



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

Corso di Laurea in
Scienze Biologiche

**Aggregati amiloidi e interazione con biomolecole rilevanti
nella neurodegenerazione**

**Interactions of amyloid aggregates with biomolecules
relevant to neurodegeneration**

Tesi di Laurea di
Flavia Dario

Docente Referente
Chiar.ma Prof.ssa
Maria Grazia Ortore

Sessione Estiva
Anno Accademico 2022/2023

Malattie neurodegenerative

- Caratterizzate da una progressiva degenerazione del sistema nervoso, con perdita di struttura e funzione neuronale.
- Causate dall'aggregazione di proteine amiloidogeniche, i cui oligomeri e fibrille provocano danno neuronale e degenerazione.
- Trattamenti mirati sull'assemblaggio degli oligomeri risultano complessi e impegnativi [1].
 - Equilibrio reversibile
 - Non-uniformità
 - Interazione biomolecole come cofattori

Disease	Protein deposits	Toxic protein	Disease genes	Risk factor
Alzheimer's disease	Extracellular plaques Intracellular tangles	A β tau	APP* Presenilin 1 \uparrow Presenilin 2 \uparrow	apoE4 allele
Parkinson's disease	Lewy bodies	α -Synuclein	α -Synuclein* Parkin \uparrow UCHL1 \uparrow	tau linkage
Prion disease	Prion plaque	PrP ^{Sc}	PRNP*	Homozygosity at prion codon 129
Polyglutamine disease	Nuclear and cytoplasmic inclusions	Polyglutamine-containing proteins	9 different genes with CAG repeat expansion*	
Tauopathy	Cytoplasmic tangles	tau	tau*	tau linkage
Familial amyotrophic lateral sclerosis	Bunina bodies	SOD1	SOD1*	

Fig. 1 - Tabella principali malattie neurodegenerative

("Toxic proteins in neurodegenerative diseases", Science)

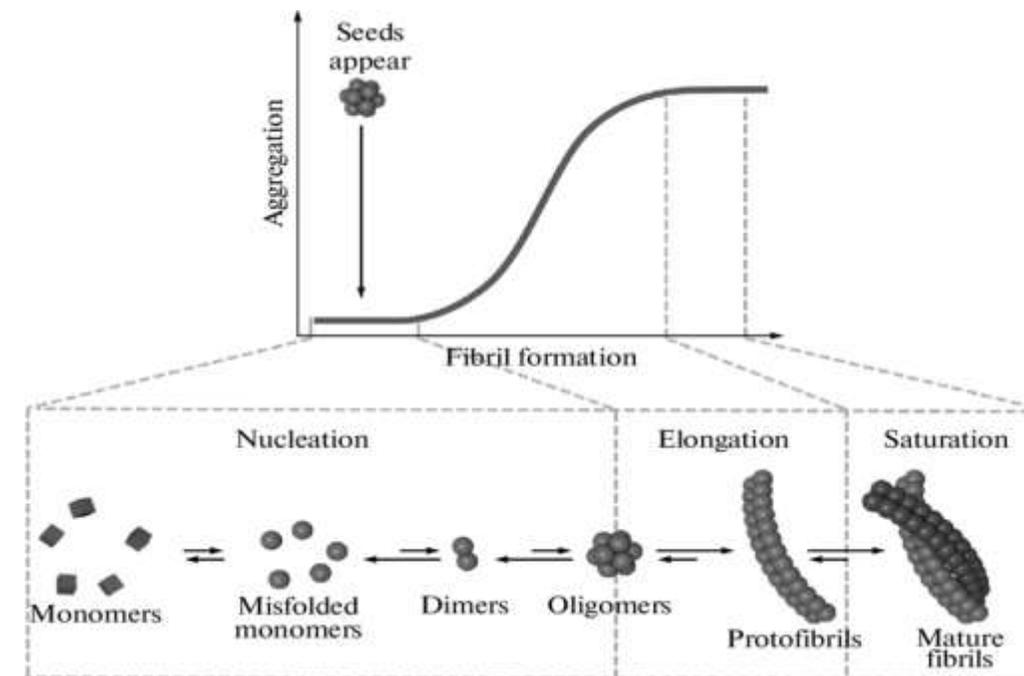


Fig. 2 - Processo di aggregazione amiloide

("Roles of zinc ions and structural polymorphism of β -amyloid in the development of Alzheimer's disease", Molecular Biology)

