



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

MISFOLDED PROTEIN OLIGOMERS: MECHANISMS OF FORMATION, CYTOTOXIC EFFECTS,
AND PHARMACOLOGICAL APPROACHES AGAINST PROTEIN MISFOLDING DISEASES.

OLIGOMERI PROTEICI MAL RIPIEGATI: MECCANISMI DI FORMAZIONE, EFFETTI CITOTOSSICI E APPROCCI
FARMACOLOGICI CONTRO LE MALATTIE DA MISFOLDING PROTEICO.

Tesi di Laurea di:
Paradisi Lisa

Docente Referente:
Ortore Maria Grazia

Sessione estiva (luglio)
Anno Accademico 2023/2024

INTRODUZIONE

Table 1 Non-exhaustive list of protein misfolding diseases with their associated peptides or proteins, and in vitro and ex vivo structures of corresponding amyloid fibrils. Putative mechanisms of aggregation and toxicity are also indicated

Disease	Proteins	Length	Prospective most toxic species	Dominant aggregation mechanism	In vitro amyloid structure	Ex vivo amyloid structure
Alzheimer's disease (AD)	Amyloid- β (A β) Tau (3R+4R)	40 or 42 352-441	A β : Oligomers [3, 16, 17] Tau: Oligomers [18-20]	Secondary nucleation [21, 22] Secondary nucleation [23]	A β_{40} [24] A β_{42} [25] Tau [26]	A β_{40} [27, 28] A β_{42} [5] Tau [29, 30]
Parkinson's disease (PD)	α -synuclein	140	Oligomers [31-33]	Condition-dependent [34], including lipid-induced aggregation [35]	[36-39]	[40-42]
Dementia with Lewy Bodies (DLB)	α -synuclein	140	Pre-synaptic aggregates [43] & oligomers [44, 45]	Not yet known, secondary pathways [46]	-	[40, 47]

➤ È noto da tempo che le proteine possono subire *misfolding* ed assemblarsi in fibrille amiloidi le quali sono alla base di molte malattie neurodegenerative come l'Alzheimer e il morbo di Parkinson. Tuttavia prove crescenti hanno dimostrato che gli aggregati proteici solubili più piccoli, intermedi e metastabili noti come oligomeri proteici mal ripiegati risultano essere più dannosi.

