UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

Dipartimento
di Scienze
della Vita
e dell'Ambiente
DISVA

Corso di laurea: Scienze Biologiche

Un nuovo agonista del recettore 5-HT_{1B} di composti vegetali e uno degli usi terapeutici per il morbo di Alzheimer

A Novel 5-HT_{1B} Receptor Agonist of Herbal Compounds and One of the Therapeutic Uses for Alzheimer's Disease

Tesi di Goffredi Carlotta

Relatore: Prof. ssa Galeazzi Roberta

Sessione Straordinaria: Maggio 2023

Anno Accademico: 2022/2023

RIASSUNTO

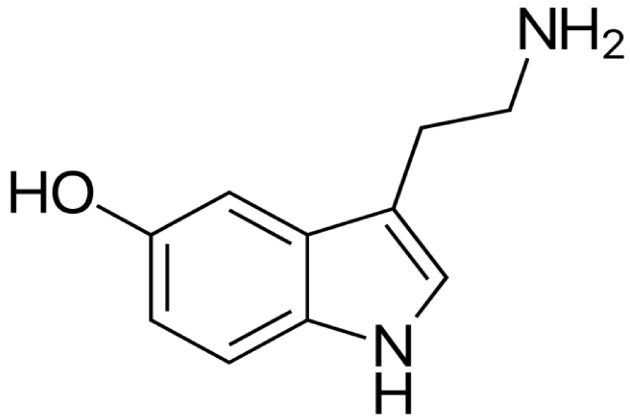
1. **INTRODUZIONE**: Il recettore della serotonina 5-HT_{1B} è ampiamente espresso nel sistema nervoso centrale ed è stato considerato un bersaglio farmacologico in una varietà di disturbi cognitivi e psichiatrici; gli effetti antinfiammatori degli agonisti del recettore possono presentare un approccio promettente per il trattamento della malattia di Alzheimer (AD). Focalizzazione sui recettori della serotonina, il morbo di Alzheimer e gli antidepressivi vegetali.
2. **OBIETTIVO**: Descrivere i metodi per l'identificazione dell'agonista EG del recettore 5-HT_{1B} da composti vegetali e valutare le sue funzioni biologiche.
3. **MATERIALI e METODI**: Per identificare EG sono stati impiegati diversi test tra cui: Docking Molecolare, DARTS, CETSA, esperimenti FRET, CCK-8, MTT, LDH e il modello transgenico di C. Elegans.
4. **RISULTATI**: Attraverso i saggi precedenti è stato possibile identificare EG e valutare le sue funzioni biologiche convalidando alcune proprietà fondamentali: EG prende di mira il recettore della serotonina 5-HT_{1B} dimostrando nei confronti di quest'ultimo effetto protettivo e di stabilizzazione termodinamica; EG esibisce attività agonistica verso 5-HT_{1B} e poteva attivare selettivamente la via di segnalazione mediata da 5-HT_{1B} ; EG allevia la mortalità cellulare indotta da $A\beta_{40-42}$; EG riduce la segnalazione TNF-α pro-infiammatoria indotta da $A\beta$ ed infine EG protegge C. Elegans contro la morbilità nel modello AD.
5. **CONCLUSIONE**: Nel trattamento del morbo di Alzheimer, il recettore della serotonina 5-HT_{1B} è considerato bersaglio terapeutico di EG, antidepressivo a base di erbe, suo agonista e di conseguenza agente terapeutico.

INTRODUZIONE: I RECETTORI DELLA SEROTONINA

Il **sistema serotoninergico** è importante nella regolazione dei processi cruciali nel sistema nervoso centrale (SNC).

Questi effetti sono mediati dai recettori della serotonina

- Sono 7 (**5-HT$_1$**, 5-HT$_2$, 5-HT$_3$, 5-HT$_4$, 5-HT$_5$, 5-HT$_6$, 5-HT$_7$)
- Accoppiati a proteine G (**GPCR**)
- Regolano sia l'**eccitazione** che l'**inibizione** della trasmissione sinaptica
- La **serotonina** agisce come ligando
- Espressi nel **SNC**
- Bersagli farmacologici (morbo di Alzheimer, depressione)



Serotonina

In questo studio verrà analizzato il recettore **5-HT$_{1B}$**

MALATTIA o MORBO DI ALZHEIMER (AD)

Forma più comune di **demenza** ad esordio in età adulta.