Proteine coinvolte nella neurodegenerazione

- **A β** (peptide β -amiloide): è il maggior costituente delle placche amiloidi e ha origine dalla proteina APP. Tagliata dalla β -secretasi, forma un frammento amiloidogenico di 42 aminoacidi. La produzione anomala di oligomeri di β -amiloide è alla base di molte malattie neurodegenerative [2].
- **A-Syn** (alfa-sinucleina): proteina espressa principalmente nel tessuto nervoso. Può formare aggregati proteici detti corpi di Lewy che causano malattie note come sinucleinopatie, quali la malattia di Parkinson e la demenza a corpi di Lewy [3].
- **Transtiretina (TTR)**: proteina di trasporto della tiroxina e del retinolo al fegato, presente nel plasma e nel liquido cerebrospinale. Il suo misfolding è associato a varie patologie amiloidi, localizzate soprattutto a livello del cuore e dei nervi periferici [4].

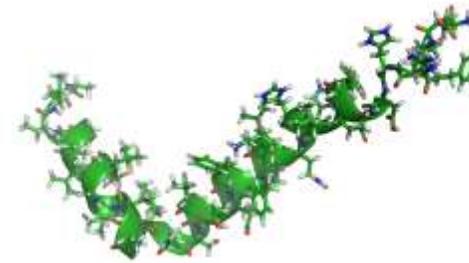


Fig. 3 – Struttura peptide betamiloide

(“Quantification of amyloid beta peptides in human cerebrospinal fluid”, ProLab)

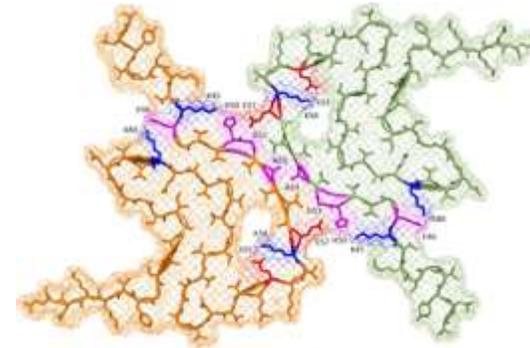


Fig. 4 – Struttura alfa-sinucleina

(“Alpha-synuclein structure and Parkinson’s disease – lessons and emerging principles”, BioMedCentral)

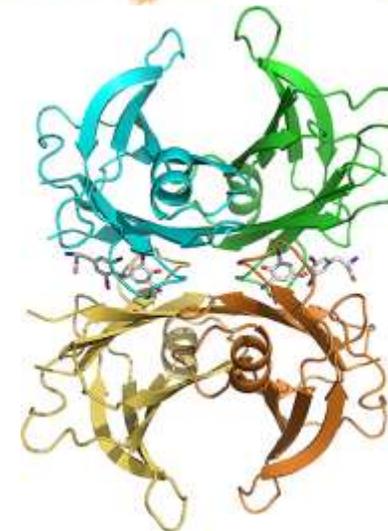


Fig. 5 – Struttura transtiretina

(“Modulation of the Mechanisms Driving Transthyretin Amyloidosis”, Frontiers)

Aggregazione amiloide

- **Cross-seeding:** processo in cui gli oligomeri composti da una proteina misfoldata promuovono la polimerizzazione di una proteina differente.
- Modello di aggregazione descritto da una polimerizzazione nucleazione-dipendente, divisa in due fasi:
 - Nucleation
 - Seeding extension