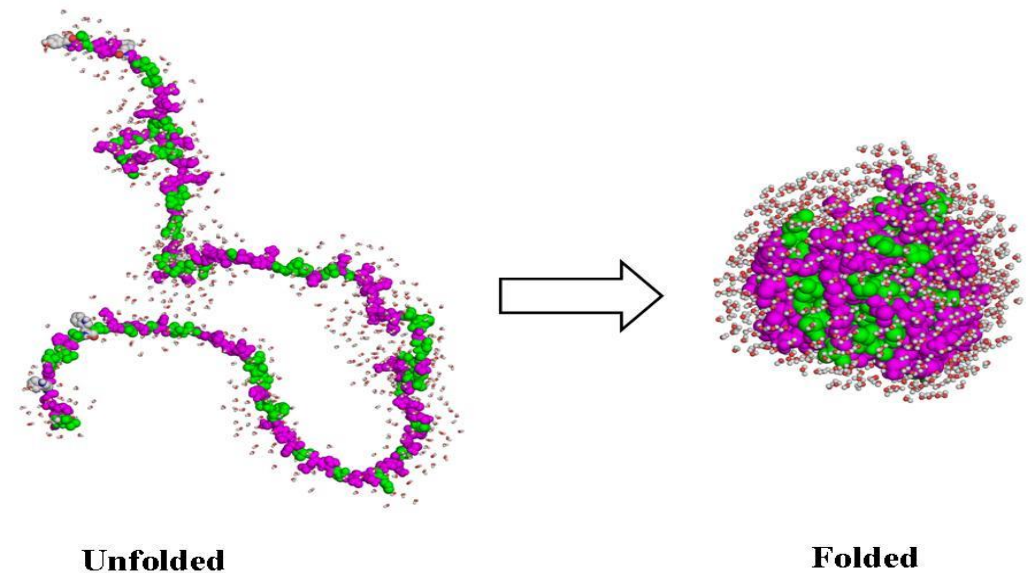
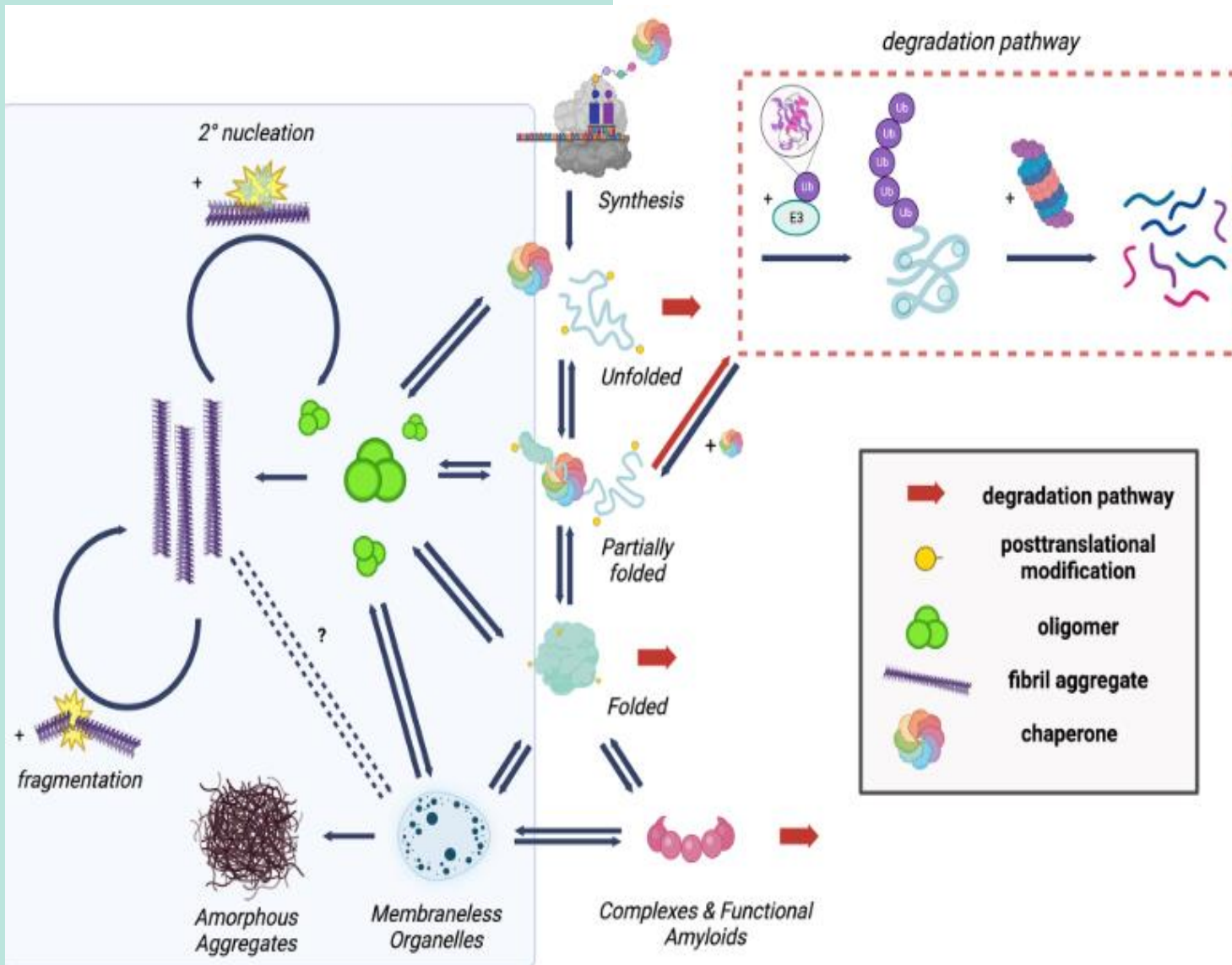


Fig. 2 - Ripiegamento proteico: dalla struttura primaria a quella terziaria

STRUTTURA E MECCANISMI DI FORMAZIONE DEGLI OLIGOMERI PROTEICI



- Le proteine, una volta che sono state sintetizzate possono assumere il loro stato nativo oppure, attraverso stadi intermedi, possono essere convertite nella loro forma amiloide. In questo caso le proteine monomeriche vengono trasformate in oligomeri e poi in strutture fibrillari a foglietto β incrociato con filamenti β paralleli e antiparalleli.