È una **malattia neurodegenerativa** caratterizzata da progressiva **perdita di memoria**.

Fisiopatologia di questa malattia:

- Deficit di **acetilcolina**;
- Depositi di β-amiloide (Aβ);
- Fosforilazione della proteina **τ**;
- **Stress ossidativo**;
- **Neuroinfiammazione**;

Inoltre, **riduzione** della massa cerebrale o **atrofia cerebrale**;

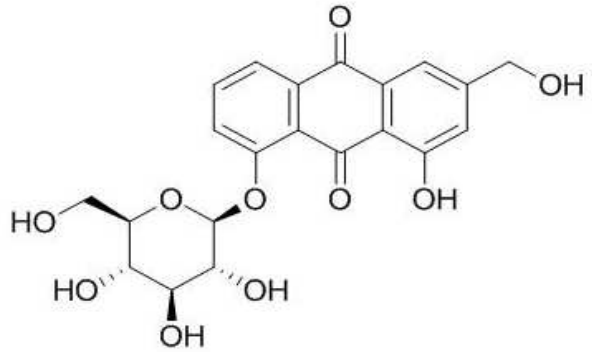
L'attivazione mediata da **Aβ** della segnalazione pro-infiammatoria del fattore di necrosi tumorale **(TNF)-α** nel cervello è stata segnalata come causa di **perdita di memoria** nei topi.

L'innesco del recettore **5-HT_{1B}** da parte di un suo agonista **blocca** la risposta infiammatoria indotta da Aβ.

ANTIDEPRESSIVI VEGETALI

La natura multifattoriale dell'AD ha portato alla progettazione **di ligandi multi-target** (MTDL) basati sul paradigma "una molecola, più bersagli".

Diverse linee di evidenza supportano l'uso terapeutico di antidepressivi a base di erbe nel trattamento dell'AD;



EG, emodin-8-O-β-d-glucopyranoside

- Componente di ***Polygonum multiflorum*** e *Rheum officinale*;
- Ligando **selettivo** di 5-HT_{1B};
- Riduce **l'infiammazione neuronale** e **apoptosi**;

I componenti principali di *Polygonum multiflorum* sono stati determinati come **stilbeni**, **chinoni** e **flavonoidi**.

OBIETTIVO

Questo studio descrive i metodi per l'**identificazione** dell'agonista **EG** del recettore 5-HT_{1B} da composti vegetali e la **valutazione** delle sue funzioni biologiche, dimostrando l'importanza:

- del recettore **5-HT_{1B}** come bersaglio terapeutico
- dell'agonista **EG** come agente terapeutico

per le malattie legate al sistema della serotonina come il morbo di Alzheimer.

MATERIALI e METODI

Per identificare l'emodin-8-O-β-d-glucopyranoside (EG) sono stati utilizzati diversi test:

- **Docking molecolare** o attracco molecolare ➡ Utile per predire sia la forza che il tipo di segnale prodotto in seguito al legame proteina-ligando e **identificare** bersagli specifici;

  In questo studio viene utilizzato per determinare **se** l'EG si lega al GPCR 5-HT_{1B} umano;

- **DARTS** ➡ Sfrutta una riduzione della suscettibilità alla proteasi della proteina bersaglio in seguito al legame con il farmaco;

  In questo studio viene impiegato per verificare l'**interazione** di EG con 5-HT_{1B} (digestione pronasica);

- **CETSA** ➡ Si basa sul principio della stabilizzazione termodinamica, indotta dal ligando, delle proteine bersaglio;

  In questo studio viene impiegato per verificare l'**interazione** di EG con 5-HT_{1B} (riscaldamento);

- **FRET➡** Trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza; si sfrutta per la determinazione delle strutture molecolari e della distanza fra molecole. Prevede la presenza di un donatore e di un accettore;

  In questo studio vengono prodotti dei costrutti di sensori 5-HT_{1B} FRET efficaci utilizzati come strumenti ottici per il **legame** del ligando GPCR;

  Successivamente viene effettuato l'**imaging** del sensore FRET intramolecolare di EG come agonista 5-HT_{1B};

  Infine, attraverso l'analisi di **nuove linee cellulari stabili**, viene dimostra l'attività selettiva di EG nei confronti di 5-HT_{1B};

