



**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

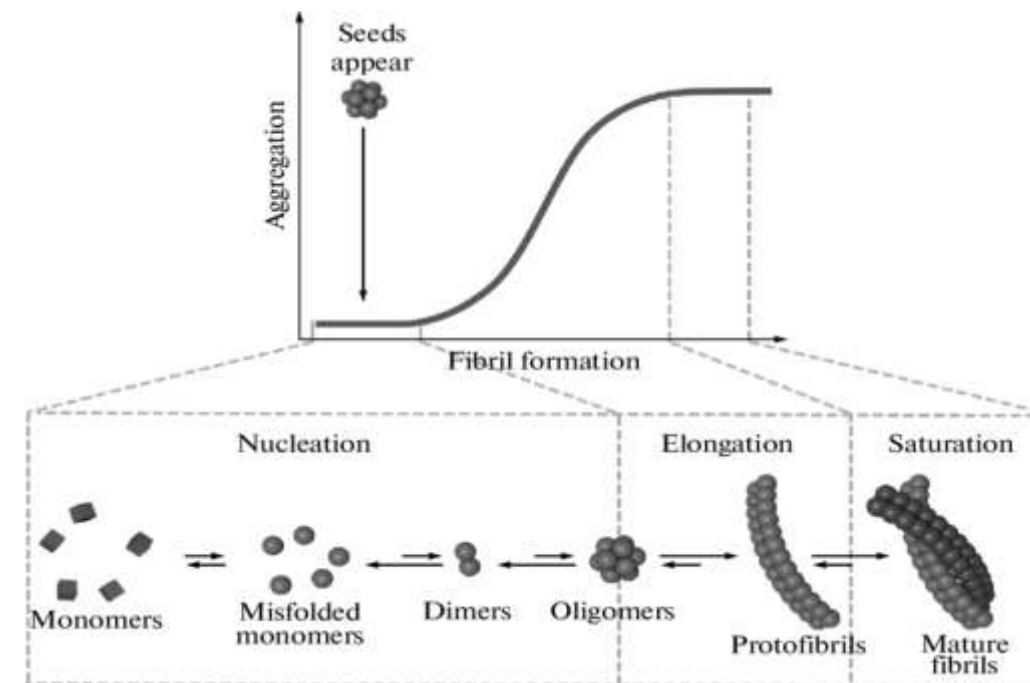
# Malattie neurodegenerative

- 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 $\beta$ tau	APP* Presenilin 1 $\uparrow$ Presenilin 2 $\uparrow$	apoE4 allele
Parkinson's disease	Lewy bodies	$\alpha$ -Synuclein	$\alpha$ -Synuclein* Parkin $\uparrow$ UCHL1 $\uparrow$	tau linkage
Prion disease	Prion plaque	PrP <sup>Sc</sup>	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)*

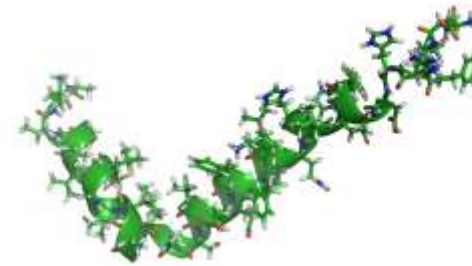


**Fig. 2 - Processo di aggregazione amiloide**

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

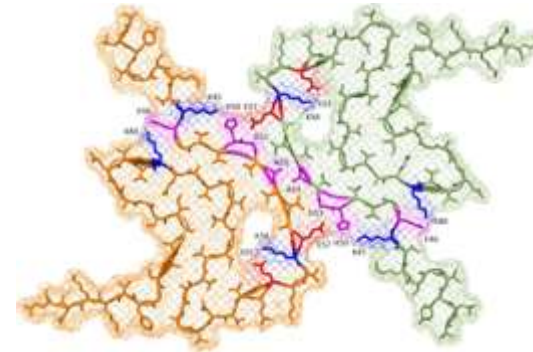
# Proteine coinvolte nella neurodegenerazione

- **A $\beta$**  (peptide  $\beta$ -amiloide): è il maggior costituente delle placche amiloidi e ha origine dalla proteina APP. Tagliata dalla  $\beta$ -secretasi, forma un frammento amiloidogenico di 42 aminoacidi. La produzione anomala di oligomeri di  $\beta$ -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].



