UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

Il legame lipidico inibisce la formazione fibrillare di α-sinucleina

Tesi di laurea di:
Enrico Iarussi

LIPID BINDING INHIBITS α -SYNUCLEIN FIBRIL FORMATION

Docente referente:
Prof.
Andrea Antonino Scirè

Anno Accademico
2019/2020

ALFA-SINUCLEINA

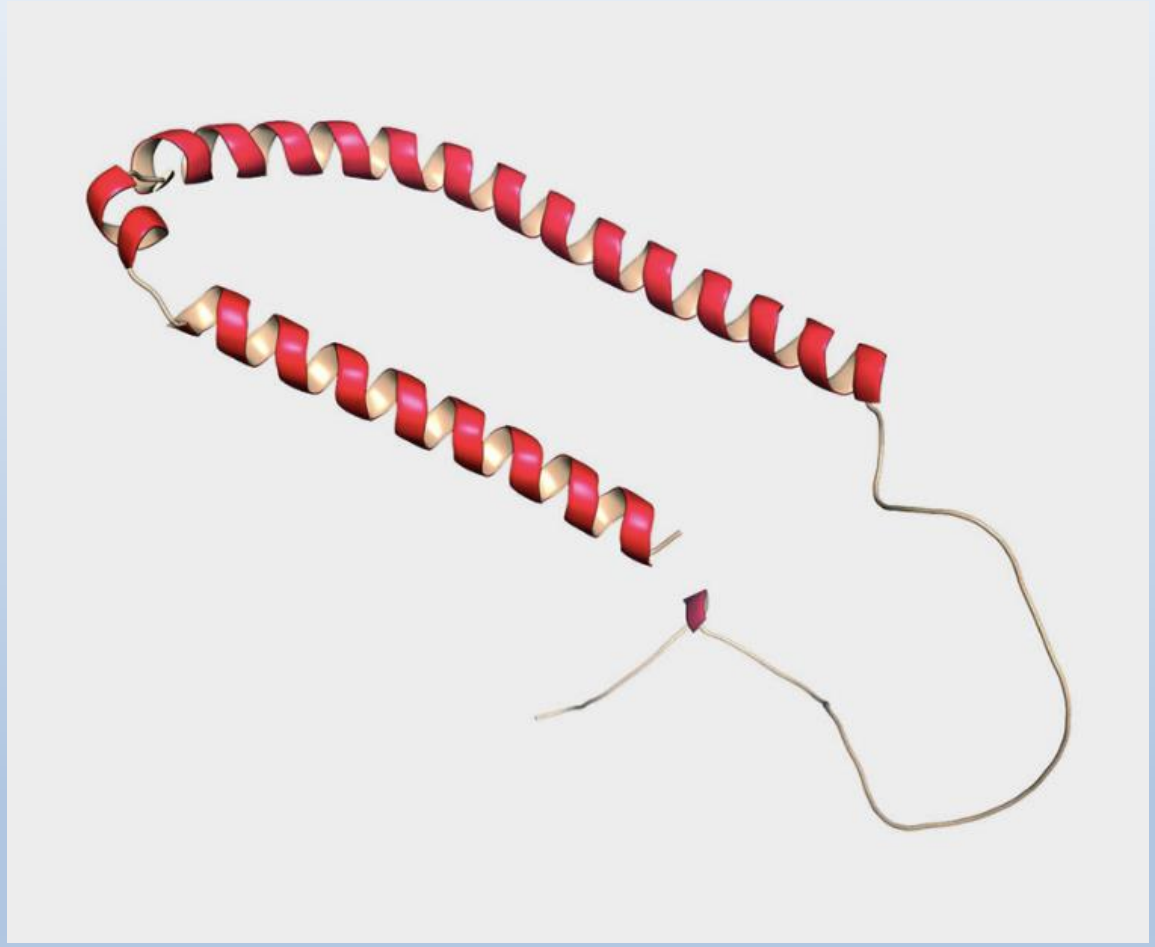
L'alfa-sinucleina è una proteina acida neuronale costituita da 140 amminoacidi.