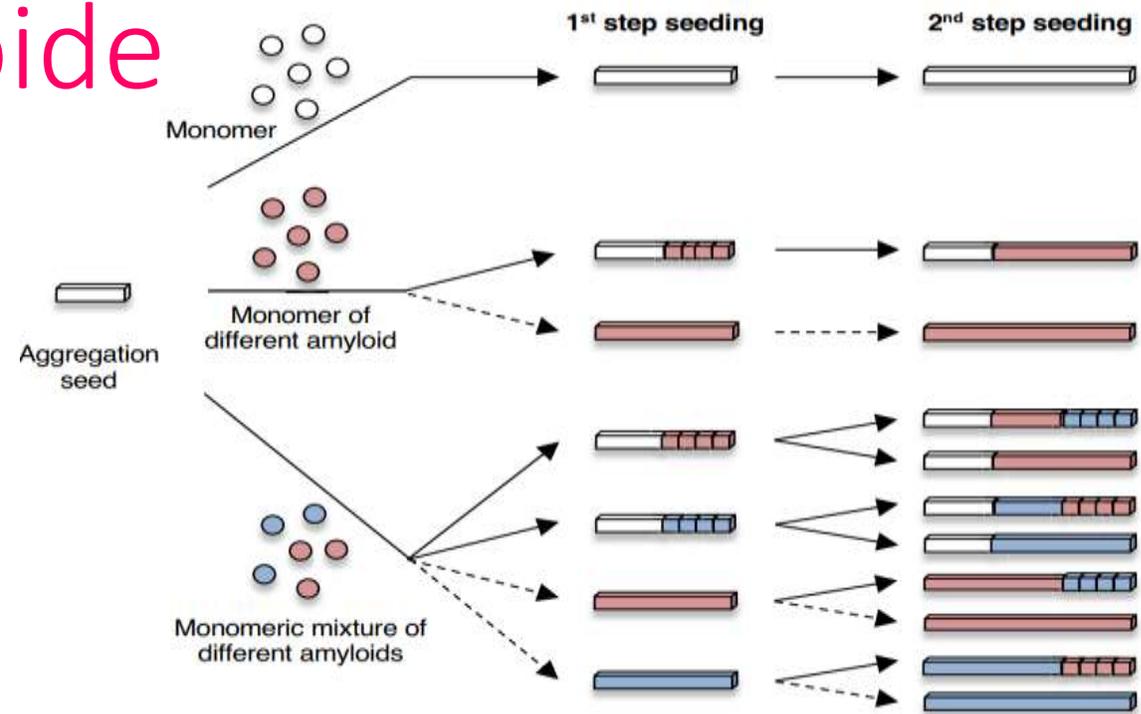


Fig. 6 - Schema modello di aggregazione cross-seeding

(“Interactions of amyloid coaggregates with biomolecules and its relevance to neurodegeneration”, FASEB Journal)

Questi meccanismi di aggregazione e l’interazione dei diversi aggregati potrebbero avere un ruolo chiave in potenziali strategie per la scoperta di farmaci mirati e per lo sviluppo di cure contro la neurodegenerazione [1].

