dominio COR. Un'ulteriore variante, N1437H nel dominio ROC GTPasico è stata classificata come patogenica (Kalogeropoulou et al., 2022). I2020T, N2081D e G2019S, sono localizzate nel dominio chinasico. Esse aumentano l'attività chinasica di *LRRK2*, e questo aumento dell'attività chinasica sembra essere ciò che guida la patogenesi (Kalogeropoulou et al., 2022). Recentemente altre mutazioni come G2835R, A1441G e R1628P sono state individuate e studiate.

3.1 Mutazioni del dominio chinasico

Le mutazioni del dominio chinasico, in particolare le mutazioni *gain-of-function*, cioè di aumentata funzionalità chinasica, sono nella maggior parte dei casi patogeniche. Una delle più frequenti mutazioni riscontrabili in *LRRK2*, nonché la causa più comune di MP familiare, è la mutazione G2019S. Infatti, si stima che questa mutazione possa causare fino al 40% dei casi di malattia di Parkinson familiare (MPf), ma anche l'1% dei casi sporadici della MP (Ren et al., 2019). La penetranza di questa mutazione è molto variabile e dipende da diversi fattori come il sesso, l'età e altri fattori genetici e ambientali. Inoltre, la penetranza della mutazione G2019S aumenta con l'età, passando dall'8% nei pazienti dai 50 anni, a 30-40% negli individui a 60 anni fino all'80% nei pazienti a 75 anni (Ren et al., 2019)

I pazienti di MP che portano la mutazione G2019S hanno una patologia eterogenea; infatti, non solo presentano i tipici corpi di Lewy di α -sinucleina, tipico tratto del MP, ma presentano anche una malattia dei corpi di Lewy diffusa, e raramente, anche aggregati di proteina tau associati ai microtubuli (Ren et al., 2019). Non è ancora chiaro però come *LRRK2* potrebbe avere effetto sulla biologia/patobiologia dell' α -sinucleina. Per quanto riguarda gli aspetti clinici dei pazienti con il MP con questa mutazione, vengono evidenziati un'elevata età media di manifestazione della malattia, una maggioranza di pazienti femmine, un lungo decorso di malattia, che comincia principalmente nelle gambe e con una postura anormale e disturbi della deambulazione. Inoltre, presentano sintomi come depressione, allucinazioni, disturbi del sonno e disordini cognitivi. (Ren et al., 2019)

Questa mutazione origina da una sostituzione G>A nella posizione 6055 dell'esone 41 del gene *LRRK2*, che risulta in una mutazione missenso di una glicina con una serina nel codone 2019 di *LRRK2*, il quale si trova nel dominio chinasico. È il primo esempio identificato di forma mendeliana di MP; infatti, questa mutazione è ereditata in modo autosomico dominante, inoltre i portatori omozigoti e quelli eterozigoti manifestano lo stesso fenotipo e una simile età di manifestazione della

malattia. La mutazione presenta un'aumentata attività chinasi, la più elevata riscontrabile in tutte le varianti di LRRK2, mentre non si riscontra una variazione dell'attività GTPasi, o di legame al GTP, rispetto alla proteina WT (Ren et al., 2019).

È stato recentemente suggerito che LRRK2 potrebbe alterare la fissione mitocondriale della microglia, via Drp1, in una maniera dipendente dall'attività chinasi, risultando in una stimolazione di risposte pro-infiammatorie (Ho et al., 2018). Si può dire quindi che una mutazione come G2019S, che presenta un'aumentata attività chinasi, risulti in una maggiore fissione mitocondriale e in un aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie, portando a un aumento della neuroinfiammazione. (Ho et al., 2018). Questi risultati suggeriscono un ruolo rilevante della maggior attività chinasi di LRRK2 nell'attività infiammatoria microgliale e nelle cellule periferiche del sistema immunitario nelle malattie che vedono questa mutazione.

I substrati principali di LRRK2 sono le Rab GTPasi, e queste sono note per avere un ruolo nella regolazione dei pathway endolisosomiali e della transitosi, un tipo di trasporto cellulare dove le macromolecole sono trasportate attraverso l'interno delle cellule (Wallings et al., 2020). Il mantenimento di una bassa attività transcitotica nelle cellule endoteliali che costituiscono la barriera ematoencefalica (*Blood-brain barrier*, BBB) è fondamentale per mantenere l'integrità di questa barriera. Rab35, un substrato di LRRK2, è implicato nell'attività di transitosi. Recentemente è stato dimostrato che G2019S LRRK2 media la propagazione di α -sinucleina incrementando la fosforilazione e l'attivazione di Rab35 (Wallings et al., 2020). Inoltre, è stato notato che l'espressione di Rab35 è elevata nel siero di pazienti con il MP legato alla variante G2019S e nel tessuto cerebrale di modelli murini che presentano questa mutazione. Quindi si potrebbe dedurre che un'attività chinasi elevata, causata dalla mutazione G2019S, potrebbe aumentare l'attività di Rab35 nelle cellule endoteliali e conseguentemente aumentare i livelli di transitosi, portando alla compromissione della BBB, favorendo la propagazione dell'infiammazione periferica al sistema nervoso centrale. (Wallings et al., 2020). Potrebbe essere interessante studiare l'attività di transitosi in relazione alle altre mutazioni di LRRK2, che tuttavia non sono ancora state studiate in questo contesto.