- **CCK-8 ➡** Kit utilizzato per il conteggio cellulare o vitalità cellulare;

  In questo studio viene utilizzato per calcolare la **vitalità** delle cellule PC12 in seguito al trattamento con $A\beta_{40-42}$ in presenza, o meno, di EG;

- **MTT** e **LDH** ➡ Saggi utilizzati per determinare la citotossicità;

  In questo studio vengono impiegati per calcolare la **citotossicità** di cellule PC12 pretrattate con gli agonisti del recettore 5-HT_{1B} (CP-94253, diidroergotamina ed EG), seguiti da $A\beta_{42}$ e l'antagonista SB 224289, quando necessario;

- **Modello transgenico di C. Elegans** ➡ Il nematode C. Elegans può essere ingegnerizzato transgenicamente per esprimere l'Aβ umano indotto all'aumentare della temperatura e, di conseguenza, mostrare un fenotipo di paralisi;

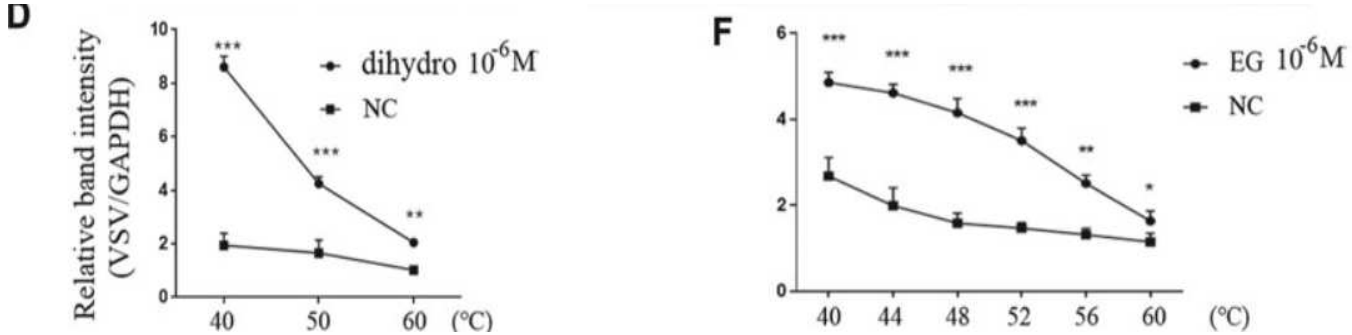
  In questo studio il ceppo CL14176, mostra fenotipo di paralisi utilizzato come misura della tossicità dell'Aβ per analizzare gli **effetti** dei **composti protettivi** contro l'Aβ, come **EG**;