Ha una struttura costituita da tre domini:

- N-terminale anfipatico
- C-terminale idrofilico
- Intermedio idrofobico (NAC)

Un importante aspetto dell'alfa-sinucleina è che l'elica, caratterizzata da residui di base raggruppati all'interfaccia polare-apolare, lega i lipidi di classe A2.

Nella forma purificata (pH neutro) manca la struttura secondaria o terziaria.



Peso molecolare: 14 Kda

N. amminoacidi: 140

ALFA-SINUCLEINA

La maggior parte dell' α-sinucleina si trova nel citosol neuronale.

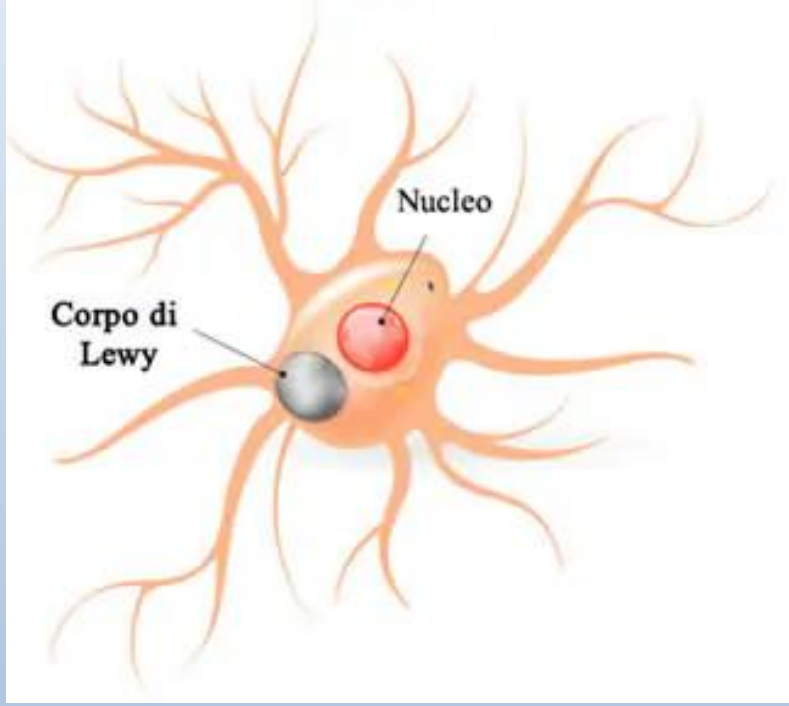
È stato notato che l' α-sinucleina legata alla membrana svolge un ruolo importante nella formazione della fibrilla.

È probabile che l'affinità differenziale per specifici fosfolipidi sia responsabile della posizione della proteina e della formazione delle fibrille.

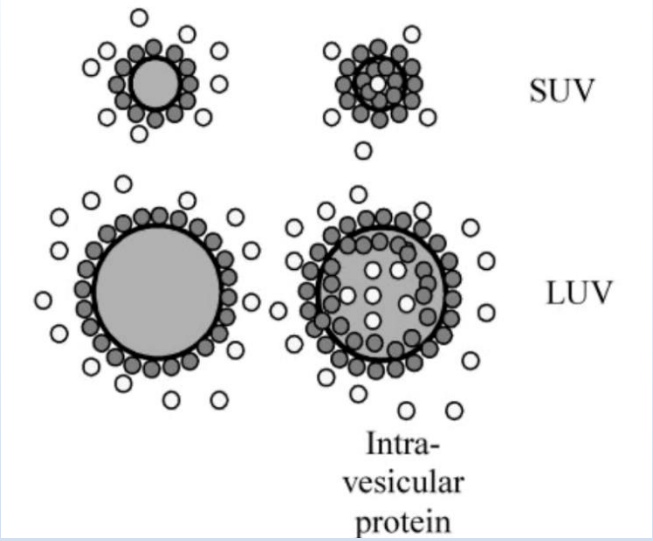
È stato studiato che le soluzioni di α-sinucleina si associano tra loro formando oligomeri che alla fine si aggregano dando origine ai corpi di Lewy.

