



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

CORSO DI LAUREA

SCIENZE BIOLOGICHE

**La neuroprotezione della Transtiretina nella malattia dell'Alzheimer è legata
alla proteolisi**

**Transthyretin neuroprotection in Alzheimer's disease is dependent on
proteolysis**

TESI DI LAUREA DI:

Lavagnoli Martina

matricola: S1080002

DOCENTE REFERENTE

CHIAR.MO PROF:

Scirè Andrea Antonino

SESSIONE Febbraio 2020
ANNO ACCADEMICO 2018/2019

MATERIALE UTILIZZATO

Il materiale per la realizzazione di questa presentazione è stato reperito dall'articolo: <<**Transthyretin neuroprotection in Alzheimer's disease is dependent on proteolysis**>> Catarina S.Silvia, Jessica Eira, Carlos A. Ribeiro et al. 2017.

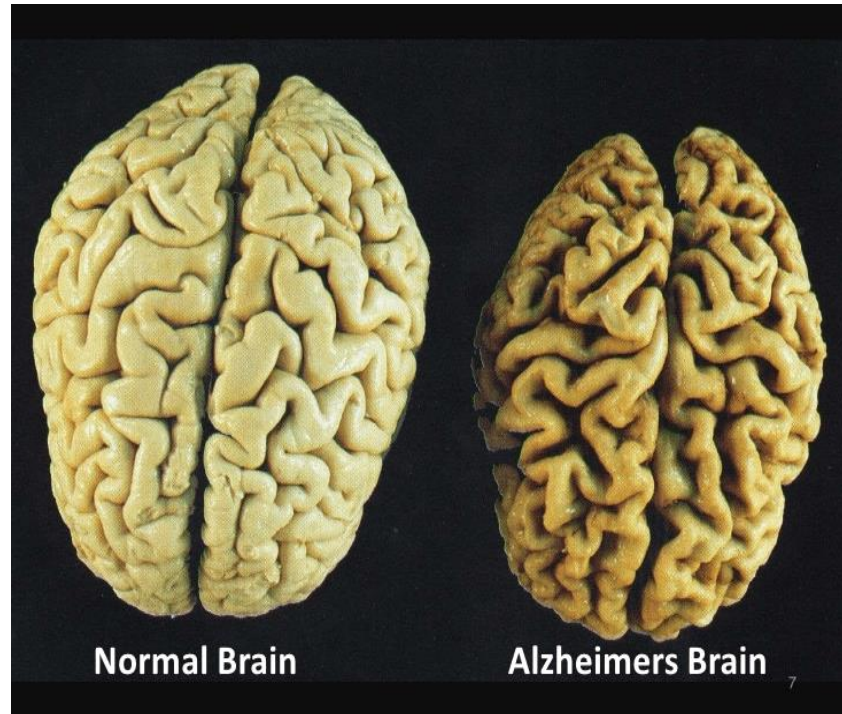
www.elsevier.com/locate/neuaging

Altre Fonti:

- <https://informa.airicerca.org/it/2016/04/12/accumulo-amiloide-alzheimer-relazione-pericolosa/>
- <https://it.wikipedia.org/wiki/Transtiretina>
- <http://www.phfrinc.com/Molecular%20Model%20of%20Ab%20peptide%20aggregation.htm>