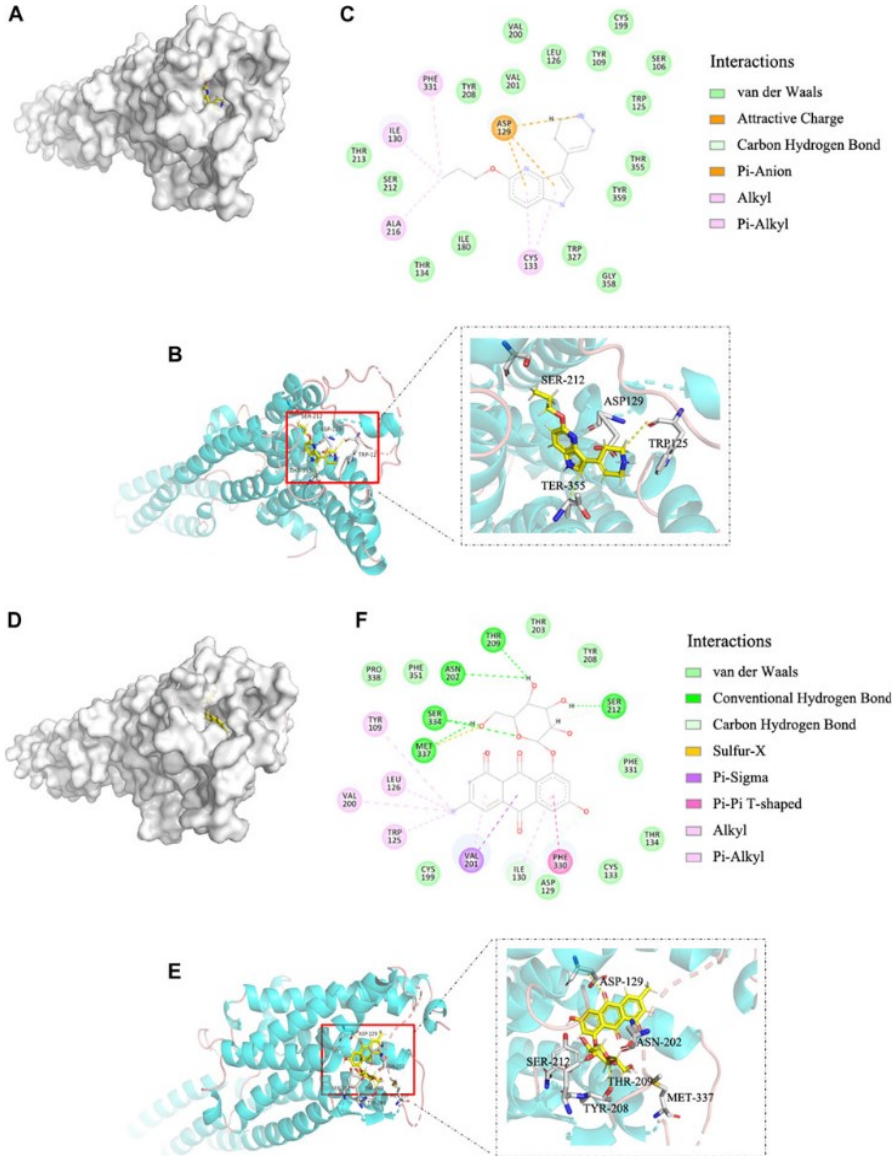
RISULTATI

Attraverso i saggi precedenti è stato possibile identificare EG e valutare le sue funzioni biologiche convalidando alcune proprietà fondamentali:

- **EG** prende di mira il recettore della serotonina 5-HT_{1B} e agisce in modo simile all'agonista CP-94253 come ligando di questo recettore; (B-C: CP-94253; F-E: EG)

- **EG** mostra un **effetto protettivo** simile alla diidroergotamina nei confronti **di 5-HT_{1B}** , nella digestione pronasica (DARTS);
- **EG** mostra un effetto di **stabilizzazione termodinamica** nei confronti di **5-HT_{1B}** (CETSA);