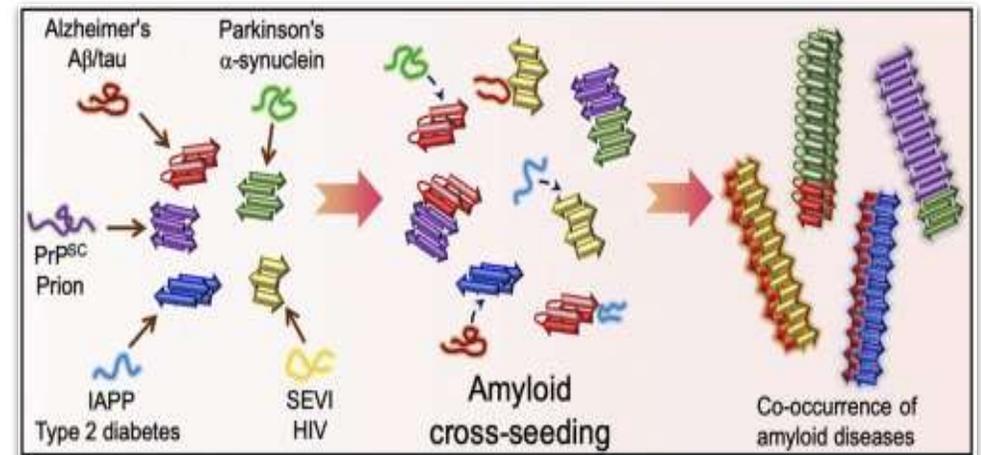


Fig. 7 - Esempi di aggregazione cross-seeding
 “Biophysical processes underlying cross-seeding in amyloid aggregation and implications in amyloid pathology”, Biophysical Chemistry

Principali co-aggregazioni tra proteine amiloidogeniche

- Aggregazione $A\beta$ con α Syn  Fibrille e oligomeri di $A\beta$ 40, $A\beta$ 42 e α Syn agiscono come nuclei di polimerizzazione e ognuno di essi influenza il pathway di aggregazione dell'altro [5].
- Aggregazione $A\beta$ con IAPP*  IAPP promuove l'oligomerizzazione di $A\beta$ 42 e la formazione di aggregati amiloidi di dimensioni maggiori, con livelli elevati di tossicità nelle cellule neuronali [6].
- Aggregazione α Syn con IAPP*  L'ottapeptide TKEQVTNV di α Syn può effettuare cross-seeding con i monomeri di IAPP, aumentando la vitalità cellulare e riducendo la citotossicità indotta dalla IAPP [7].
- Aggregazione TTR con $A\beta$  TTR inibisce la formazione di fibrille interferendo con la fase di nucleazione, con formazione di aggregati Th-T negativi non amiloidi [8].
- Aggregazione TTR con IAPP*  TTR è espressa nelle cellule β che producono IAPP: ritarda la fase lag e compromette la fase di elongazione durante il processo di aggregazione della IAPP [9].

***IAPP** (o amilina): ormone peptidico secreto dalle cellule β del pancreas insieme all'insulina. Il suo misfolding è alla base degli aggregati amiloidi caratteristici del diabete mellito di tipo 2 [10]

Saggio della Tioflavina T (Th-T)

Tioflavina T: molecola organica appartenente alla famiglia delle tioflavine, ampiamente utilizzate come coloranti istologici e negli studi biofisici di aggregazione proteica.

È in grado di legare selettivamente aggregati amiloidi, dando luogo ad un aumento dell'intensità di fluorescenza e ad uno spostamento del massimo di emissione a lunghezze d'onda maggiori (*red shift*). La molecola di ThT, infatti, assorbe a 385 nm ed emette fluorescenza a 445 nm, mentre il complesso ThT-amiloide assorbe a 450 nm ed emette a 482 nm.

L'aumento dell'intensità di fluorescenza della ThT dipende dalla struttura dello stato aggregato delle proteine amiloidi e non dipende dalle caratteristiche di fluorescenza della proteina, quindi con il saggio di fluorescenza con ThT è possibile determinare la presenza di aggregati proteici ed ottenere delucidazioni riguardanti la cinetica del processo di formazione delle fibrille ed i fattori che la influenzano [11].