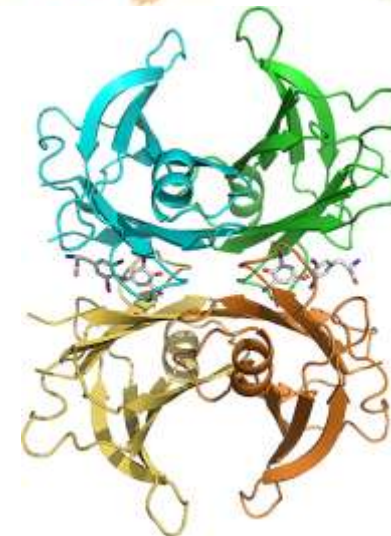
*Fig. 3 – Struttura peptide betamiloide*

*(“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

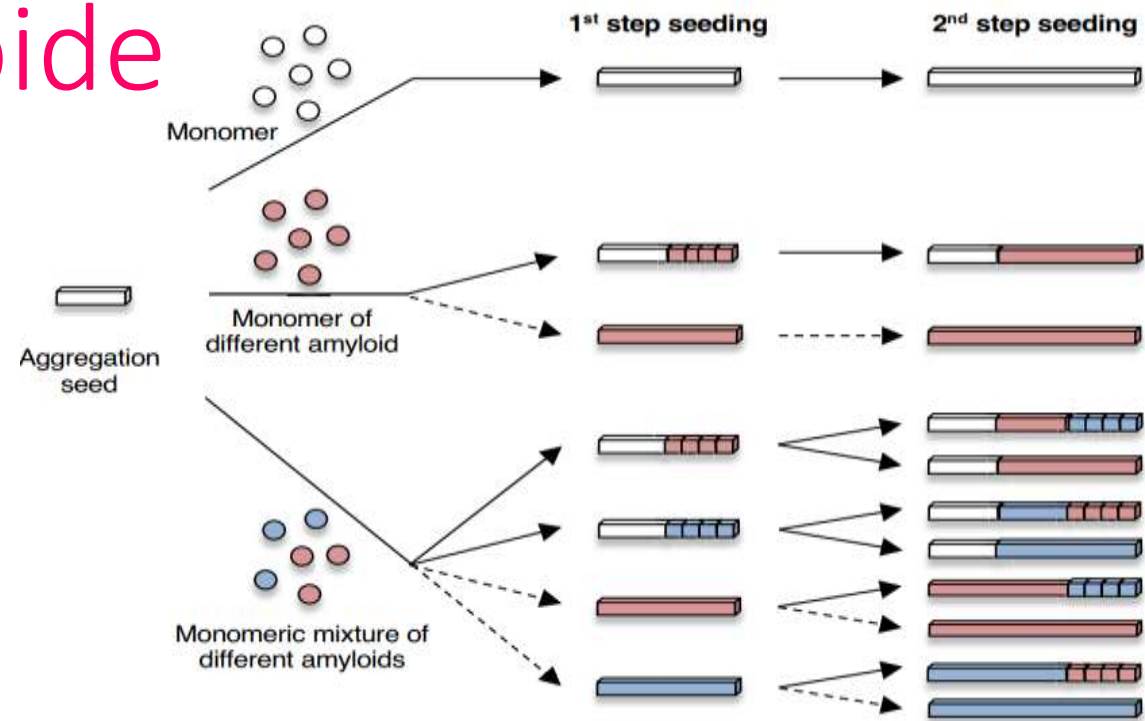


Fig. 6 - Schema modello di aggregazione cross-seeding

("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].