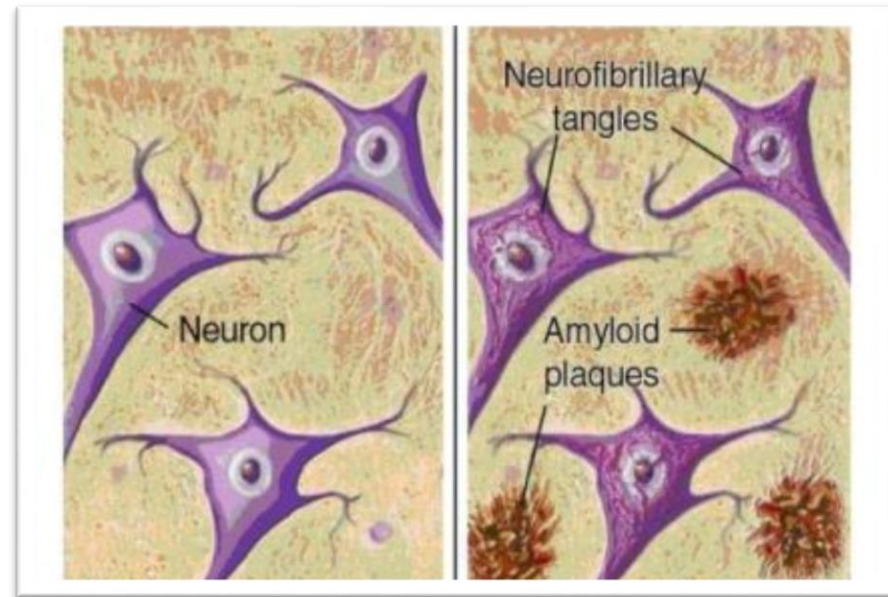
L'ALZHEIMER

- ◆ La malattia di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da deficit progressivi della memoria e declino cognitivo.
- ◆ Il sintomo più precoce della malattia è la difficoltà di ricordarsi eventi recenti, questo, in età più avanzata, è spesso accompagnato da : afasia, disorientamento, cambiamenti di umore e depressione.
- ◆ La patologia è stata descritta per la prima volta nel 1906 dallo psichiatra e neuropatologo Alois Alzheimer che ha descritto nel 1907 i suoi aspetti neuropatologici.



PATOGENESI

- ◆ I 2 principali segni distintivi di AD sono la presenza intraneuronale di grovigli neurofibrillari costituiti dalla proteina TAU coinvolta nello sviluppo di molte malattie croniche che hanno in comune la degenerazione del citoscheletro neuronale.



- ◆ Quando l'organizzazione spaziale è sconvolta, il citoscheletro si ammassa in convoluti argentofili o si addensa in depositi lungo o nel corpo cellulare. La fosforilazione della proteina tau del citoscheletro comporta, inoltre, anche la disconnessione delle sinapsi, la disorganizzazione dei circuiti neuronali della neocorteccia e l'accumulo extracellulare di placche senili costituite da peptide amiloide- β ($A\beta$). $A\beta$ risulta dalla scissione della proteina precursore dell'amiloide (APP) da parte della beta secretasi.

La scissione del precursore APP da parte della secretasi porta alla formazione di due frammenti: β -amiloide 1-40 e 1-42 . Abbassare i livelli di $A\beta$ è un importante obiettivo terapeutico nell'AD, che potrebbe essere raggiunto interferendo con: la produzione, l'aggregazione o il degrado del peptide.