I **corpi di Lewy** sono dei piccoli aggregati proteici insolubili che si formano nel citoplasma delle cellule nervose celebrali.

I **corpi di Lewi** giocano un ruolo centrale nella patogenesi della malattia di Parkinson.



IL LEGAME DELL' ALFA-SINUCLEINA



- Con piccole vescicole unilamellari (SUV) che contengono fosfolipidi acidi
- Con grandi vescicole unilamellari (LUV) che contengono gruppi anionici

INDUZIONE CONFORMAZIONE ALFA-ELICA
IN ALCUNI CASI AUMENTO DI FIBRILLAZIONE

- Con membrane neutre

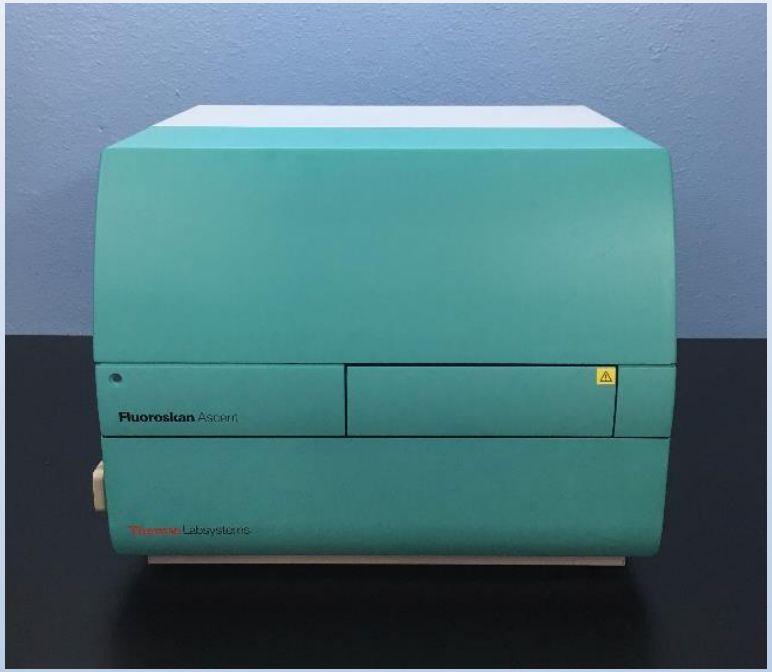
INIBIZIONE COMPLETA DI FIBRILLAZIONE

MATERIALI E METODI

Materiali:

- 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (sodium salt) **(PA)**
- Tetraidrotiofene **(ThT)**
- 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3- phosphocholine **(PC)**
- 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-RAC-(1- glycerol) **(PG)**

1. Espressione e purificazione della proteina
2. Preparazione dei SUV e LUV
3. Misurazione dicroismo circolare: ottenuto con AVIV 60DS spettrofotometro
4. Misurazione dell'aggregazione dell'alfa-sinucleina con microscopio a forza atomica
5. Misurazione cinetica dell'aggregazione dell'alpha-sinucleina