Per comprendere meglio gli effetti della variante G2019S, si possono osservare i livelli di citochine infiammatorie, sia nel siero di pazienti portatori, sia nel medium di cellule che presentano la proteina mutata. Nel caso di soggetti asintomatici ma portatori della mutazione, i livelli di citochine pro-infiammatorie presenti nel siero sono più alti, suggerendo un ruolo precoce dell'infiammazione periferica sulla malattia. (Wallings et al., 2020). Nello studio (Chen et al., 2022) sono state generate cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) da linee cellulari di tre pazienti con MP familiare associato alla mutazione G2019S nel gene LRRK2 e una linea cellulare derivata da un individuo sano, utilizzata come controllo. Per mimare la patologia del MP in vitro è stato usato MPP+, una neurotossina utilizzata per danneggiare i neuroni DA. In questo modo è stato osservato che i neuroni DA differenziati dai pazienti portatori di G2019S presentavano una significativa

riduzione della sopravvivenza media e un'aumentata apoptosi, se comparata ai controlli. È stato anche rilevato che i livelli di mRNA di fattori infiammatori, misurati in colture di cellule neuronali dopo l'esposizione a MPP+, come IL-1 β , TNF- α , ciclossigenasi-1, IL-6 e iNOS, quando presente la mutazione G2019S, erano più elevati rispetto al gruppo di controllo privo della mutazione. Le linee di iPSC derivate dai pazienti di MP sono state riportate anche essere molto più suscettibili allo stress ossidativo (Chen et al., 2022). Si è scoperto che i neuroni DA umani con la mutazione avevano una maggiore suscettibilità a MPP+ rispetto al controllo sano e inoltre, come già detto, queste linee presentavano un profilo trascrittomico maggiormente infiammatorio. Date queste osservazioni, occorrerebbe approfondire il legame tra gli elevati livelli di fattori infiammatori e l'aumentata sensibilità dei neuroni DA con la mutazione G2019S-LRRK2.

Nello studio (Wallings et al., 2020) si è osservata un'alterazione degli eventi infiammatori regolati da LRRK2 in vivo, in particolare si osserva un aumento dell'attivazione della microglia nel sistema nervoso di ratti transgenici caratterizzati dalla mutazione G2019S. È stata osservata un'aumentata espressione di CD68 nella microglia dei modelli murini G2019S LRRK2 iniettati con fibrille ricombinanti di α -sinucleina, accompagnata dall'aumento dell'espressione di markers pro-infiammatori come IL-6, TNF- α , C1q e altri markers come Vim, CD44 e Cxcl10. Importante è anche notare che sono stati osservati livelli significativamente elevati di citochine infiammatorie differenti come TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, e iNOS in neuroni DA differenziati dalle iPSC con la mutazione G2019S (Wallings et al., 2020).

Nello studio (Ahmadi Rastegar et al., 2022) sono state differenziate cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), con la mutazione G2019S, in monociti e macrofagi. Sono stati analizzati i livelli di citochine e chemochine infiammatorie dopo che essi sono stati stimolati con agonisti leganti TLR in presenza e assenza di inibitori chinasi di LRRK2. I monociti e macrofagi che presentano la mutazione hanno mostrato livelli significativamente più alti di citochine e chemochine, dopo la stimolazione, se comparati con i controlli. Il knockout di LRRK2 non ha un effetto significativo nei livelli di citochine indotte dalla stimolazione dei TLR. IFN γ aumenta significativamente i livelli di LRRK2 e la fosforilazione del suo substrato a valle Rab10, inoltre potenzia i livelli di citochine indotti dalla stimolazione dei TLR. Tuttavia, gli inibitori chinasi di LRRK2 non hanno effetto significativo in questi livelli di citochine. Questi risultati suggeriscono che la mutazione G2019S potrebbe potenziare l'infiammazione anche in maniera indipendente dall'attività chinasi.

Anche se questa mutazione è tra quelle più conosciute e studiate, non mancano risultati contrastanti nel suo effetto sull'infiammazione. È stato osservato che la mutazione G2019S, in modelli di sepsi indotta da *S. typhimurium*, porta a un maggior controllo dell'infezione con una ridotta crescita batterica e un'aumentata sopravvivenza in casi di sepsi (Wallings et al., 2020). Viceversa, animali con encefalite indotta da retrovirus, sempre portatori della variante G2019S, mostrano una mortalità maggiore, un aumento delle specie reattive all'ossigeno e una maggior concentrazione di α -sinucleina nel cervello (Wallings et al., 2020). Questi dati mettono in luce i possibili effetti opposti nell'infiammazione mediata

dall'attività chinastica di LRRK2 nel cervello rispetto alla periferia, e quindi fanno notare come ulteriori studi siano necessari per comprendere quale sia il vero effetto della mutazione sull'infiammazione nel SNC e periferica. (Wallings et al., 2020).

Un'altra mutazione che si trova nel dominio chinastico di LRRK2 è I2020T, una mutazione *gain-of-function* che vede un'aumentata attività chinastica della proteina. È classificata anch'essa come una mutazione causativa del MP meno comune però di G2019S. L'incidenza delle varianti di LRRK2 dipende dalla popolazione analizzata ed è molto variabile. Nello studio (Gloeckner et al., 2006) è stata effettuata un'analisi della prevalenza di 10 varianti di LRRK2 in un totale di 52 paesi. La variante I2020T è stata identificata nello 0,037% dei casi MP genotipizzati. La penetranza di questa mutazione sembra essere molto bassa, intorno al 20-30% a 80 anni, anche se come per le altre mutazioni di LRRK2, ci possono essere ampie variazioni interindividuali. (Gloeckner et al., 2006). Per la mutazione G2019S è stata riportata una prevalenza dell'1% in approssimativamente la metà dei 52 paesi e andava oltre il 5% in 9 paesi. Quindi è chiaro che G2019S contribuisce in maniera molto più significativa al rischio di MP rispetto a I2020T. (Gloeckner et al., 2006)

La dimerizzazione di LRRK2 non sembra essere alterata dalla mutazione I2020T, inoltre la quantificazione dell'autofosforilazione ha rivelato un aumento di circa il 40% rispetto al WT. (Gloeckner et al., 2006).