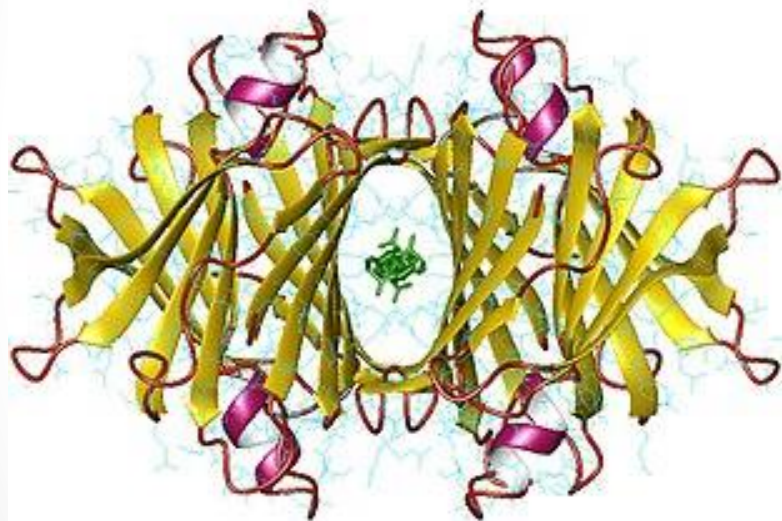


TRANSTIRETINA

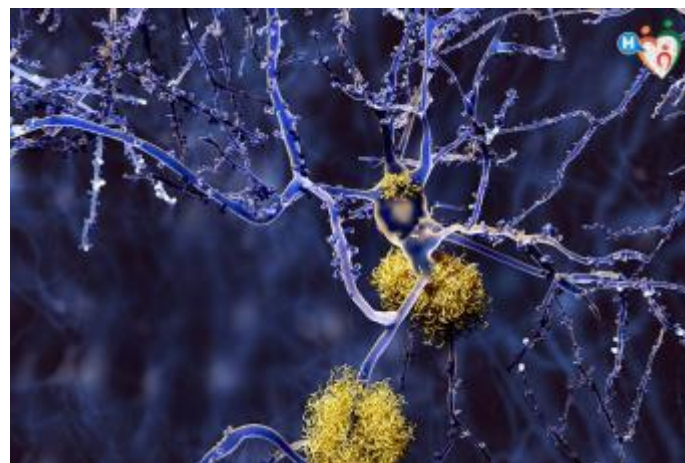
Transtiretina (TTR), una proteina con attività metalloproteasica, ha mostrato di tagliare l' $A\beta$ in vitro. La TTR è stata caratterizzata come proteina neuroprotettiva nell'AD poiché:

- i livelli di TTR sono diminuiti nel liquido cerebrospinale (CSF) dei pazienti con AD.
- sovraesprimere il tipo selvaggio di TTR umano (WT) in un modello murino AD normalizza la cognizione, la memoria e diminuisce la neuropatologia e la deposizione di $A\beta$.
- in vitro, la TTR riduce la fibrillazione di $A\beta$.
- La neuroprotezione del TTR nell'AD è stata principalmente attribuita più che alla sua capacità di legare $A\beta$, alla scissione di $A\beta$ da parte di TTR

Il sito attivo della TTR (TTR WT) è composto da una triade di residui di: His88, His90 e Glu92 che si legano a uno ione zinco catalitico e da Glu72, che funge da base generale. L'identificazione dei residui catalitici di TTR consente di valutare la TTR priva di attività proteolitica (TTR H90A), mediante mutazione dei residui sopra menzionati che influenzano l'attività di proteasi quindi, di sperimentare come le due forme di TTR attiva e inattiva influenzano la neurotossicità, l'aggregazione e la degradazione di A β nell'AD.



TRANSITERINA



A β NELL'ALZHEIMER

... IN LABORATORIO

TTR ricombinante WT e TTR H90A sono stati prodotti in cellule BL-21 pLys Escherichia coli trasformate con pETF1 (Feridossina) che trasportava DNA complementare TTR.

ESPERIMENTI:

1) PURIFICAZIONE ED ETICHETTATURA TTR

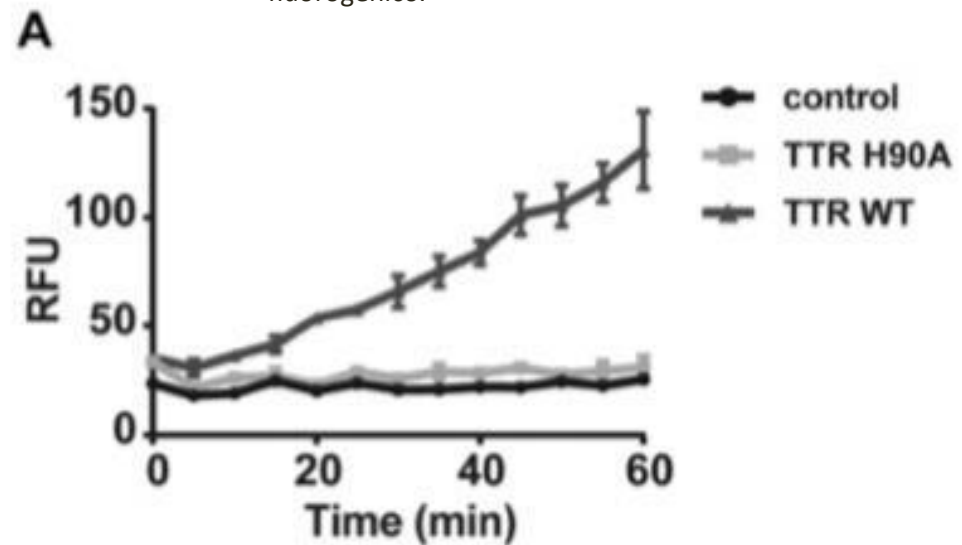
Le proteine sono state isolate e purificate, dopo la lisi batterica sono stati eseguiti estratti di proteine su cromatografia a scambio ionico e successivamente il TTR è stato isolato in gel nativi di Agarosio. Per i saggi cellulari, le proteine sono state disintossicate utilizzando una resina per la rimozione di endotossine e quantificate utilizzando il saggio proteico a base di Lowry seguendo i protocolli del produttore.



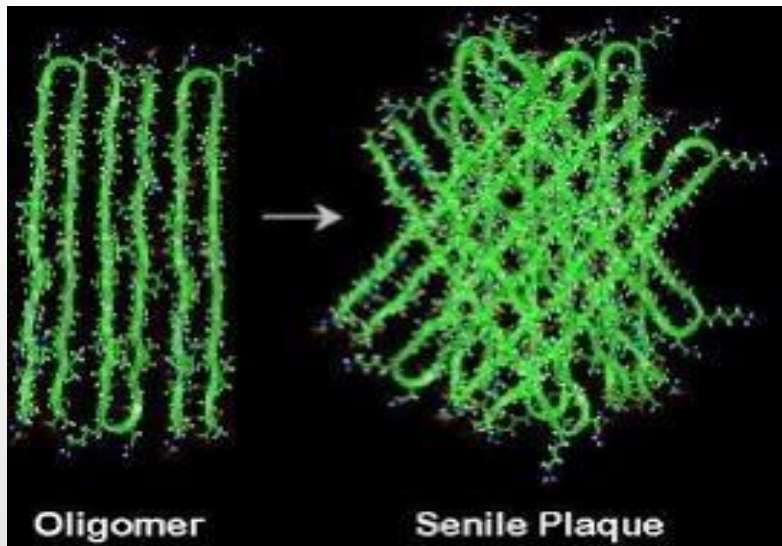
2) TEST DI PROTEOLISI

È stata testata l'attività proteolitica del TTR WT e H90A utilizzando il peptide fluorogenico Abz-VHHQKL-EDDnp.

IMMAGINE A: Attività proteolitica da peptide fluorogenico.



OLIGOMERI E PLACCHE DI A β



3) PRODUZIONE DI SPECIE A β

Il peptide A β (1-42) umano è stato sciolto in esa- fluoroisopropanolo e incubato, dopo la rimozione dell'esa- fluoroisopropanolo si è proceduto con la formazione di oligomeri e fibrille di A β che sono state visualizzate tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM).



4) COIMMUNOPRECIPITAZIONE

Il peptide A β è stato incubato senza e con TTR WT e TTR H90A 1 ora a 37 C. Tramite l'aggiunta degli anticorpi e il trasferimento nella membrana di nitrocellulosa è stata verificata poi la chemiluminescenza. Sono state eseguite reazioni di controllo solo con TTR.