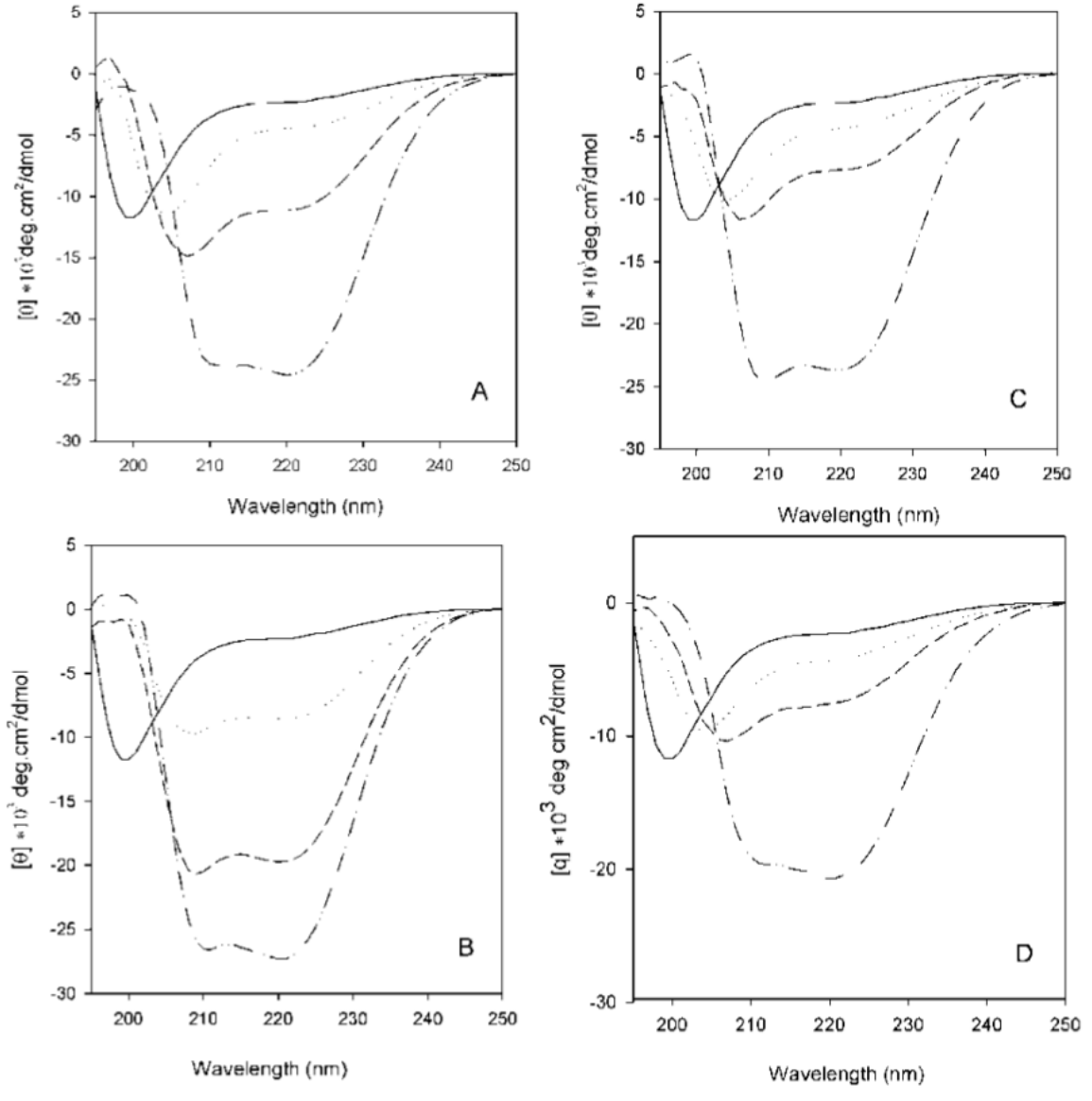


Fluoroskan Ascent, Thermo-Labsystems

- Le intensità di fluorescenza sono state registrate in situ a intervalli di 30 minuti usando un lettore di piastre a fluorescenza (Fluoroskan Ascent, Thermo-Labsystems)

- Esperimenti di controllo hanno dimostrato che la presenza di ThT (fino ad almeno 20 micro M) non ha alcun effetto sulla cinetica della fibrillazione dell' α -sinucleina.