Nello studio (Ho et al., 2016) è stata analizzata l'attività chinastica e GTPasica di LRRK2 con le mutazioni, G2019S, I2020T, R1441C e G2385R (le ultime due verranno discusse in seguito) utilizzando proteine commerciali ricombinanti e immunoprecipitati di proteine espresse in modo transiente in cellule HEK293. È stato osservato che, sia la mutazione I2020T, che la G2385R, presentano un aumento dell'attività GTPasica della proteina LRRK2, nonostante si trovano in domini diversi; infatti, mentre I2020T interessa il dominio chinastico, la seconda mutazione è localizzata nel dominio WD40. In saggi mirati a testare l'attività GTPasica, I2020T ha mostrato la più alta attività GTPasica, molto più alta di tutte le altre proteine LRRK2 con varie mutazioni testate. Sia G2385 che I2020T mostrano un'attività di legame al GTP simile al WT. Avendo una maggior attività GTPasica, il GTP rimane meno tempo legato a LRRK2, in questo modo troveremo meno LRRK2 legata al GTP, pur mantenendo la stessa affinità ad esso rispetto al WT. Sempre in questo studio, poiché le varianti patogeniche prevalenti presentano un'aumentata attività chinastica, essa è stata analizzata tramite saggi in vitro, dove sono stati utilizzati substrati di LRRK2 come Rab5B oltre che analizzare l'autofosforilazione. È risultato che I2020T ha un'aumentata attività chinastica mentre G2385R ridotta. Infatti, nei saggi chinastici in vitro, dove venivano comparate le diverse proteine LRRK2 con le mutazioni G2019S, I2020T, R1441C e G2385R, è stato visto che l'attività di autofosforilazione di LRRK2 presentava il seguente ordine: G2019S > I2020T > R1441C ≥ WT > G2385R. Mentre questo studio ha evidenziato una maggiore attività chinastica di LRRK2 con mutazione I2020T, altri studi hanno riportato come essa presentasse un'attività chinastica più

debole rispetto al WT; quindi, ci troviamo in presenza di risultati controversi (Ho et al., 2016).

Riassumendo, sembra che anche I2020T presenti una patogenesi dipendente dall'attività chinasica, in modo simile a G2019S. A differenza della G2019S però, la I2020T influenza l'attività GTPasica (Ho et al., 2016). Il meccanismo con cui queste due attività di LRRK2 si regolino a vicenda non è del tutto compreso. L'aumento dell'attività GTPasica associato a quello dell'attività chinasica potrebbe essere un meccanismo compensatorio, e potrebbe spiegare la ridotta penetranza di I2020T (Ho et al., 2016). È controverso anche il fatto che sia presente un aumento sia dell'attività GTPasica che di quella chinasica, dato che se aumenta l'attività GTPasica, il GTP rimane legato a LRRK2 per un tempo minore, quindi l'attività chinasica dovrebbe diminuire. Questo accade ad esempio per mutazioni che verranno discusse in seguito, come N551K e R1398H.

Una lacuna evidente in letteratura è rappresentata dall'assenza di studi sull'impatto infiammatorio della variante I2020T. Essendo una mutazione causativa del MP, si può ipotizzare che questa variante provochi infiammazione nel sistema nervoso centrale. Inoltre, si potrebbe dedurre che si comporti in maniera simile a G2019S, trovandosi nel dominio chinasico ed essendo associata ad un aumento dell'attività chinasica. Tuttavia, l'aumento dell'attività GTPasica in presenza di mutazione I2020T non è presente in G2019S.

Un'altra mutazione localizzata nel dominio chinasico di LRRK2 è N2081D, la quale è associata ad un aumentato rischio per il MP, ma soprattutto per il morbo di Crohn (MC), in quanto è maggiormente associata all'insorgenza di quest'ultimo (Lin et al., 2016). È importante sottolineare che questa mutazione non è considerata causativa del MP, ma solo una variante di rischio.

Analizzando l'attività chinasica della proteina LRRK2 con la variante in questione, studiando la fosforilazione del suo substrato Rab10 in cellule HEK293T trasfettate, è stata caratterizzata come una variante avente un'aumentata attività chinasica rispetto a LRRK2 WT, anche se in maniera minore rispetto a G2019S (Mikocka-Walus & Andrews et al., 2018). Quindi questa mutazione è caratterizzata da un aumento dell'attività chinasica di LRRK2, coerentemente col fatto che la maggior parte delle mutazioni patogenetiche condividono questa caratteristica.

Poiché sia la variante causativa della MP G2019S che la variante di rischio MC/MP N2081D sono localizzate nel dominio chinasico, nello studio (Hui et al., 2018) è stato analizzato l'effetto di questa mutazione di LRRK2 associata a MC sull'attività chinasica. Specificatamente è stata quantificata la fosforilazione del substrato Rab10 di LRRK2, da parte di LRRK2 WT e vari mutanti come G2019S, R1398H e N551K, R1398H (due varianti protettive che verranno discusse in seguito) o N2081D, i quali sono stati espressi e purificati da cellule HEK293T. È stato dimostrato che la presenza della mutazione N2081D incrementa la fosforilazione di Rab10, come avviene anche per G2019S, ma in maniera minore, circa del 30% rispetto al WT. In contrasto, nessun cambiamento della fosforilazione di Rab10 è stato osservato nelle cellule portatrici delle mutazioni R1398H, N551K, o N551K+R1398H.

Analizzando l'attività GTPasica di queste varianti, è stato scoperto che essa era aumentata nelle varianti R1398H e N551K+R1398H trasfettate in cellule HEK293T, ma non nella G2019S, N2081D o N551K.