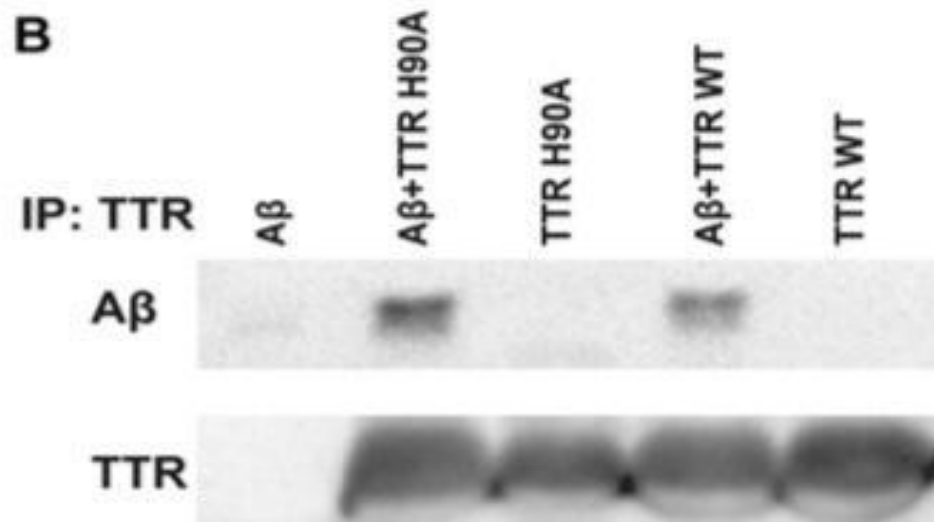
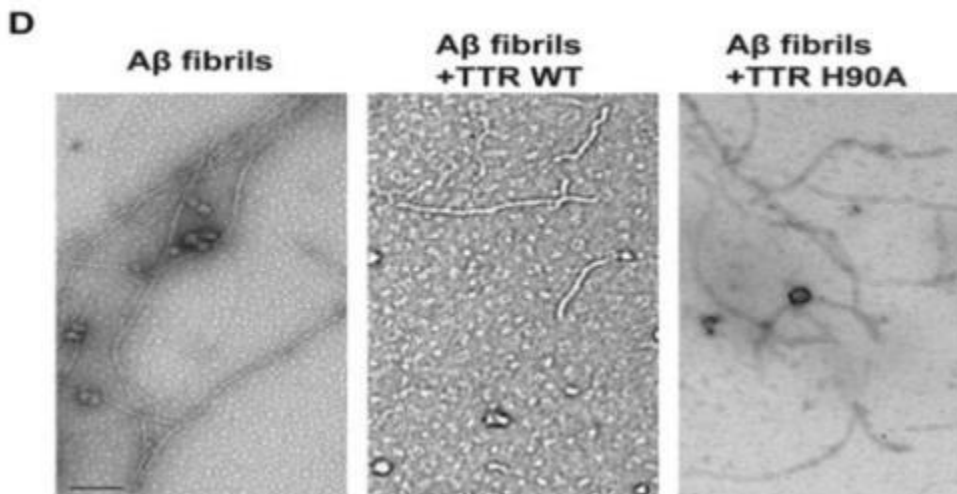
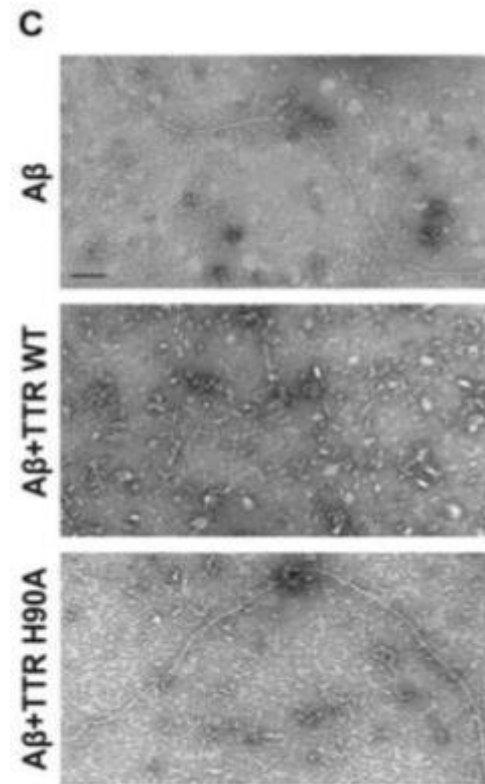


IMMAGINE B: coimmunoprecipitazione

5) EFFETTO DELL'ATTIVITA' PROTEOLITICA DEL TTR NELL'AGGREGAZIONE DELL'A β E NELLA ROTTURA DELLE FIBRILLE.