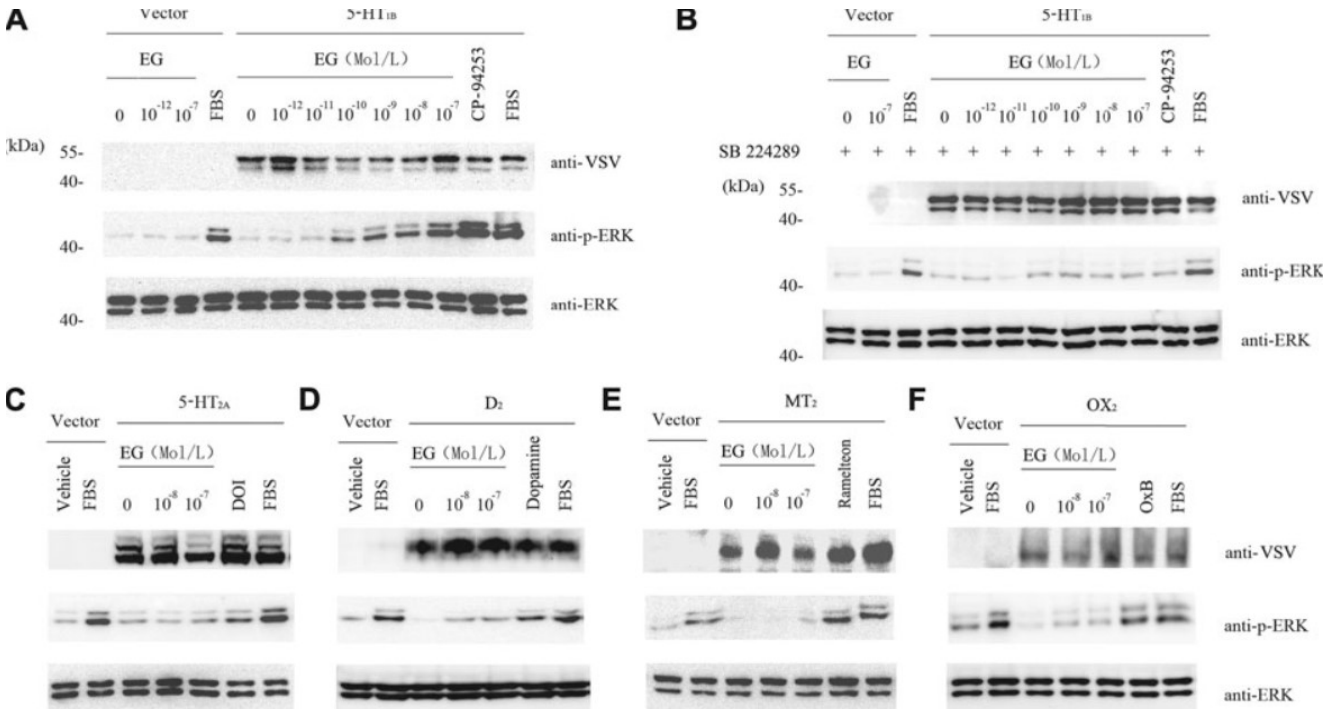


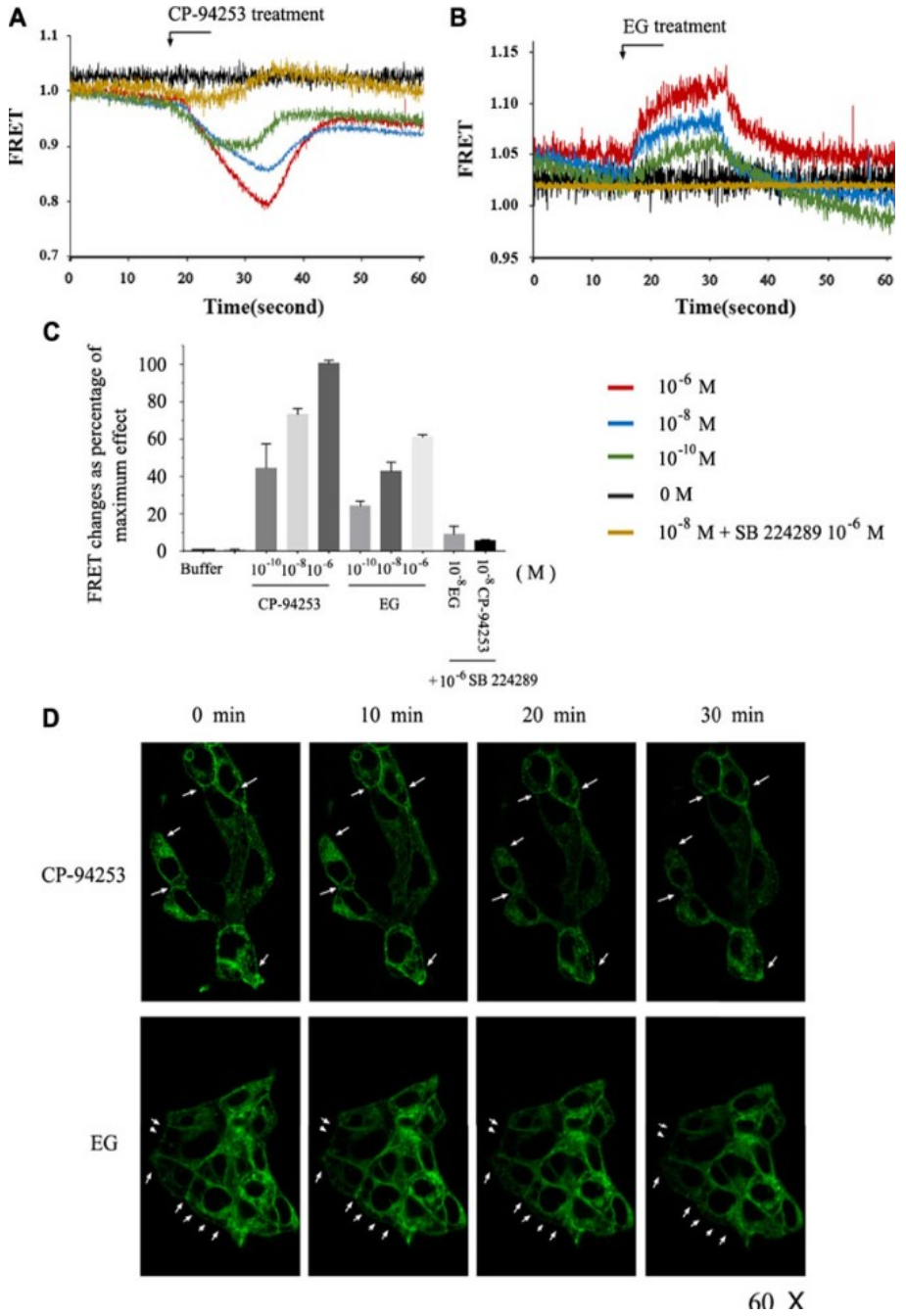


- Il **sensore 5-HT$_{1B}$ FRET** era funzionalmente simile e virtualmente identico al **recettore wild-type**;

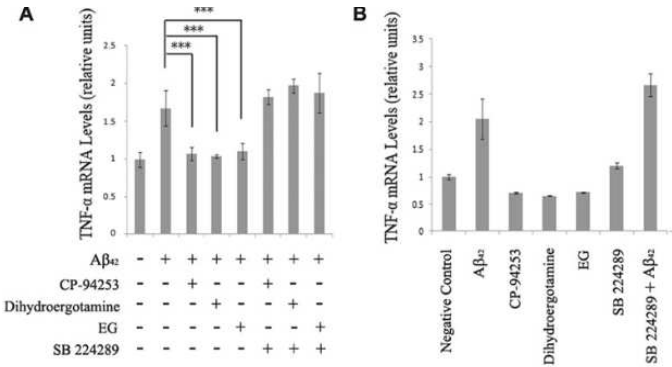
- **EG** è un **agonista** di **5-HT$_{1B}$**, come lo è CP-94253;

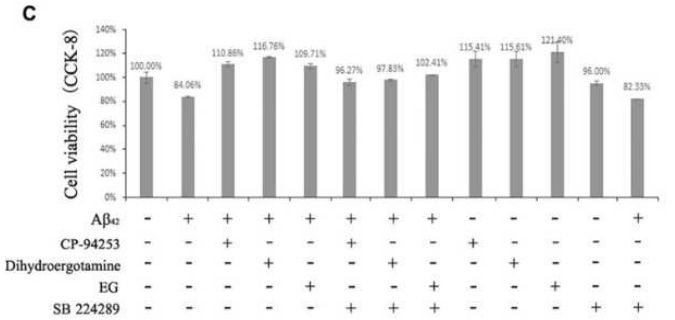
- **EG** esibiva attività **agonistica** verso **5-HT$_{1B}$** e poteva attivare selettivamente la via di segnalazione mediata da 5-HT$_{1B}$;