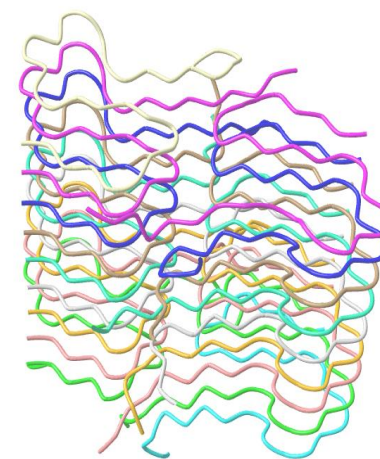
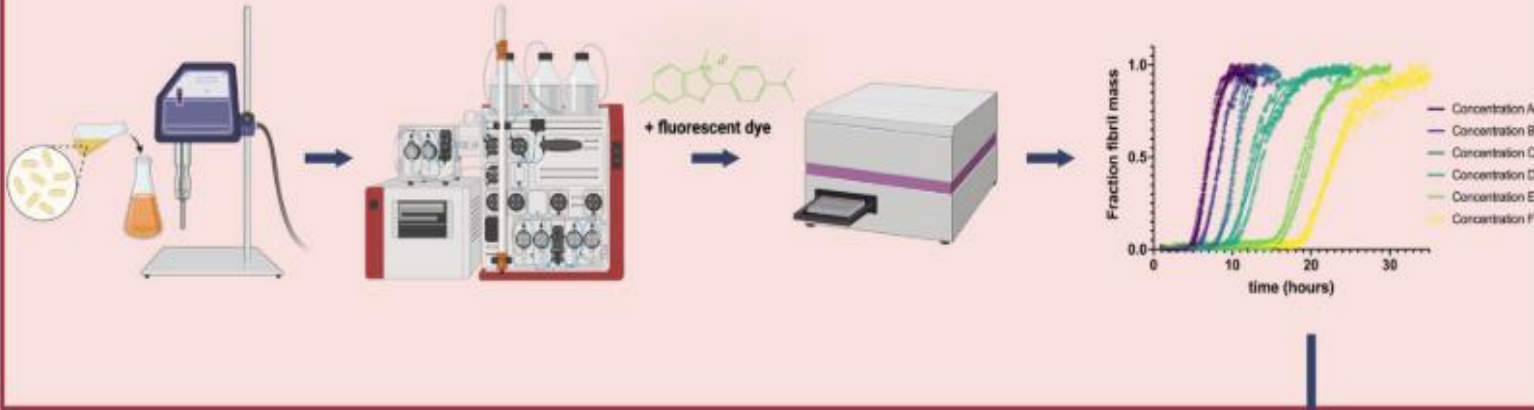


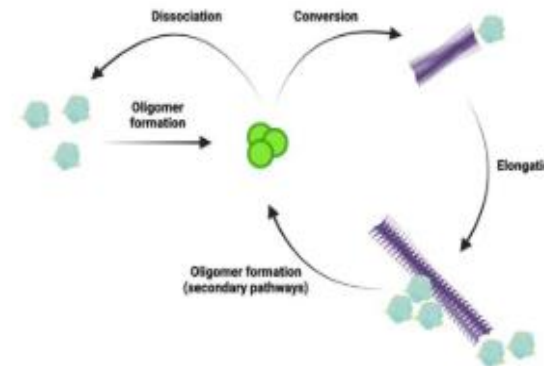
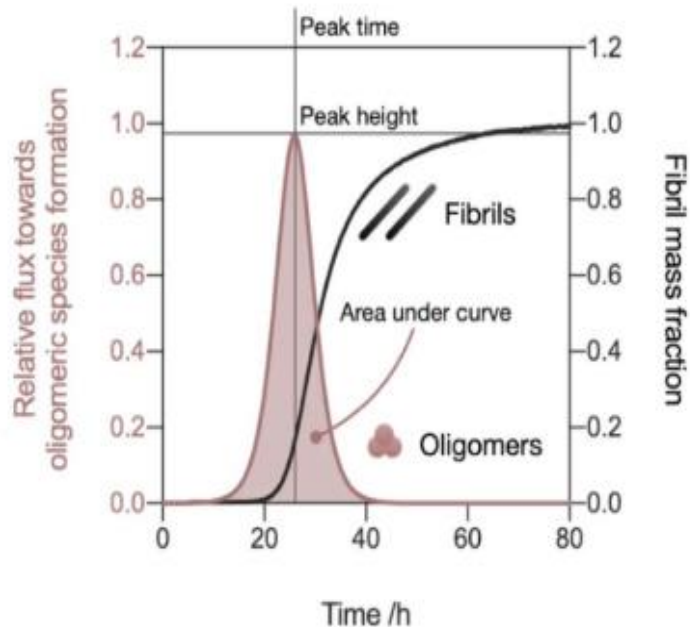
Fig. 2 - Struttura di risoluzione atomica delle fibrille amiloidi monomorfe AB42.