Sempre nello studio (Hui et al., 2018) sono stati caratterizzati macrofagi M1 umani derivati da monociti, raccolti da pazienti MC che portavano la variante N2081D. Poiché LRRK2 è stato riportato influenzare l'acetilazione dell' α -tubulina (Hui et al., 2018), regolando così il traffico cellulare di proteine tramite i microtubuli del citoscheletro, si è determinato l'effetto delle mutazioni di LRRK2 nell'acetilazione della proteina α -tubulina. L'acetilazione dell' α -tubulina è coinvolta nella regolazione dell'autofagia, uno dei processi patofisiologici maggiormente coinvolti nel MC, e in maniera minore, nel MP (Hui et al., 2018). L'autofagia gioca un ruolo fondamentale nel mantenere l'omeostasi intestinale, nella regolazione dell'interazione tra il microbiota intestinale e nell'immunità innata e adattativa e nella difesa contro i patogeni intestinali. Una minore acetilazione di questa proteina è stata riportata nei macrofagi di portatori della mutazione N2081D in condizioni basali e in condizioni di stress indotto da LPS. Questo suggerisce una compromissione dell'acetilazione a riposo e una mancanza di risposta cellulare allo stress, risultando una compromissione dell'autofagia. Si ha quindi una condizione di infiammazione. In contrasto, è stata osservata una maggiore acetilazione basale dell' α -tubulina nei macrofagi dei portatori delle varianti protettive verso MC e MP, N551K e R1398H. La maggiore acetilazione porta a un aumento dell'attività autofagica, conferendo un ruolo protettivo contro l'infiammazione, in un modo non ancora identificato. Queste osservazioni sono coerenti con il fatto che N2081D sembra essere una variante di suscettibilità al MP e a IBD, mentre N551K e R1398H sono protettive verso queste malattie.

In conclusione, le principali mutazioni patogenetiche di LRRK2 che interessano il dominio chinasi tendenzialmente aumentano le risposte infiammatorie, sia nel SNC che nella periferia, in un modo direttamente o indirettamente dipendente dall'aumentata attività chinasi. Questi dati rafforzano il razionale alla base dello sviluppo degli inibitori di LRRK2 come *disease-modifying therapy*, poiché l'aumento dell'attività chinasi è correlato all'infiammazione. Si potrebbe quindi mirare al miglioramento, allo sviluppo, e allo studio di medicinali che bersagliano LRRK2 e ne inibiscono questa attività. La sua inibizione, infatti, solitamente attenua gli effetti tossici dell'iperattività di LRRK2.

Ulteriori studi futuri sarebbero necessari per comprendere meglio l'impatto sull'infiammazione di alcune mutazioni in questo dominio sull'infiammazione; infatti, si riscontra una mancanza di dati, ad esempio, per la mutazione I2020T. Come già detto, questa si è stata classificata come causativa del MP, ma non è noto quale sia l'esatta attività enzimatica *driver* della patologia.

Non sembrano essere state individuate delle varianti protettive verso il MP o il MC localizzate nel dominio chinasi.

3.2 Mutazioni nel dominio ROC

Nel dominio ROC risiede il sito di legame e di idrolisi del GTP; quindi, si può ipotizzare che una mutazione in questo punto porti a una variazione nella capacità di legame al GTP, in maniera positiva o negativa, oppure nella capacità di idrolisi del GTP, conferendo un'aumentata o una diminuita capacità GTPasica. Queste alterazioni potrebbero avere effetto sulla capacità di dimerizzazione di LRRK2 dato che il dominio ROC è implicato nella dimerizzazione. Di conseguenza ci può essere effetto anche sulla capacità chinastica, poiché è anch'essa influenzata dalla dimerizzazione. In questo modo, anche se la mutazione è localizzata in questo dominio, il meccanismo di patogenesi potrebbe comunque essere dovuto alla maggior attività chinastica. Questa affermazione viene sostenuta dal fatto che molte mutazioni localizzate in questo dominio sono patogenetiche e la patogenesi risulta dalla maggior attività chinastica.

Una prima mutazione identificata nel dominio ROC è N1437H. N1437H è una mutazione nel locus *LRRK2* c.4309 C>A che si traduce in una mutazione missenso p.Asn1437His nel dominio Roc della proteina. La mutazione LRRK2 N1437H presenta ereditarietà autosomica dominante. Questa mutazione è classificata come patogenetica causativa del MP monogenico, anche se sembra essere molto rara. Infatti, questa mutazione è stata identificata in solamente due famiglie norvegesi (Aasly et al., 2010). Clinicamente i sintomi sono comparabili a quelli del MP idiopatico, anche se con un'età minore di manifestazione. (Aasly et al., 2010) La penetranza della malattia nei portatori di questa mutazione è dipendente dall'età, approssimativamente si manifesta nell'8% dei portatori a 50 anni, fino a più dell'80% all'età di 75 anni. (Aasly et al., 2010)

Analizzando tramite saggi in vitro l'attività chinastica e di legame al GTP di LRRK2 N1437H è stato dimostrato che il dominio ROC presenta un aumento della capacità di legame al GTP, con un conseguente aumento dell'attività chinastica e capacità di autofosforilazione, in modo comparabile con i risultati ottenuti nei saggi di fosforilazione con LRRK2-G2019S (Aasly et al., 2010).

Nello studio (Huang et al., 2019) è stata caratterizzata la variante di LRRK2 N1437H a livello biochimico. Risulta che questa mutazione stabilizza LRRK2 in uno stato dimerico in soluzione, inoltre la sua attività GTPasica risulta 4 volte minore rispetto al WT. N1437H riduce l'affinità di legame al GDP di quasi 2,5 volte rispetto al WT e sembra avere una velocità di dissociazione dal GTP più lenta, indicando che N1437H potrebbe interrompere il processo di scambio nel nucleotide (Huang et al., 2019).