- ◆ Il peptide solubile A β è stato incubato con TTR WT e TTR H90A a 37 ° C per 6 giorni. I campioni sono stati analizzati da TEM.
- ◆ A β fibrillare (ottenuto come precedentemente descritto) è stato incubato con TTR WT e H90A a 37 ° C per 4 giorni. I campioni sono stati analizzati da TEM.

Gli esperimenti sono stati eseguiti 3 volte.



IMMAGINI C e D: effetto della TTR sul peptide A β e sulle fibrille di A β

6) SAGGI CELLULARI

- ◆ Cellule di neuroblastoma del Neuro 2A che esprimono stabilmente l'APP umana portante la mutazione svedese K670N e M671L (che induce una sovrapproduzione di APP), sono state trattate con con TTR WT e TTR H90A ed è stato effettuato il saggio ELISA. I risultati sono stati normalizzati dalla proteina totale presente nei lisati cellulari, quantificata da Bradford.

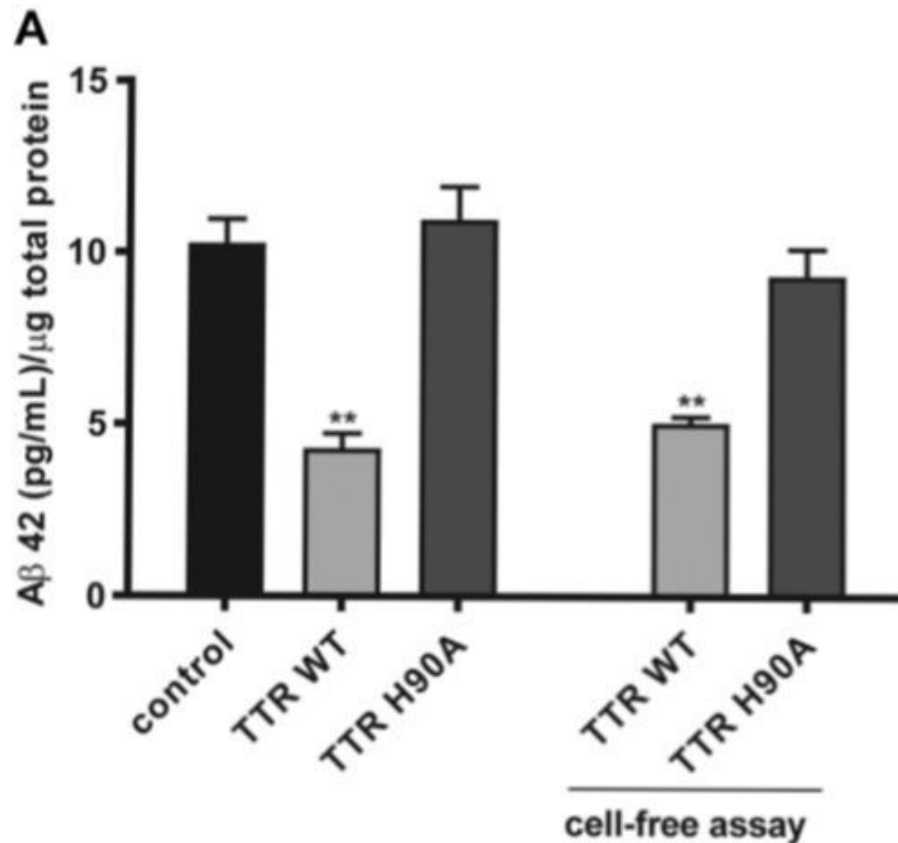


IMMAGINE A: saggio ELISA

- ◆ Tramite cellule neuronali dell'ippocampo (ottenute grazie all'isolamento degli ippocampi di embrioni di topi successivamente trattati), abbiamo verificato la variazione della neurotossicità indotta da $A\beta$ in presenza sia di TTR WT che di TTR H90A tramite il saggio della Caspasi 3. L'attivazione della Caspasi 3 è stata misurata utilizzando un kit di dosaggio fluorimetrico.