RISULTATI



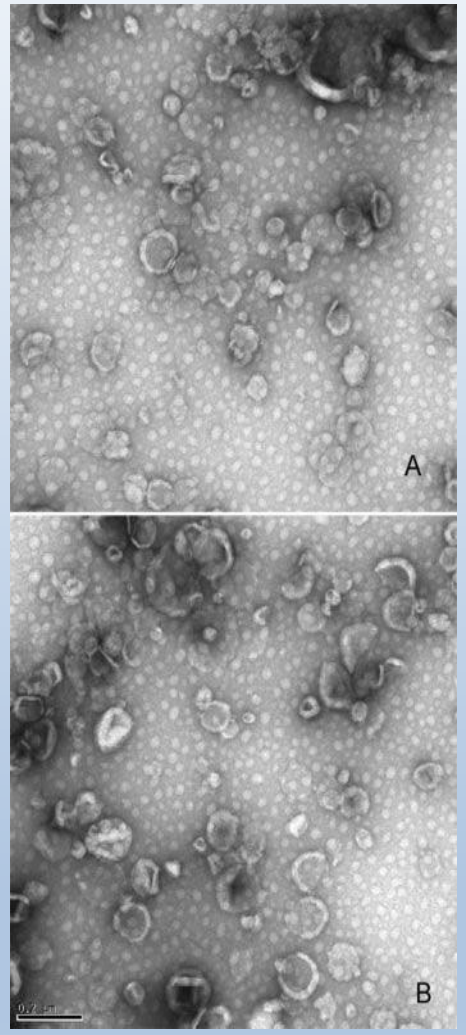
L'incremento della concentrazione lipidica induce una struttura α-elica nella α-sinucleina

Spettri di α-sinucleina ottenuti:

- Linea intera : α-sinucleina isolata
- Linea punti: PA/PC con proteina
- *A*, SUVs;
- *B* SUVs con proteine intra-vescicolari
- *C* LUVs;
- *D* LUVs con proteine intra-vescicolari

I grafici mostrano che l'aumento della concentrazione di lipidi induce il passaggio dell' α-sinucleina dalla conformazione disordinata a quella α-elica.

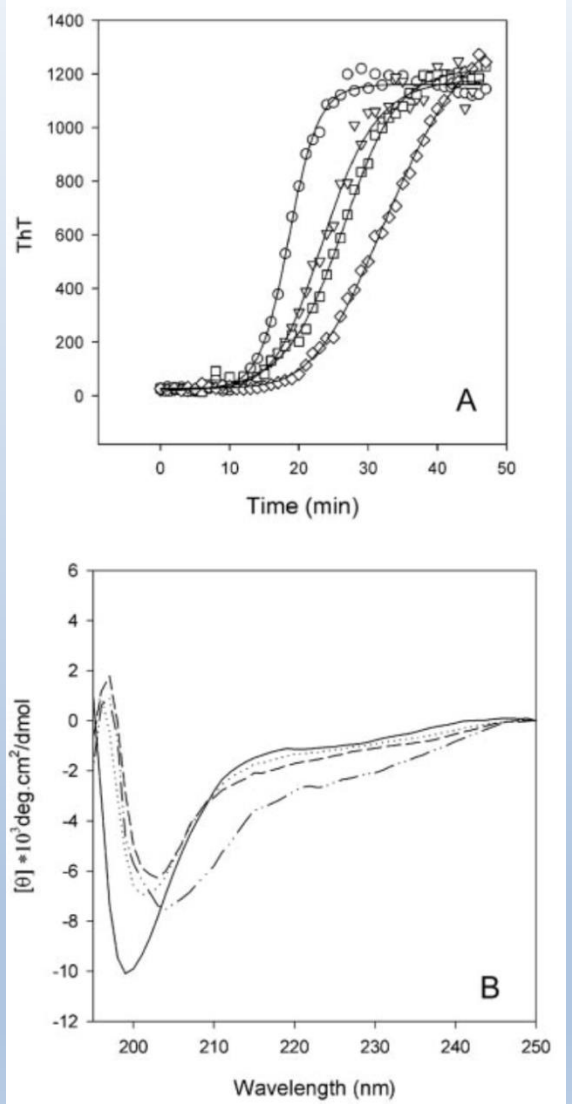
RISULTATI



Micrografie elettroniche mostrano che il legame dell' α-sinucleina, nella sua conformazione α-elica, non rompe le vescicole.