A parte quindi alcuni studi biochimici su LRRK2 N1437H, e qualche studio su pochi pazienti portatori, in letteratura scarseggiano analisi che legano questa mutazione all'infiammazione o ad altre patologie che non siano il MP. Quindi questa mutazione causativa del MP è stata poco caratterizzata, anche a causa del fatto, come accennato in precedenza, è stata identificata solamente in alcune popolazioni del Nord Europa.

Le mutazioni localizzate nel dominio ROC nel residuo R1441 (R1441C/G/H) sono le seconde mutazioni più comuni in LRRK2, dopo G2019S (Lewis et al., 2007). È stato dimostrato che la mutazione R1441C non altera la capacità di legame al GTP ma diminuisce l'attività GTPasica. La cosa interessante è come questo influenzi l'attività chinasi, cioè quella maggiormente coinvolta nell'aspetto patogenetico legato a LRRK2 (Lewis et al., 2007). Un possibile meccanismo per cui questa sostituzione amminoacidica potrebbe influire sull'attività della GTPasi è l'interruzione dell'interazione tra LRRK2 e un cofattore come GAP. Qualunque meccanismo sia coinvolto, il fatto che R1441C abbia una minore attività GTPasica prevede che questa mutazione aumenterà la quantità di tempo in cui LRRK2 si trova in uno stato attivo, legata al GTP. Sebbene l'attività chinasi non aumenti in modo diretto, poiché il GTP non viene idrolizzato, LRRK2 rimane attiva più a lungo e pertanto l'attività chinasi risulta indirettamente incrementata. (Lewis et al., 2007)

Analizzando la fosforilazione di Rab10, un noto substrato di LRRK2, *in vivo*, in neutrofili umani da sangue periferico, con lo scopo di misurare l'attività chinasi della proteina LRRK2 R1441G, è risultato che nei portatori della mutazione R1441G c'è un aumento di almeno 4 volte della fosforilazione di Rab10, indipendentemente dallo stato clinico della malattia. Quindi sembra che in studi *in vitro* su LRRK2 R1441G non ci sia variazione dell'attività chinasi, mentre *in vivo* i substrati di LRRK2 risultino maggiormente fosforilati in presenza di questa mutazione (Fan et al., 2021).

Nello studio (Gillardon et al., 2012) si è investigato il ruolo della variante R1441G LRRK2 nell'attivazione microgliale e nella neurotossicità microgliale in coltura. L'espressione della proteina LRRK2 è stata analizzata in cellule microgliali primarie isolate da cervelli di topi adulti mutanti R1441G, confrontate con WT. Nella microglia primaria dei topi mutanti, attivata con LPS, i livelli di proteina LRRK2 erano moderatamente elevati. Queste cellule rilasciavano una maggior quantità di citochine pro-infiammatorie, soprattutto TNF- α , rispetto ai controlli wild type. Il profilo di espressione di citochine/chemochine della microglia attivata dei topi transgenici LRRK2 R1441G è caratterizzato da livelli più alti di TNF- α , IL-1, IL-12, che sono citochine pro-infiammatorie, e da livelli più bassi di IL-10, citochina antinfiammatoria. Inoltre, l'aumento dell'espressione di diverse chemochine che regolano la migrazione e il superamento della barriera ematoencefalica da parte delle cellule immunitarie potrebbe promuovere l'infiltrazione di cellule immunitarie periferiche nel cervello dei pazienti e contribuire alla morte neuronale. D'altro canto, l'invariata espressione di mRNA di fattori neurotrofici (come GDNF, MANF, IGF) nelle colture di cellule gliali transgeniche LRRK2 R1441G suggerisce che una diminuzione di un supporto trofico derivato dalla glia probabilmente non contribuisce alla neurodegenerazione. (Gillardon et al., 2012)

Esiste un'interessante correlazione tra LRRK2 R1441G e l'autofagia, un meccanismo responsabile della degradazione delle componenti cellulari per mantenere l'omeostasi delle cellule. L'autofagia è comunemente alterata e compromessa in diverse malattie, comprese quelle neurodegenerative. È stata

dimostrata una relazione tra la mutazione R1441G di LRRK2 e una deregolazione meccanica dell'autofagia, la quale compromette la vitalità cellulare (Yakhine-Diop et al., 2022).

Si è visto come le due mutazioni trattate, N1437H e R1441C/G/H risultino patogenetiche verso il MP, mentre non sono stati pervenuti studi che colleghino queste mutazioni a IBD o ad altre patologie infiammatorie.

Nel dominio ROC di LRRK2 sono anche localizzate due particolari varianti, N551K e R1398H, che presentano un ruolo protettivo verso il MP, ma anche verso MC e sono caratterizzate da un aumento dell'attività GTPasica (Hui et al., 2018). L'aumento dell'attività GTPasica diminuisce il tempo in cui il GTP è legato a LRRK2, diminuendo perciò l'attività chinastica della stessa. Dato che le patologie infiammatorie, quali MP e IBD, che sono correlate a LRRK2, sono caratterizzate da un aumento dell'attività chinastica della proteina, si può ipotizzare che una variante con una scarsa attività chinastica non sia patogenetica, e che anzi, possa risultare protettiva.