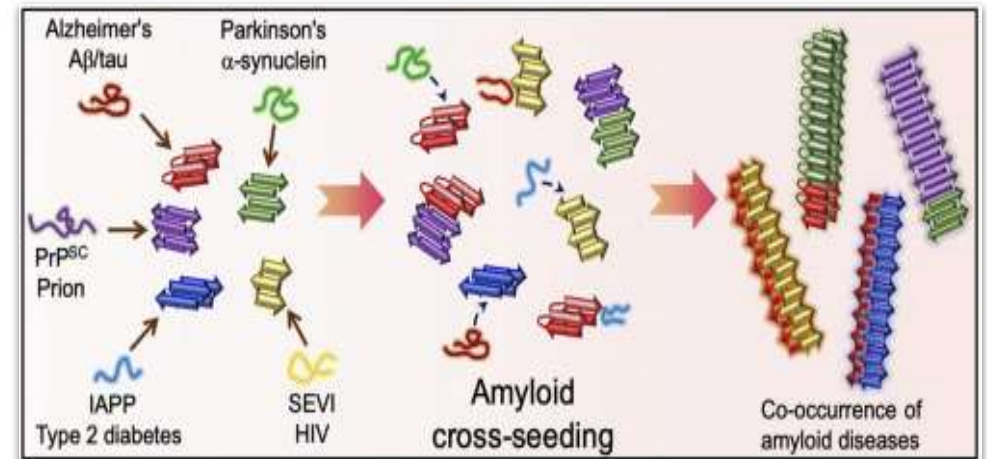







Fig. 7 - Esempi di aggregazione cross-seeding

"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  $\alpha$ Syn  Fibrille e oligomeri di A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e  $\alpha$ 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  $\alpha$ Syn con IAPP\*  L'ottapeptide TKEQVTNV di  $\alpha$ 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  $\beta$  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  $\beta$  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].