MECCANISMI CINETICI DI FORMAZIONE DELLE FIBRILLE PER RILEVARE NUCLEI OLIGOMERICI

MACROSCOPIC MEASUREMENTS



MICROSCOPIC MECHANISMS



$$\frac{dP}{dt} = k_{\text{conv}} m(t)^{n_{\text{conv}}} S(t) + k_{-} M(t),$$

$$\frac{dM}{dt} = 2k_{+} m(t) P(t)$$

$$m(t) + M(t) = m_{\text{tot}}$$

$$\frac{dS}{dt} = k_{o1} m(t)^{n_{o1}} + k_{o2} m(t)^{n_{o2}} M(t) - (k_{\text{conv}} m(t)^{n_{\text{conv}}} + k_{d1} + k_{d2} M(t)) S(t),$$

➤ L'analisi cinetica quantitativa della formazione delle fibrille amiloidi ci consente di ottenere informazioni circa il meccanismo di formazione degli oligomeri proteici mal ripiegati.

➤ Per collegare le osservazioni macroscopiche ai meccanismi microscopici si fa riferimento alla cinetica chimica dove i passaggi alla base del processo di aggregazione vengono classificati in:

- Allungamento delle fibrille e dissociazione dei monomeri che sono processi che influenzano la massa aggregata.
- Nucleazione primaria, secondaria e frammentazione delle fibrille che contribuiscono al numero totale di aggregati.

DINAMICA DEGLI OLIGOMERI

➤ FASI MICROSCOPICHE

L'evoluzione delle specie oligomeriche può essere suddivisa in una serie di fasi microscopiche quali:

- L'associazione e la dissociazione degli oligomeri
- Conversione degli oligomeri in oligomeri competenti per l'allungamento delle fibrille
- Allungamento degli oligomeri fibrillari in fibrille.

Generalmente gli oligomeri non fibrillari possono formarsi attraverso la nucleazione primaria. Le specie fibrillari compatibili con l'allungamento si formano tramite nucleazione secondaria ma a causa della reversibilità di quest'ultima gli oligomeri possono dissociarsi in monomeri.