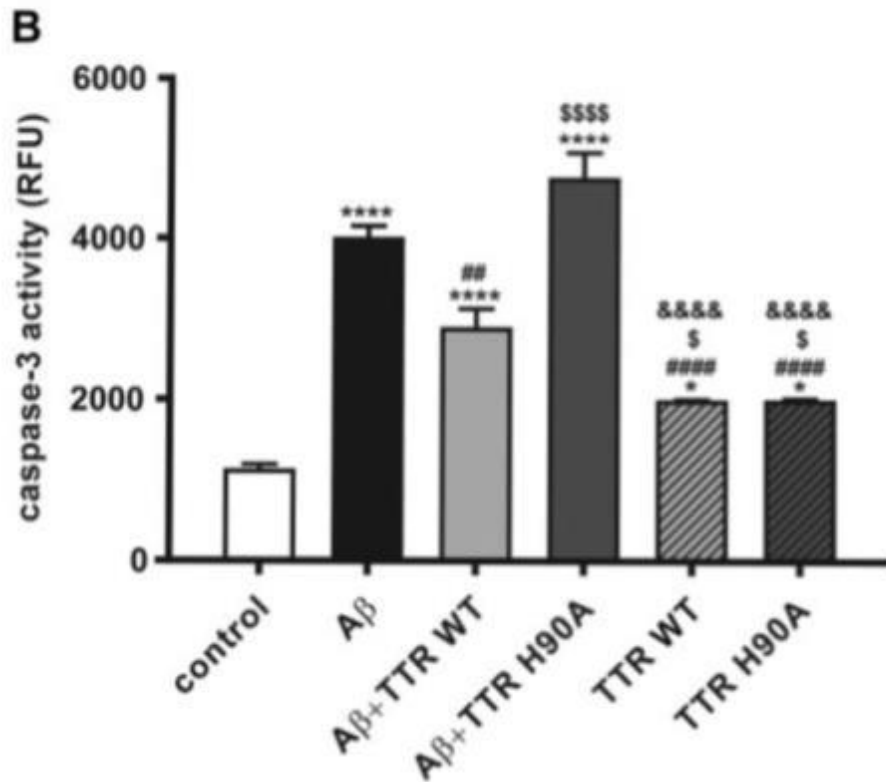


IMMAGINE B: SAGGIO CASPASI 3

CONCLUSIONI E RIASSUNTO

Dopo un excursus sulla malattia dell'Alzheimer da me effettuato, ho proseguito con l'analisi dell' articolo: <<**Transthyretin neuroprotection in Alzheimer's disease is dependent on proteolysis**>> dove è stata studiata l'importanza della neuroprotezione da parte della TTR sull'AD ed è stato evinto che:

- ❖ La TTR in forma attiva **scinde il peptide A β in vitro** a differenza della forma inattiva che non è dotata di attività proteolitica.
- ❖ Entrambe le forme, quindi, TTR WT (attiva) e TTR H90A (inattiva), legano il peptide A β .
- ❖ Il mutante TTR H90A non ha alcun impatto sulla fibrillizzazione di A β a differenza di TTR WT che **porta all'inibizione e all'interruzione della formazione di fibrille A β .**
- ❖ **Dai saggi cellulari si evince che TTR WT riduce la presenza e la neurotossicità di A β , mentre l'attività di TTR H90A è irrilevante.** Questi risultati mostrano che l'attività proteolitica del TTR viene mantenuta nei test cellulari e che il TTR attivo scinde l'A β .



GRAZIE