Sono mostrati:

- SUV di PA / PC senza α-sinucleina (A)
- SUV di PA / PC con α-sinucleina (B)

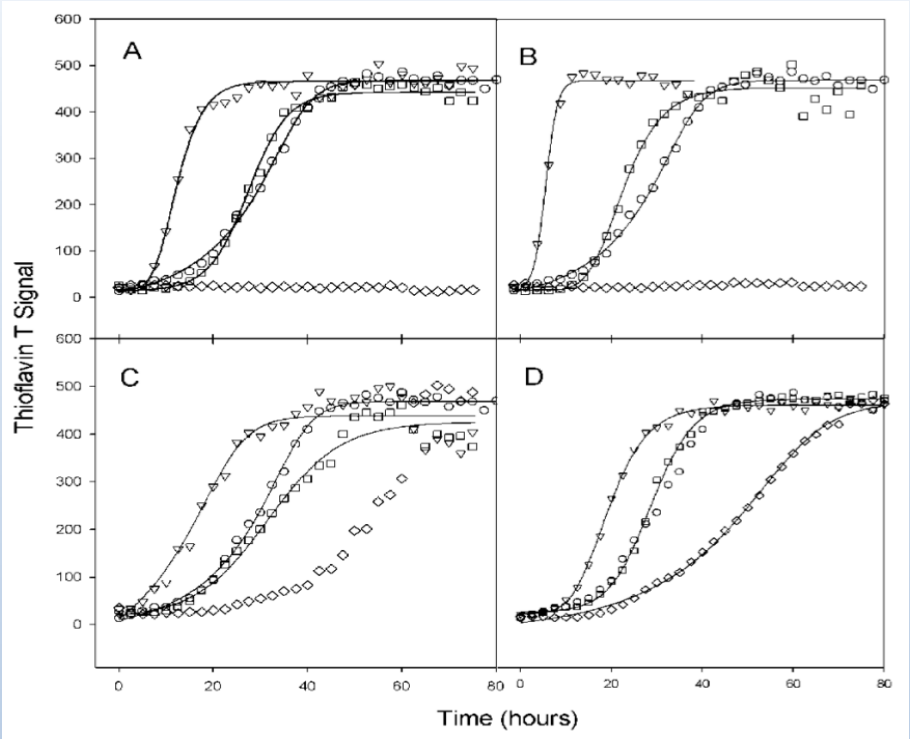


Le vescicole PC non inducono una struttura α-elica nell'alfa-sinucleina e inibiscono la fibrillazione

I cerchi rappresentano α-sinucleina isolata, i triangoli rovesciati fibrillazione in presenza di SUV PC alle proteine: rapporti di massa lipidica di 1: 5, 1:10 (quadrati) e 1:20 (diamanti).