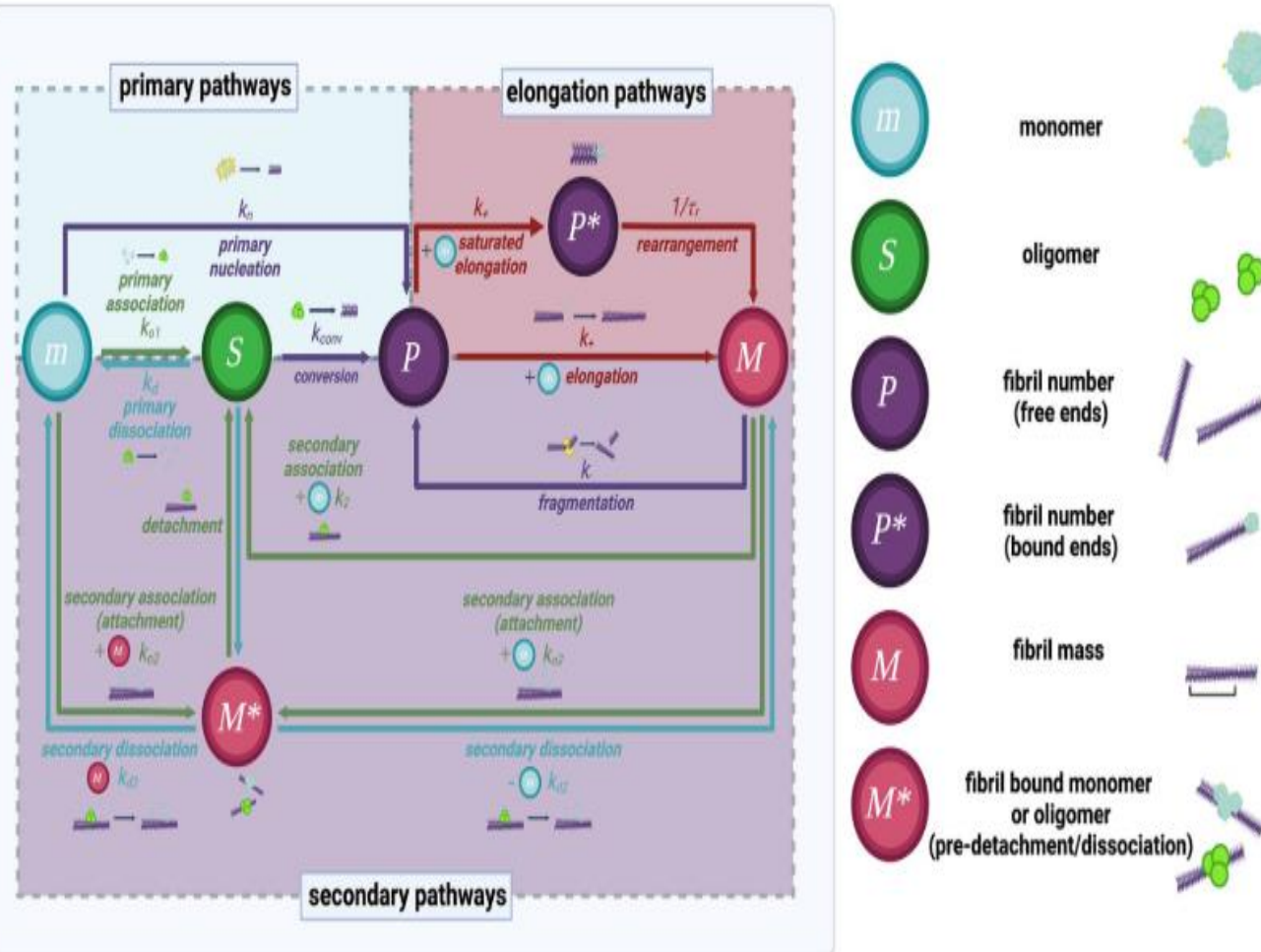
➤ PARAMETRI DINAMICA DEGLI OLIGOMERI

La dinamica della popolazione degli oligomeri per un dato sistema amiloide può essere descritta attraverso quattro parametri principali:

- Persistenza
- Produttività cinetica
- Abbondanza
- Tempo di picco

➤ SEPARAZIONE DI FASE

Un percorso alternativo all'aggregazione amiloide è quello relativo alla formazione di condensati proteici secondo cui le proteine formano una fase condensata simile ad un liquido in quanto le interazioni proteina-proteina diventano più favorevoli.



METODI DI RILEVAMENTO DEGLI OLIGOMERI

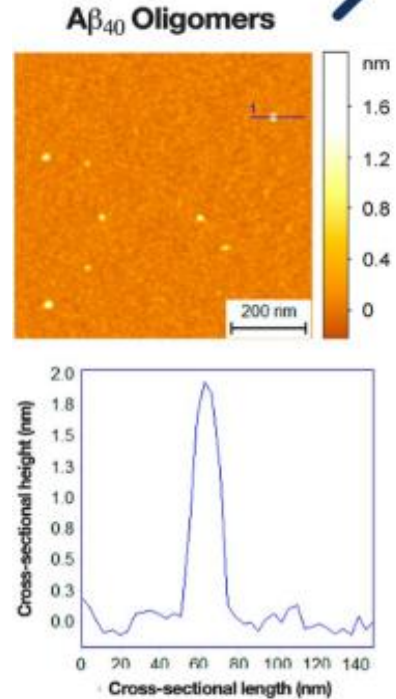
La difficoltà nell'isolare gli oligomeri dipende dalla loro piccola dimensione, idrofobicità, bassa stabilità e basse concentrazioni, natura transitoria e ampia eterogeneità strutturale. Per facilitarne la loro indagine in vitro si compiono:

- Dosaggi immunologici in cui è previsto l'uso di anticorpi specifici per conformazione o sequenza che catturano gli oligomeri presenti in soluzione. Tra questi viene in particolar modo ricordato l'anticorpo policlonale A11.
- Studi su animali transgenici. L'iniezione di oligomeri tossici mal ripiegati nel cervello dei topi ha causato infatti la perdita di neuroni colinergici, disturbi della memoria spaziale, disfunzioni sinaptiche e mitocondriali.