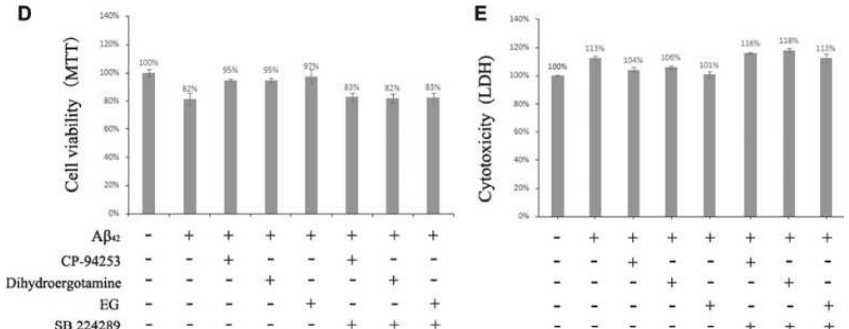


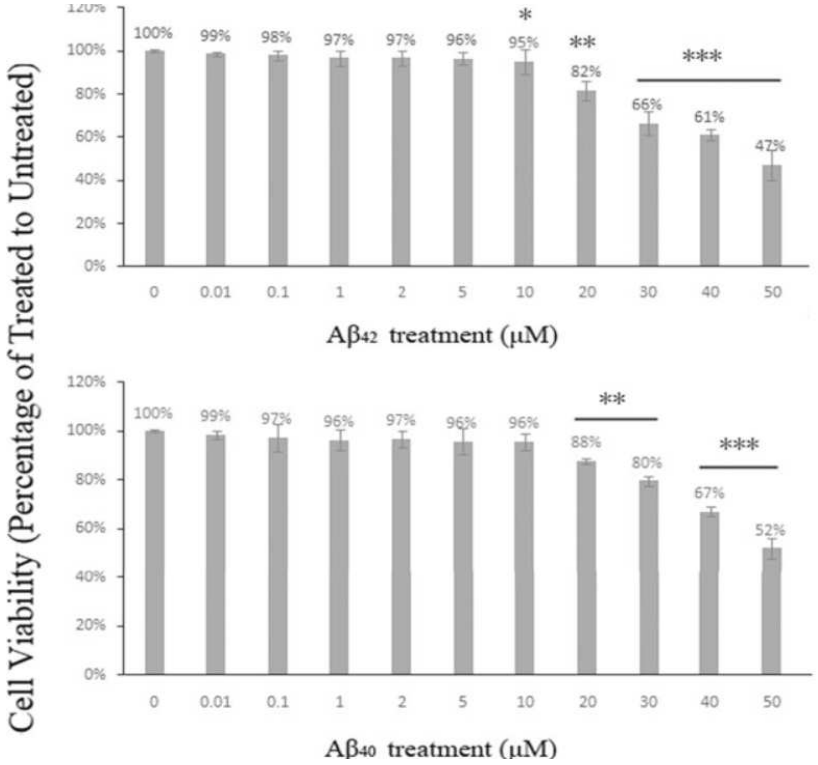


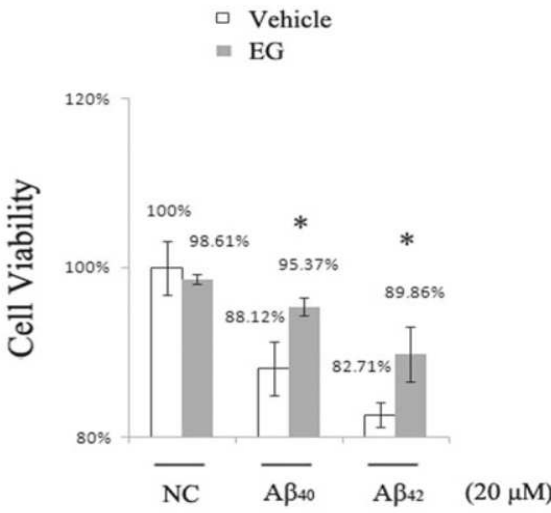
- **EG allevia** la **mortalità cellulare** o la <u>riduzione</u> della <u>vitalità cellulare</u> indotta da **$A\beta_{40}$** e **$A\beta_{42}$**; (CCK-8)