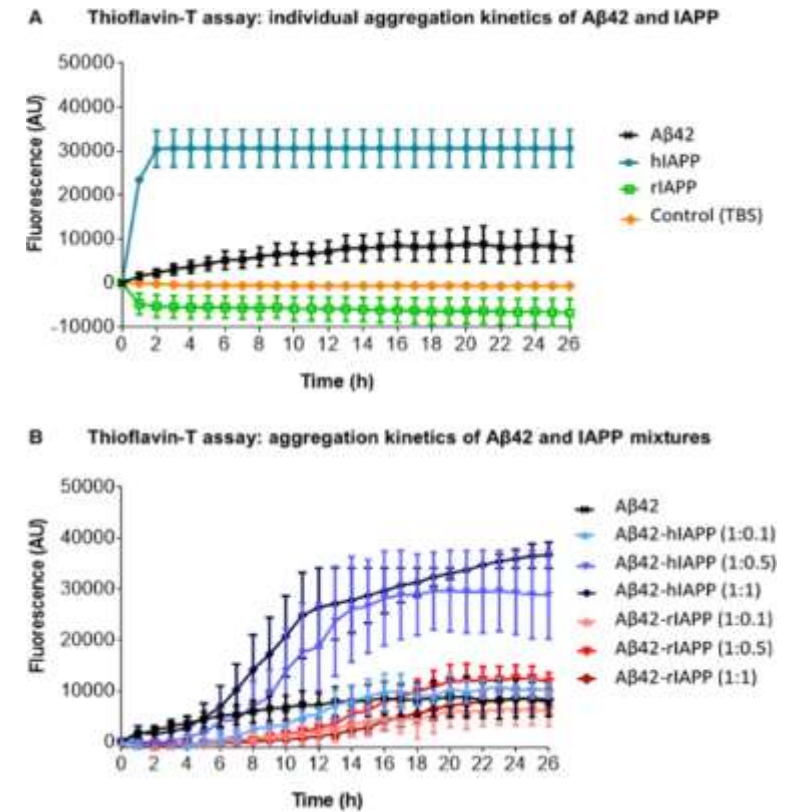


Fig. 9 – Cinetica di aggregazione di miscele di Aβ42-IAPP

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

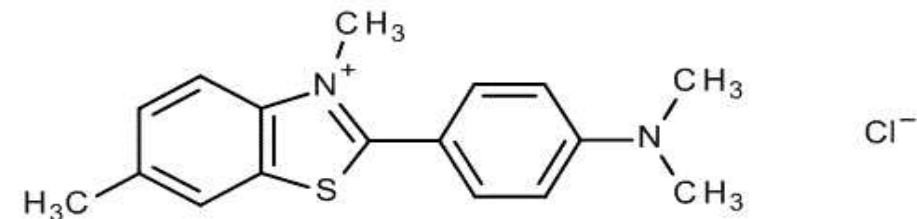



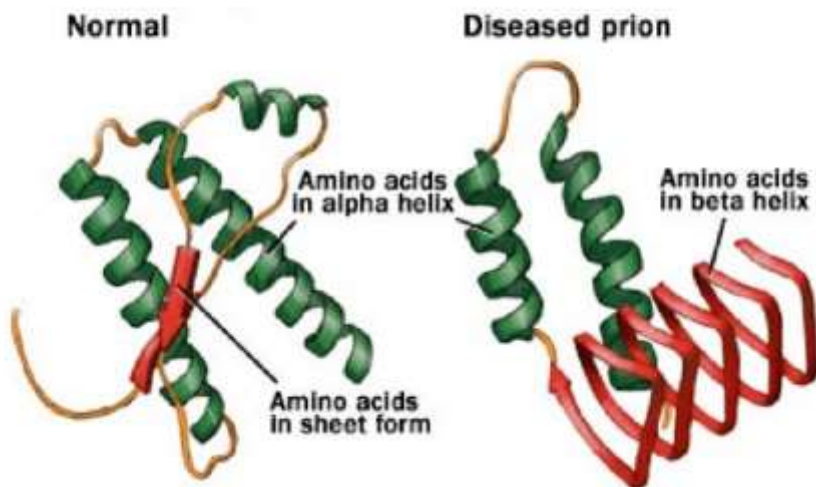
Fig. 8 – Tioflavina T

(“Thioflavin T”, *Fisher Scientific*)

# Co-aggregazione delle proteine amiloidogeniche con gli acidi nucleici

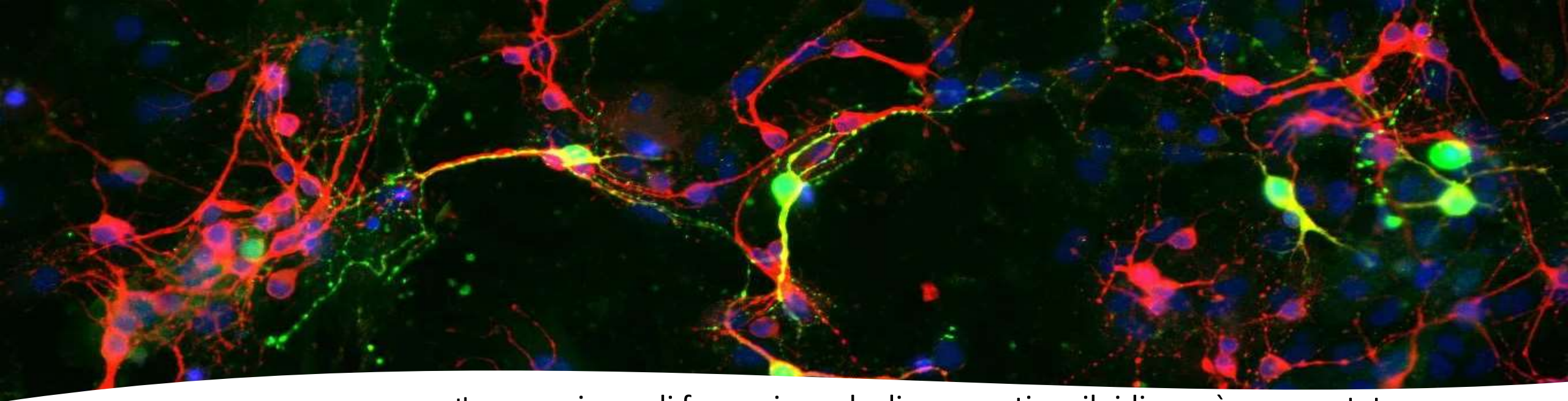
**Prioni:** molecole di natura proteica con la capacità di trasmettere la propria forma mal ripiegata a varianti normali della stessa proteina. I prioni possono formarsi in tutti gli organi dove è presente la proteina PrP, ma causano danni soprattutto al cervello. La forma normale è chiamata PrP<sup>c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

Coaggregazione dei prioni con l'RNA  La formazione di G-quadruplex nell'mRNA della PrP<sup>c</sup> è stata considerata l'anello mancante nella conversione iniziale della PrP<sup>c</sup> in PrP<sup>sc</sup>, 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*

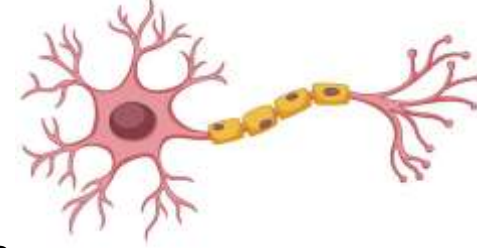


- Il meccanismo di formazione degli aggregati amiloidi non è ancora stato chiarito per la maggior parte delle proteine ed è necessaria una comprensione più approfondita per facilitare la progettazione e la scoperta di farmaci anti-amiloidi.
- Comprendere il meccanismo molecolare alla base delle interazioni 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  $\beta$ , la tau, l' $\alpha$ -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  $\beta$ -protein and  $\alpha$ -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  $\alpha$ -synuclein fragmental peptide and hIAPP (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pro.4247>)
- Fonte [8]: Transthyretin Interferes with A $\beta$  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](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>)