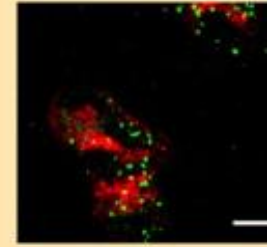
EFFETTI CITOTOSSICI

Nonostante le difficoltà nell'isolare gli oligomeri proteici mal ripiegati recenti studi hanno dimostrato che questi hanno la capacità di poter interagire con un'ampia gamma di composti cellulari:

- Capacità di legarsi alle membrane biologiche in modo da determinarne la rottura e consentire così uno squilibrio di calcio, disfunzione mitocondriale e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).
- Gli oligomeri $A\beta$ hanno la possibilità di interagire con proteine e lipidi a livello delle sinapsi.
- Possono indurre una risposta infiammatoria nelle cellule microgliali rilasciando citochine pro-infiammatorie.
- Capacità di interagire con i recettori AMPA e NMDA.

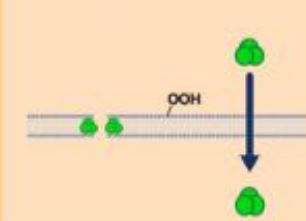


Membrane binding and toxicity



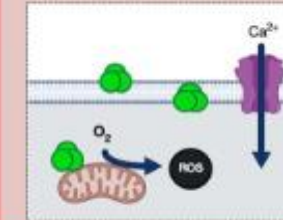
- Decreasing oligomer size
- Increasing oligomer hydrophobicity
- Posttranslational modification
- Specific oligomer-receptor interactions
- Increased GM1 content
- Decreased cholesterol content
- Lack of aminosterols

Changes to the cell membrane



- Lipid peroxidation
- Membrane tension changes
- Pore formation
- Bilayer thinning
- Detergent-like solubilization
- Changes in membrane permeability
- Nanodisc formation
- Oligomer uptake (pores, endocytosis, receptors)

Cellular responses



- Calcium influx
- Mitochondrial dysfunction
- ROS accumulation
- Caspase activation
- Inflammation responses
- Apoptotic activation

Changes to endogenous factors



- RNAs
- Soluble proteins
- Metabolites
- Aberrant protein-protein interactions
- Induction of missorting or aggregation prone states (e.g. tau)
- Posttranslational modifications
- Destabilization of cellular components (e.g. microtubules)

Gli effetti citotossici degli oligomeri proteici dipendono in gran parte dalla dimensione e dall'idrofobicità di questi ultimi.

- Oligomeri di piccole dimensioni sono maggiormente diffusibili attraverso la membrana cellulare
- Oligomeri di grandi dimensioni sono in grado di incorporarsi all'interno dei doppi strati lipidici.