Nel report (Gopalai et al., 2019) è stato effettuato uno studio, per la prima volta, sulle varianti N551K e R1398H nella popolazione malese. L'analisi indica come i portatori di queste varianti abbiano un ridotto rischio di sviluppare il MP, sebbene l'esatto meccanismo sottostante questo effetto non sia chiaro. Sebbene l'analisi statistica nello studio (Hui et al., 2018) indichi la mutazione N551K come significativamente associata al ridotto rischio di MC, nelle analisi biochimiche è emerso che N551K non porta a nessun effetto riscontrabile per quanto riguarda l'attività chinastica, GTPasica o di dimerizzazione. Difatti, tutti i portatori umani di N551K che sono stati analizzati portavano anche la mutazione R1398H, e, analizzando l'effetto combinato di queste due mutazioni nell'attività GTPasica, si è concluso che il vero effetto protettivo è guidato da R1398H e non da N551K. Non è noto il motivo per cui queste due mutazioni si presentino frequentemente insieme, ma sarebbe interessante condurre uno studio su questo.

Molti altri studi sono necessari per determinare il meccanismo cellulare con cui è raggiunto l'effetto protettivo. È noto, come già detto, che in presenza di queste mutazioni o diminuzione protettive si ha una maggiore acetilazione dell' α -tubulina (Hui et al., 2018). Questo porta a un aumento dell'attività autofagica, conferendo un ruolo protettivo contro l'infiammazione, in un modo non ancora identificato.

La scoperta di questi alleli protettivi è di particolare importanza dato che essi offrono la possibilità di esplorare possibili meccanismi terapeutici. Infatti, i presenti studi rafforzano il razionale alla base dello sviluppo degli inibitori di LRRK2, che potrebbero essere benefici sia nel trattamento di MC che di MP. Queste scoperte supportano LRRK2 come un importante bersaglio di medicinali per trattare queste malattie. Ancora ulteriori approfondimenti sul meccanismo esatto con cui queste varianti agiscano sono però necessari, in quanto ci sono lacune in letteratura sulle esatte pathway in cui queste varianti agiscono per svolgere il loro ruolo protettivo.

3.3 Mutazioni nel dominio COR

Tra le mutazioni legate al MP, quelle localizzate nel dominio COR non sono state caratterizzate approfonditamente, poiché sono tra le più rare. Una di queste è la mutazione ereditaria Y1699C, identificata in famiglie tedesco-Canadesi e in UK, e classificata come causativa di MP. (Nguyen & Moore, 2017).

Nello studio condotto (Daniëls et al., 2011) è stato analizzato l'effetto della mutazione patogenetica Y1699C nell'attività GTPasica di LRRK2 e nella dimerizzazione. È risultato che la mutazione provoca una diminuzione dell'attività GTPasica, comparabile a quella del mutante patogenetico R1441C (Daniëls et al., 2011), e un indebolimento della capacità di dimerizzazione. Questo studio ha dimostrato che primariamente la mutazione va a interferire con la capacità di dimerizzazione, e, dato che essa è funzionale per l'attività catalitica, si osserva una diminuzione della capacità GTPasica. Non sono state pervenute invece informazioni sull'attività chinasica.

Nonostante sia stata classificata come una variante causativa del MP, non ci sono dati su come Y1699C impatti sull'infiammazione e su come questa mutazione sia un *driver* di malattia. Tuttavia, basandosi sulle similarità tra questa mutazione e R1441C in termini di ridotta attività GTPasica, è possibile ipotizzare che LRRK2 Y1699C si comporti in modo simile, aumentando la fosforilazione dei substrati di LRRK2 in modo indiretto, e che porti ad un aumento dell'infiammazione centrale.

La mutazione R1628P si trova nel dominio COR ed è il secondo fattore genetico di rischio più comune per il MP nella popolazione cinese. Poco è conosciuto sull'influenza di R1628P sull'attività chinasica di LRRK2. Nello studio (Shu et al., 2016) è stato scoperto che la sostituzione in questione non altera l'attività chinasica e non causa la morte neuronale direttamente. Risulta invece che questa variante trasformi un suo residuo amminoacidico adiacente in un nuovo sito di fosforilazione di Cdk5. In presenza di Cdk5, essa fosforila LRRK2 in questo residuo e LRRK2 così fosforilata presenta un'aumentata capacità chinasica (Shu et al., 2016). È stato provato anche che i neuroni che esprimono ectopicamente R1628P mostrano una maggior sensibilità a neurotossine come MPP+. Quindi R1628P non altera di per sé l'attività chinasica e non provoca morte neuronale, ma piuttosto aumenta la suscettibilità dei portatori a tossine ambientali o allo stress causato dall'età, che conseguenzialmente attiva Cdk5. Questo quindi porta ad un aumento indiretto dell'attività chinasica di LRRK2. Essendo questa variante associata al MP e caratterizzata da una maggiore attività chinasica indiretta, si può supporre che porti ad un aumento dell'infiammazione nel sistema nervoso centrale, anche se non sono presenti dati su questo in letteratura. Anche per questa mutazione sono necessari ulteriori studi che investighino sull'impatto infiammatorio.

Le mutazioni ereditarie nel dominio COR sono state mostrate ridurre l'attività GTPasica in modo variabile (Nguyen & Moore, 2017). Le varianti R1441C, R1441G, R1441H nel dominio ROC precedentemente analizzate e Y1699C nel dominio COR, esibiscono tutte una diminuzione dell'idrolisi del GTP se comparate a LRRK2 WT (Nguyen & Moore, 2017). Le mutazioni ereditarie nel dominio chinasico, come

G2019S, non hanno un effetto osservabile nel legame o nell'idrolisi del GTP suggerendo che il loro effetto patogenetico sia solamente mediato dall'alterazione dell'attività chinasi. All'opposto, le mutazioni localizzate nei domini ROC e COR non hanno effetto diretto sull'attività chinasi, ma possono aumentarla in modo indiretto.