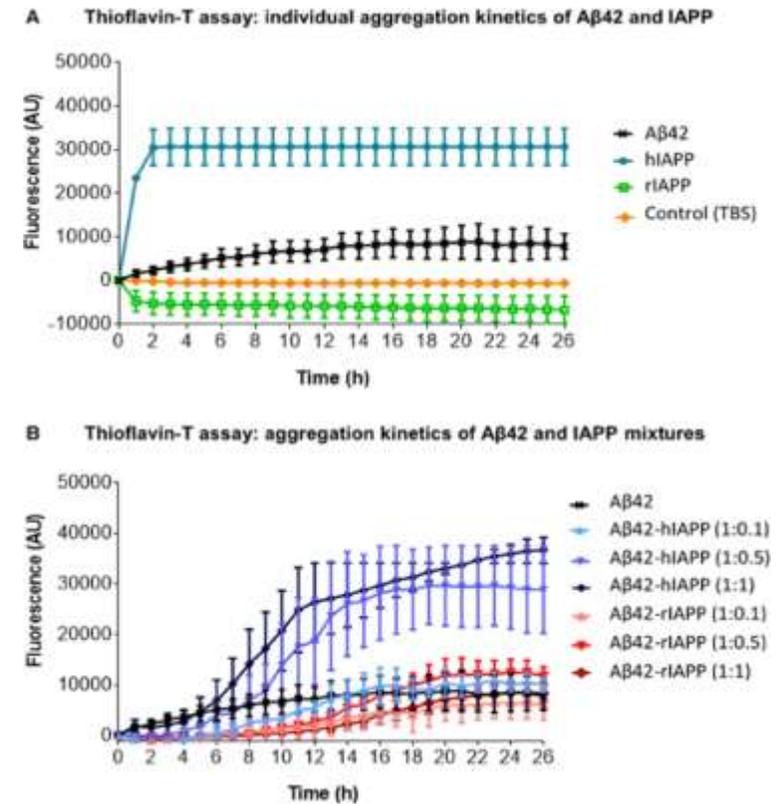


Fig. 9 – Cinetica di aggregazione di miscele di Aβ42-IAPP

(“Amylin and beta amyloid proteins interact to form amorphous heterocomplexes with enhanced toxicity in neuronal cells”, *Scientific Reports*)

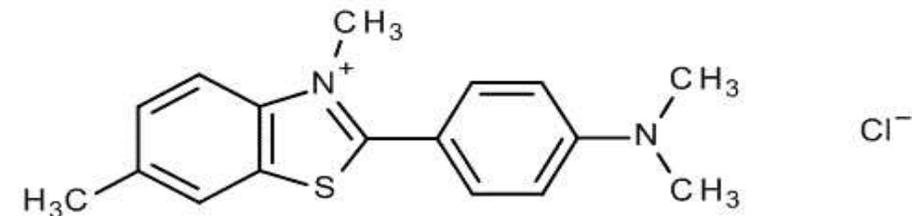


Fig. 8 – Tioflavina T

(“Thioflavin T”, *Fisher Scientific*)

Co-aggregazione delle proteine amiloidogeniche con gli acidi nucleici

Prioni: molecole di natura proteica con la capacità di trasmettere la propria forma mal ripiegata a varianti normali della stessa proteina. I prioni possono formarsi in tutti gli organi dove è presente la proteina PrP, ma causano danni soprattutto al cervello. La forma normale è chiamata PrPc, mentre quella infettiva è detta PrPsc (*scrapie*) [12].

Coaggregazione dei prioni con l'RNA  La formazione di G-quadruplex nell'mRNA della PrPc è stata considerata l'anello mancante nella conversione iniziale della PrPc in PrPsc, suggerendo che i leganti o gli inibitori del G-quadruplex potrebbero essere terapeutici per le malattie prionoidi [13].