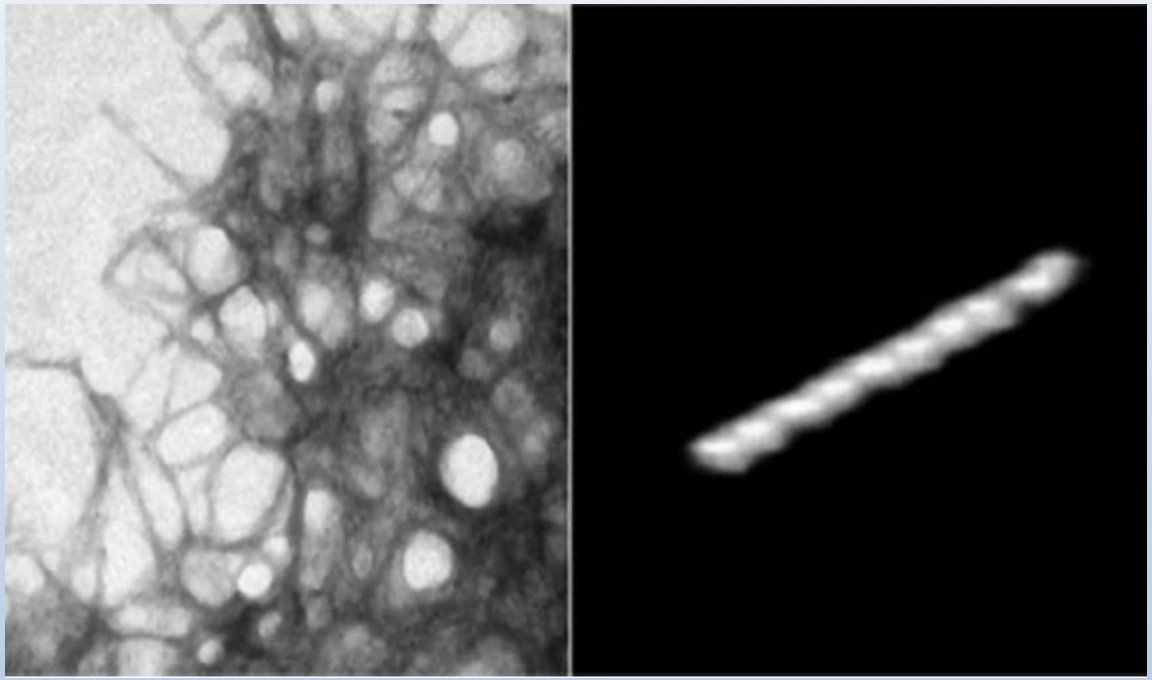
Spettri far-UV CD di α-sinucleina (linea continua) legata a SUV/PC con rapporto proteine: massa lipidica di 5: 1 (linea punteggiata), 1: 1 (linea tratteggiata) e 1: 5 (linea punteggiata-tratteggiata).

RISULTATI



L'effetto delle vescicole sulla cinetica della fibrillazione dell' α-sinucleina

Cerchi α-sinucleina da sola. A, in presenza di vescicole PA / PC sotto forma di SUV proteici non intravesicolari; B, SUV di proteine intravesicolari; C, LUV proteici non intravesicolari; D, LUV proteici intravesicolari alla proteina: rapporti lipidici di 5: 1 (triangoli invertiti), 1: 1 (quadrati) e 1: 5 (diamanti). Alte concentrazioni di SUV hanno inibito completamente la fibrillazione (A e B).



La morfologia delle fibrille α-sinucleina cresciute in presenza di vescicole è simile a quella delle fibrille cresciute in assenza di lipidi.

Pannello sinistro, immagine EM delle fibrille; pannello di destra, immagine AFM di una singola fibrilla di α-sinucleina in presenza di SUV PA / PC con una proteina: rapporto lipidico di 1: 1.

CONCLUSIONI

- L’effetto delle vescicole sulla fibrillazione dell’ α-sinucleina dipende dal rapporto proteine/lipidi
- Elevato contenuto lipidico induce un aumento significativo α-elica di α-sinucleina (60% - 85%)
- L’effetto delle vescicole sulla fibrillazione dipende dalla grandezza delle vescicole (SUVs, LUVs)
- Il legame tra α-sinucleina e LUVs diminuisce la velocità di fibrillazione, ma non la inibisce completamente con una concentrazione di 60-70% di α-sinucleina in α-elica
- L’α-sinucleina in conformazione α-elica inibisce la fibrillazione

GRAZIE PER L’ATTENZIONE

Enrico Iarussi