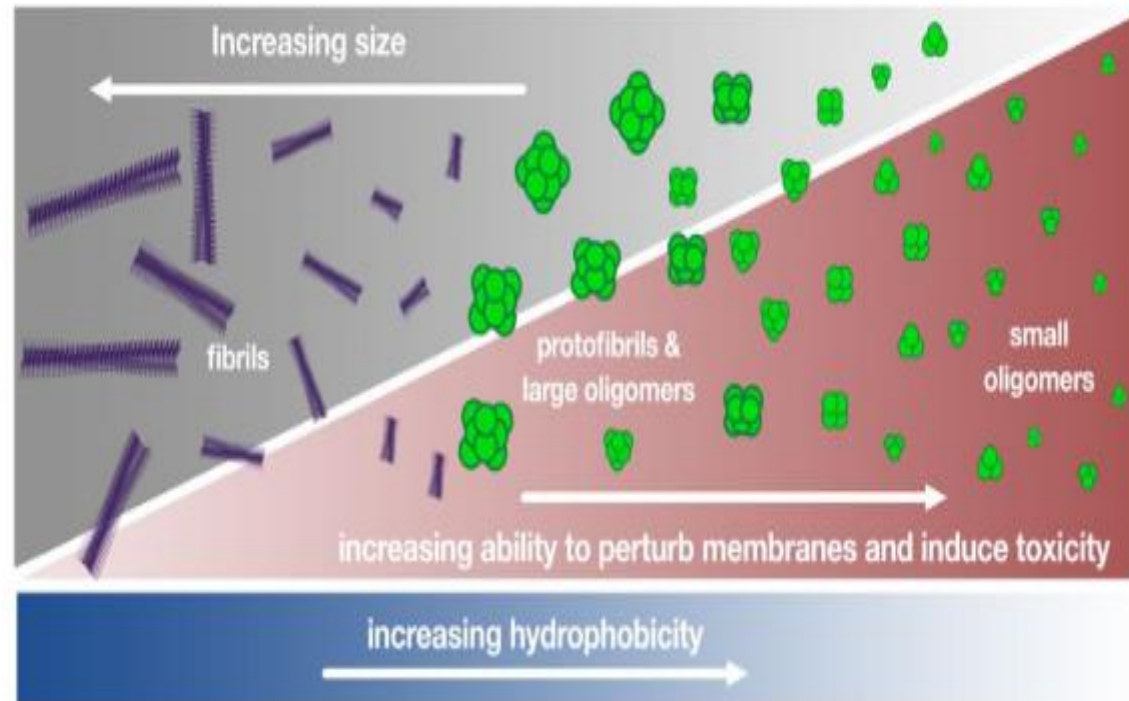


Fig. 6 Physicochemical parameters that influence the toxicity of protein misfolded oligomers. The toxicity typically scales with increasing hydrophobicity and decreasing size. Created with biorender.com

APPROCCI TERAPEUTICI

- Per il trattamento dell'AD è stato avanzato l'utilizzo di un anticorpo contro oligomeri A β ad alto peso molecolare, ossia lecanemab.
- L'uso di chaperoni molecolari può inibire la nucleazione primaria e secondaria e quindi ritardare la formazione di oligomeri.
- Il farmaco tafamidis contribuisce a rallentare la progressione di una malattia amiloide in quanto stabilizza lo stato nativo delle proteine.
- Utilizzo degli aminosteroli per prevenire il legame degli oligomeri alle membrane cellulari.
- Ulteriori terapie promettenti sono in fase di studio e mirano alla degradazione degli oligomeri attraverso la stimolazione dell'autofagia, sfruttando chaperoni molecolari che funzionano come disaggregasi o promuoverne la clearance.