3.4 Mutazioni nel dominio WD40

La mutazione G2385R si trova nella superficie del dominio C-terminale WD40, che è uno dei domini di interazione proteina-proteina di LRRK2, e questa sostituzione interferisce con le interazioni omotipiche ed eterotipiche di LRRK2, compromettendo soprattutto la formazione di dimeri di LRRK2, quindi di conseguenza sulla sua funzionalità. G2385R è stata classificata come una variante di suscettibilità per il MP (Aasly et al., 2010), in particolare viene considerato come il fattore di rischio di MP più comune nella popolazione asiatica, con un rischio aumentato del doppio nella popolazione cinese, rispetto alla variante G2019S (Aasly et al., 2010). Nella popolazione cinese e giapponese la variante G2385R ha una frequenza di 6.7-11.6% nei pazienti sporadici di MP e del 3.6-5.6% negli individui sani (Aasly et al., 2010). Se si confrontano i pazienti portatori di questa mutazione rispetto ai pazienti che presentano MP idiopatico, si nota che i portatori hanno una frequenza più alta di storia familiare di MP, una durata della malattia più lunga, un'età di manifestazione della malattia più bassa e una maggior proporzione di pazienti con instabilità posturale e che presentano un fenotipo con disordini intestinali. In più, i portatori sono caratterizzati da complicazioni indotte da levodopa, incluse fluttuazioni motorie e discinesia, e anche fenotipi specifici non motori come disordini nella fase REM (rapid eye movement) del sonno e affaticamento (Tezuka et al., 2022).

È stato riportato che la variante G2385R ha effetto sull'interazione tra LRRK2 e le vescicole sinaptiche (VS). In particolare, sembra che questa variante si leghi meno efficientemente ad alcune proteine presinaptiche chiave, incluse e l'actina e la sinapsina. Possiamo ipotizzare che la variante G2385R abroghi parzialmente la funzione di LRRK2 nel limitare il movimento delle vescicole. Un legame alterato di LRRK2 alla sinapsina e all'actina, nonché a SV, potrebbe consentire la redistribuzione della vescicola verso la membrana e, infine, promuovere una fusione più efficiente (Rudenko et al., 2012).

I risultati degli studi sull'attività chinasi dei mutanti G2385R sono spesso contrastanti. Infatti, mentre alcuni studi riportano un aumento moderato dell'attività chinasi, osservando ad esempio la fosforilazione di Rab 10 nei pazienti portatori, molti altri studi riportano che essa non alteri o riduca l'attività chinasi in vitro o in colture cellulari (Tezuka et al., 2022). Queste differenze non è chiaro a cosa siano dovute, potrebbero essere causa dell'utilizzo di sistemi modello diversi, oppure saggi enzimatici diversi. Nello studio (Ho et al., 2016) è risultato che questa mutazione mostra una diminuzione dell'attività chinasi. Questo potrebbe essere correlato all'incapacità di dimerizzazione funzionale della variante G2385R, date le funzioni che WD40 svolge nella dimerizzazione e dato che essa è critica per l'attività GTPasi e chinasi. Quindi, la variante G2385R

potrebbe alterare l'attività fisiologica di LRRK2, e di conseguenza, si comporta come una mutazione parzialmente *loss of function*.

Quindi anche se G2385R è un fattore genetico di rischio ben stabilito per il MP, e di solito le mutazioni patogenetiche mostrano un'aumentata attività chinasica, in questo caso pare che diminuisca (Tezuka et al., 2022). Questo appunto è in contrasto con il meccanismo patogenetico di mutazioni come G2019S. L'implicazione di questi risultati per la patogenesi è incerta; una possibilità potrebbe essere che l'attività chinasica di LRRK2 sia tollerata in un certo *range* abbastanza ristretto, ed entrambe le varianti *loss* o *gain of function* possono essere patogenetiche. È anche possibile che la sostituzione vada a modificare le proprietà di impalcatura della proteina e che questo porti a effetti patogenetici. Se questo è vero, allora bloccare l'attività chinasica potrebbe non essere l'unica via con cui interferire con la disfunzione di LRRK2.

Anche la variante M2397T è localizzata nel dominio WD40. È considerato un allele di rischio per IBD, in particolare di MC (Fujioka et al., 2017), ha effetto sul turnover di LRRK2 ma non ha effetto nell'attività chinasica (Fujioka et al., 2017). In particolare sembra che LRRK2 che presenta questa variante abbia un turnover più veloce, il quale provoca un deficit di LRRK2, che a sua volta causa la traslocazione di NFAT nel nucleo, il che induce la trascrizione di citochine pro-infiammatorie. Possiamo considerare questa mutazione come una variante *loss of function*, dato che a differenza della maggior parte delle mutazioni, l'effetto patologico/infiammatorio sembra mediato da un deficit di LRRK2. La presenza di questa variante è stata associata anche ad un'eccessiva infiammazione nella lebbra, una malattia caratterizzata da un'eccessiva risposta pro-infiammatoria chiamata reazione di tipo 1 (T1R) (Weykopf et al., 2019). M2397R è considerato un allele di rischio per T1R, e mostra un'esacerbazione della risposta pro-infiammatoria (Fava et al., 2016). Questa, se non trattata, può portare a un irreversibile danno ai nervi dovuto alla risposta immunitaria eccessiva (Fava et al. 2016). Questo suggerisce che un turnover più veloce di LRRK2 porta ad un aumento della risposta pro-infiammatoria, la quale caratterizza queste malattie. (Fava et al., 2016)

Sembra quindi che le mutazioni nel dominio WD40 analizzate abbiano un diverso meccanismo di patogenesi, quale la *loss of function* di LRRK2, a differenza delle altre mutazioni che sono patogenetiche a causa di un'aumentata attività chinasica, diretta o indiretta.