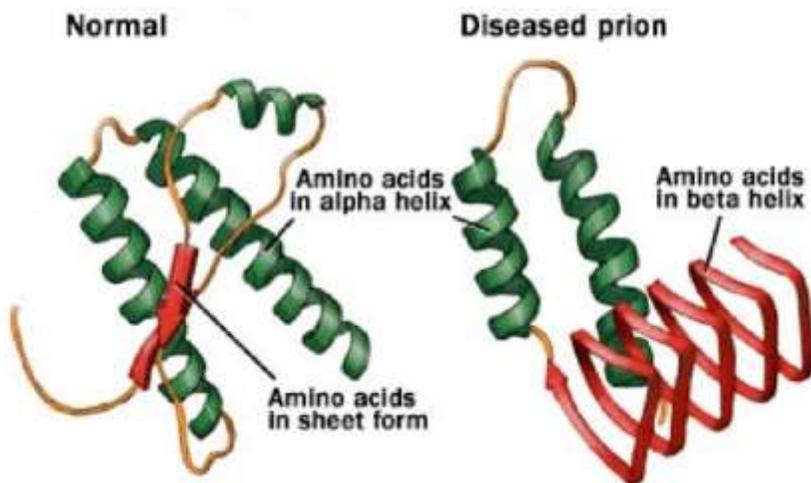
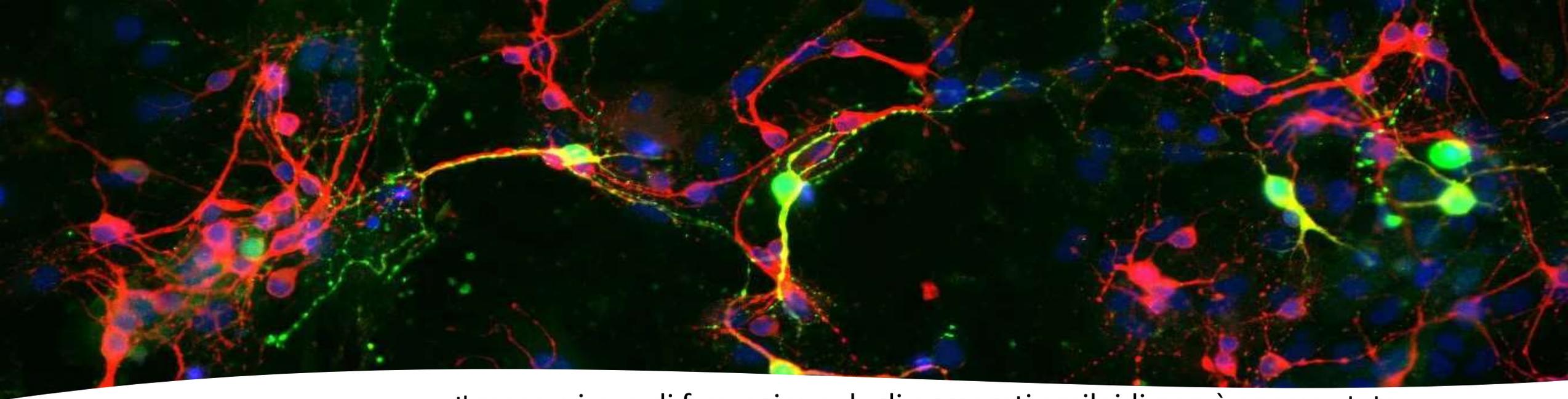


Fig. 10 – Proteina prionica nella forma normale e in quella infettiva

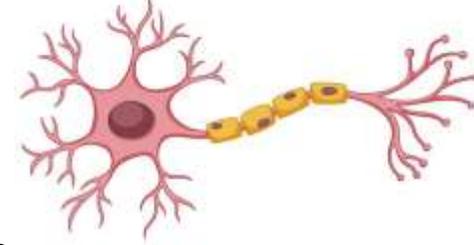
(“ Polymorphism in the PrPC Prion Protein Gene In Pigs “, FHSU Scholars Repository



- Il meccanismo di formazione degli aggregati amiloidi non è ancora stato chiarito per la maggior parte delle proteine ed è necessaria una comprensione più approfondita per facilitare la progettazione e la scoperta di farmaci anti-amiloidi.
- Comprendere il meccanismo molecolare alla base delle interazioni nel cross-seeding aiuterà ricercatori a sviluppare terapie efficaci per le malattie da misfolding proteico.
- La funzione antagonista dei farmaci che hanno come bersaglio gli acidi nucleici, che possono partecipare alla formazione dei coaggregati amiloidi, è una strada promettente per la terapia della neurodegenerazione.