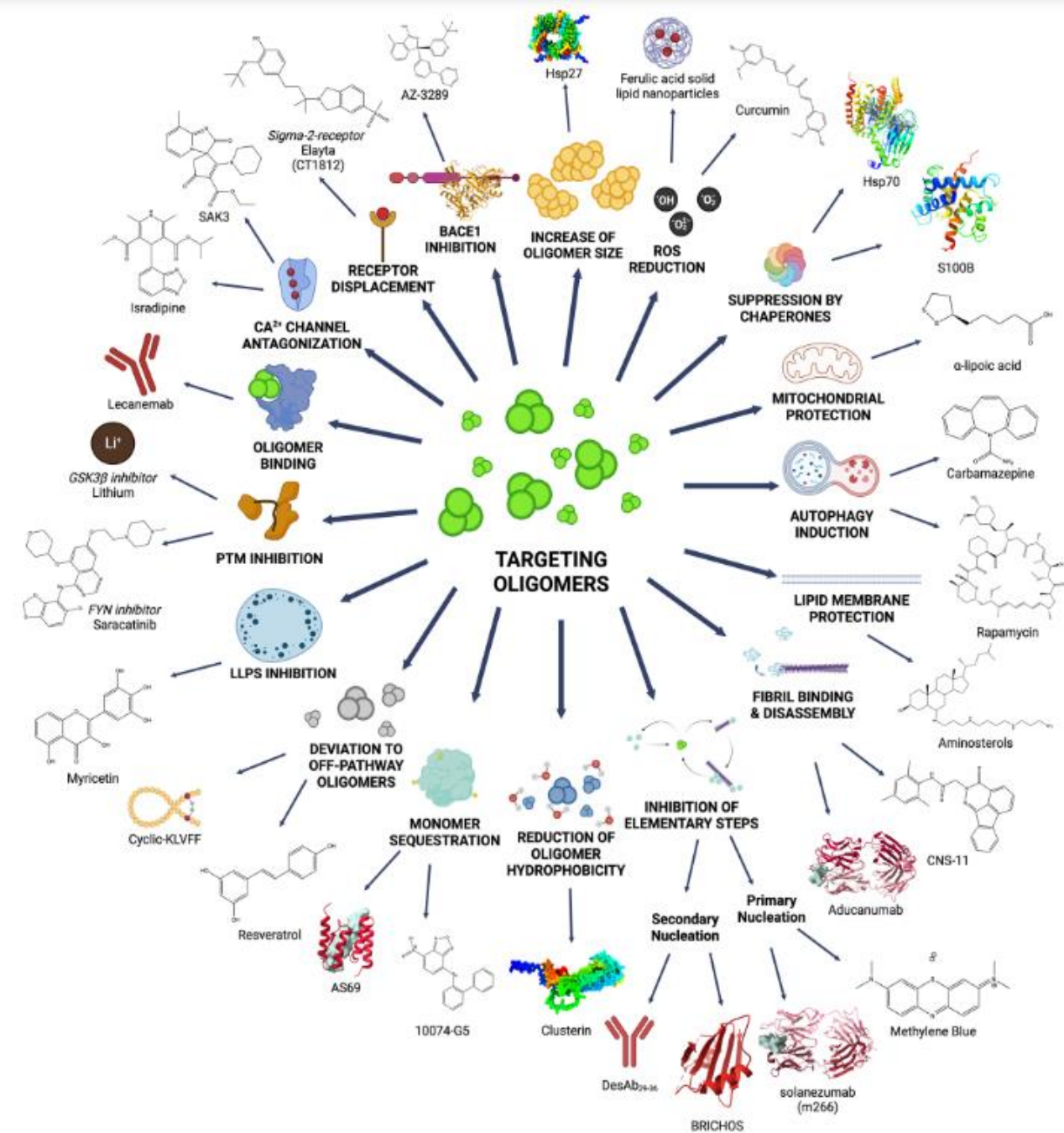



Fig. 10 Overview of approaches under development that could be potentially able to suppress the formation, reduce the lifetime, or decrease the toxicity of misfolded protein oligomers. Biological or chemical structures of prototypical drugs are shown for each class of therapeutic. Created with biorender.com

CONCLUSIONI

Futuri studi e approcci degli oligomeri proteici mal ripiegati richiederanno importanti sviluppi in due aree: dapprima è necessario mettere a punto metodi quantitativi per l'individuazione di oligomeri in vivo soprattutto per lo studio dei loro meccanismi di formazione ma anche sviluppare saggi di tossicità.

RIASSUNTO

- 
- Le proteine, dopo la sintesi, devono ripiegarsi correttamente per poter funzionare. Tuttavia, possono formarsi stati intermedi, inclusi oligomeri e strutture fibrillari la cui formazione avviene attraverso processi come l'allungamento delle fibrille, la nucleazione primaria e secondaria e la frammentazione delle fibrille. Questi passaggi possono essere descritti da equazioni differenziali, con parametri come la persistenza, produttività cinetica, abbondanza e tempo di picco degli oligomeri.
 - Gli oligomeri possono causare citotossicità interagendo con componenti cellulari, disturbando la membrana cellulare, inducendo squilibri di calcio e disfunzioni mitocondriali. Studi in vitro e su modelli animali hanno dimostrato che gli oligomeri possono compromettere la memoria e la funzione sinaptica, specialmente nell'Alzheimer e nel Parkinson.
 - Gli anticorpi contro gli oligomeri, come Lecanemab, mostrano promesse nel trattamento dell'Alzheimer, inibendone la formazione stessa.

BIBLIOGRAFIA

Misfolded protein oligomers: mechanisms of formation, cytotoxic effects, and pharmacological approaches against protein misfolding diseases.

Dillon J. Rinauro, Fabrizio Chiti, Michele Vendruscolo and Ryan Limbocker.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/pdb/5kk3>

<https://www.researchgate.net/publication/310360618> ProFAX A hardware acceleration of a protein folding algorithm