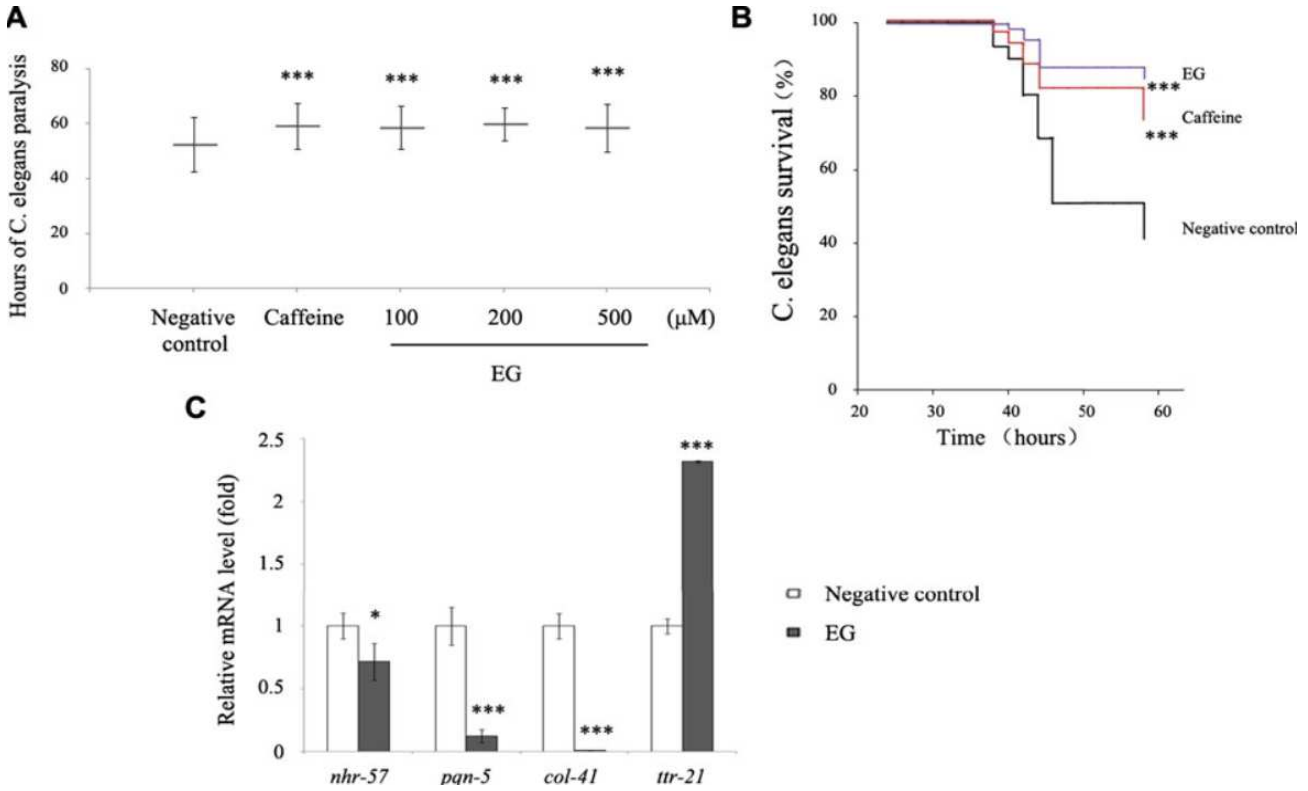






EG, attraverso la via $5\text{-}HT_{1B}$, **riduce** la **segnalazione <u>TNF-α pro-infiammatoria</u>** indotta da Aβ;
(CCK-8, MTT e LDH)

- **EG protegge C. Elegans** contro la **morbilità** nel <u>modello AD</u>;



CONCLUSIONE

Nel trattamento del morbo di Alzheimer, il recettore della serotonina **5-HT$_{1B}$** è considerato <u>**bersaglio terapeutico**</u> di **EG**, antidepressivo a base di erbe, suo <u>agonista</u> e di conseguenza <u>**agente terapeutico**</u>

REFERENZE

1. Unzeta, M., Esteban, G., Bolea, I., Fogel, W. A., Ramsay, R. R., Youdim, M. B., et al. (2016). Multi-Target Directed Donepezil-like Ligands for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 10, 205. doi:10.3389/fnins.2016.00205
2. Lourenco, M. V., Clarke, J. R., Frozza, R. L., Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Batista, A. F., et al. (2013). TNF-α Mediates PKR-dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's β-amyloid Oligomers in Mice and Monkeys. *Cell Metab* 18 (6), 831–843. doi:10.1016/j.cmet.2013.11.002
3. Lin, L., Ni, B., Lin, H., Zhang, M., Li, X., Yin, X., et al. (2015). Traditional Usages, Botany, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of Polygonum Multiflorum Thunb.: A Review. *J. Ethnopharmacol.* 159, 158–183. doi:10.1016/j.jep.2014.11.009
4. Lomenick, B., Hao, R., Jonai, N., Chin, R. M., Aghajan, M., Warburton, S., et al. (2009). Target Identification Using Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106 (51), 21984–21989. doi:10.1073/pnas.0910040106
5. Molina, D. M., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E. A., Dan, C., et al. (2013). Monitoring Drug Target Engagement in Cells and Tissues Using the Cellular Thermal Shift Assay. *Science* 341 (6141), 84–87. doi:10.1126/science.1233606
6. Lohse, M. J., Nikolaev, V. O., Hein, P., Hoffmann, C., Vilardaga, J. P., and Bünemann, M. (2008). Optical Techniques to Analyze Real-Time Activation and Signaling of G-Protein-Coupled Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (3), 159–165. doi:10.1016/j.tips.2007.12.002

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Goffredi Carlotta