Conclusioni e prospettive

Riassunto



L'aggregazione di proteine amiloidogeniche è un segno distintivo patologico di varie malattie neurodegenerative, tra cui il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica. In queste malattie intermedi oligomerici o aggregati tossici di amiloidi causano danni e degenerazione neuronale. Nonostante i notevoli sforzi compiuti negli ultimi decenni per sviluppare interventi terapeutici, queste malattie neurodegenerative non sono ancora comprese a livello molecolare. In molti casi più amiloidi che causano la malattia si sovrappongono in un'unica caratteristica patologica o in un'unica amiloide che causa la malattia, rappresentando più caratteristiche patologiche. Diverse patologie amiloidi possono coesistere nello stesso cervello con o senza manifestazione clinica e possono anche verificarsi in individui senza malattia. Sulla base di dati scarsi, sono sorte speculazioni sulla coaggregazione dell'amiloide con diverse specie amiloidi e altre biomolecole, che sono le stesse caratteristiche che rendono difficile la diagnostica e lo sviluppo di farmaci. Tuttavia, i progressi della ricerca sui condensati biomolecolari e l'analisi strutturale sono stati utilizzati per superare alcune di queste sfide. Considerando lo sviluppo di queste risorse e tecniche, in questa review esaminiamo il cross-seeding dell'amiloidosi, che coinvolge, ad esempio, l'amiloide β , la tau, l' α -sinucleina e il polipeptide amiloide dell'isoletta umana (IAPP) e la loro inibizione incrociata da parte della transtiretina e del BRICHOS. Viene inoltre descritta l'interazione delle proteine che legano gli acidi nucleici (come i prioni, la TAR DNA-binding protein 43, la proteina fusa nel sarcoma/tradotta nel liposarcoma, e la poliglicina del ritardo mentale dell'X fragile) con gli acidi nucleici nella patologia della neurodegenerazione, evidenziando così le potenziali applicazioni cliniche nella terapia del sistema nervoso centrale.

Bibliografia

- Fonte [1]: Interactions of amyloid coaggregates with biomolecules and its relevance to neurodegeneration (<https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fj.202200235R>)
- Fonte [2]: <https://www.nature.com/articles/aps201728>
- Fonte [3]: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/alpha-synuclein>
- Fonte [4]: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/transthyretin>
- Fonte [5]: Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1>)
- Fonte [6]: Amylin and beta amyloid proteins interact to form amorphous heterocomplexes with enhanced toxicity in neuronal cells (<https://www.nature.com/articles/s41598-020-66602-9>)
- Fonte [7]: A new strategy to reconcile amyloid cross-seeding and amyloid prevention in a binary system of α -synuclein fragmental peptide and hIAPP (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pro.4247>)
- Fonte [8]: Transthyretin Interferes with A β Amyloid Formation by Redirecting Oligomeric Nuclei into Non-Amyloid Aggregates (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283618305813?via%3Dihub>)
- Fonte [9]: Mechanisms of Transthyretin Inhibition of IAPP Amyloid Formation (<https://www.mdpi.com/2218-273X/11/3/411>)
- Fonte [10]: <https://www.sinobiological.com/resource/iapp-amylin/proteins>
- Fonte [11]: Thioflavin T fluorescence assay (https://www.youtube.com/watch?v=8wDdNV2D7gc&ab_channel=BMHlearning)
- Fonte [12]: Malattie da prioni (<https://www.marionegri.it/magazine/malattie-da-prioni>)
- Fonte [13]: G-quadruplexes within prion mRNA: the missing link in prion disease? (<https://academic.oup.com/nar/article/42/14/9327/1270860?login=false>)