4. Conclusioni

In questo lavoro di tirocinio sono state analizzate le più comuni mutazioni di LRRK2 associate a malattia, mettendone in luce l'associazione con il MP e il MC, e confrontandone l'impatto sull'infiammazione. Si è visto come le mutazioni patogenetiche abbiano in comune principalmente l'aumentata attività chinasi, la quale può essere aumentata direttamente a causa di una mutazione nel dominio chinasi, come G2019S, oppure indirettamente, come nel caso delle mutazioni del dominio GTPasi. È noto come anche l'attività GTPasi e la capacità di dimerizzazione abbiano influenza sull'attività di LRRK2; quindi, anche mutazioni che non sono localizzate nel dominio KIN, come N1437H o R1628P possano essere patogenetiche con un meccanismo dipendente dalla fosforilazione eccessiva dei substrati. In questo caso si ha comunque un meccanismo patogenetico guidato, anche se indirettamente, da una maggior attività di LRRK2. Quindi è stata verificata la coerenza tra l'aumento dell'attività chinasi e la presenza di infiammazione. Si è visto però che sembrano esserci anche altri meccanismi di patogenesi, in particolare per mutazioni nel dominio WD invece abbiamo malattia che sembra derivata da una *loss of function*.

Particolarmente interessanti potrebbero essere ulteriori studi mirati a comprendere l'attività enzimatica e l'effetto sull'infiammazione delle varianti protettive N551K e R1398H. La comprensione di come esse agiscono potrebbe essere d'aiuto per lo sviluppo di nuove terapie mirate all'eziologia delle malattie legate a LRRK2.

Ad oggi, molti studi si sono focalizzati sulle mutazioni più comuni come G2019S e R1441C/G/H mentre le mutazioni più rare vengono più raramente investigate. La maggior parte delle mutazioni patogenetiche di LRRK2 legate al MP o IBD sono dovute a un'aumentata attività chinasi e di conseguenza la maggior parte dei medicinali mirano a inibire quest'ultima. Si deve tenere in considerazione sempre il fatto che anche l'inibizione a lungo termine dell'attività chinasi della proteina potrebbe comunque portare all'insorgenza di effetti avversi. Dato che LRRK2 ha fondamentalmente una duplice attività enzimatica, la regolazione dell'attività GTPasi potrebbe essere un nuovo target per lo sviluppo di farmaci.

Ulteriori studi su come le diverse varianti impattano sulla funzionalità di LRRK2, e soprattutto su come questa alterata attività si rifletta sull'infiammazione, sono necessari dapprima per comprendere esattamente quale sia il ruolo di LRRK2 nell'immunità, il quale è ancora molto dibattuto. Inoltre, ulteriori studi incrociati che leghino LRRK2, MP e IBD aiuterebbero a comprendere il rischio di sviluppare una malattia quando un paziente è già affetto dall'altra. In questo modo, capendo come l'infiammazione periferica presente in IBD, possa portare alla neuroinfiammazione, si potrebbe agire precocemente per evitare o almeno ritardare l'insorgenza del MP.

Bibliografia

- Bae, J. R., & Lee, B. D. (2015). Function and dysfunction of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2): Parkinson's disease and beyond. In *BMB Reports* (Vol. 48, Issue 5, pp. 243–248). The Biochemical Society of the Republic of Korea. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.5.032>
- Ho, D. H., Jang, J., Joe, E. H., Son, I., Seo, H., & Seol, W. (2016). G2385R and I2020T Mutations Increase LRRK2 GTPase Activity. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7917128>
- Ho, D. H., Je, A. R., Lee, H., Son, I., Kweon, H. S., Kim, H. G., & Seol, W. (2018). LRRK2 kinase activity induces mitochondrial fission in microglia via Drp1 and modulates neuroinflammation. *Experimental Neurobiology*, 27(3), 171–180. <https://doi.org/10.5607/en.2018.27.3.171>
- Hui, K. Y., Fernandez-Hernandez, H., Hu, J., Schaffner, A., Pankratz, N., Hsu, N. Y., Chuang, L. S., Carmi, S., Villaverde, N., Li, X., Rivas, M., Levine, A. P., Bao, X., Labrias, P. R., Haritunians, T., Ruane, D., Gettler, K., Chen, E., Li, D., ... Peter, I. (2018). Functional variants in the LRRK2 gene confer shared effects on risk for Crohn's disease and Parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, 10(423). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai7795>
- Kalogeropoulou, A. F., Purlyte, E., Tonelli, F., Lange, S. M., Wightman, M., Prescott, A. R., Padmanabhan, S., Sammler, E., & Alessi, D. R. (2022). Impact of 100 LRRK2 variants
- Ren, C., Ding, Y., Wei, S., Guan, L., Zhang, C., Ji, Y., Wang, F., Yin, S., & Yin, P. (2019). G2019S Variation in LRRK2: An Ideal Model for the Study of Parkinson's Disease? In *Frontiers in Human Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2019.00306>
- Russo, I., Bubacco, L., & Greggio, E. (2022). LRRK2 as a target for modulating immune system responses. *Neurobiology of Disease*, 169. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105724>
- Seol, W. (2007). Biochemical and molecular features of LRRK2 and its pathophysiological roles in Parkinson's disease. <http://bmbreports.org>
- Usmani, A., Shavarebi, F., & Hiniker, A. (2021). The Cell Biology of LRRK2 in Parkinson's Disease. *Molecular and Cellular Biology*, 41(5). <https://doi.org/10.1128/mcb.00660-20>
- Wallings, R. L., Herrick, M. K., & Tansey, M. G. (2020a). LRRK2 at the Interface Between Peripheral and Central Immune Function in Parkinson's. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00443>