



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

PhD Program
in **Drug Discovery and Development**
XXXIII Cycle - Academic year 2020/2021

PhD Thesis in

*Structural study of biomarkers for
neurodegenerative diseases*

Candidate

Angelo Santoro

Supervisor

Prof. *Anna Maria D'Ursi*

PhD Program Coordinator: Prof. *Gianluca Sbardella*

Abstract

L'attività di ricerca del mio dottorato di ricerca si è concentrata sui seguenti temi:

- Analisi conformazionale NMR di A β (1-42) in 50/50 HFIP/acqua v/v.
- Progettazione e studio dell'interazione di peptidi a partire dal sito di legame degli anticorpi diretti contro gli epitopi A β (1-42).
- Studio dell'interazione dell'eparina con la regione α -sinucleina1-61.

Sulla base dell'ipotesi della cascata dell'amiloide- β (A β), l'accumulo anomalo dei peptidi dell'amiloide- β (A β) nelle placche extracellulari tossiche è la principale causa di neurodegenerazione e demenza nei pazienti con malattia di Alzheimer (AD). I componenti principali delle placche amiloidi sono A β (1-40) e A β (1-42), peptidi elicoidali solubili che in condizioni ambientali tossiche subiscono una transizione conformazionale per formare aggregati di foglietti β . Le miscele HFIP/acqua sono state utilizzate come sistema per monitorare i cambiamenti conformazionali indotti nella struttura stabile della soluzione A β (1-42) aumentando la quantità di acqua. L'A β (1-42) studiato mediante NMR nella miscela 80/20 HFIP/acqua v/v ha rivelato una struttura elicoidale-kink-elicoidale regolare, mentre nella miscela contenente un contenuto di acqua più elevato - miscela 30/70 HFIP/acqua v/v - ha rivelato una perdita di questa struttura, per assumere una successione di conformazioni di β -bend conservando l' α -elica regolare su ¹¹E-L¹⁷.

La prima parte del mio progetto di dottorato si è concentrata sullo studio NMR dell'A β (1-42) in 50/50 HFIP/acqua, una miscela di solventi caratterizzata da polarità intermedia rispetto a quelle precedentemente utilizzate. I nostri dati mostrano che in queste condizioni, A β (1-42) è caratterizzato da un' α -elica regolare sui residui ¹⁸V-V²⁴, β -turn sui segmenti ⁴F-H¹⁴ e ³²I-G³⁸, brevi random coil e strutture ripiegate sui restanti segmenti della sequenza. Il C-terminale mostra elevata flessibilità e proprietà dinamiche rivelando un ruolo primario nella transizione alla conformazione del filamento β . Le simulazioni di dinamica molecolare in soluzione acquosa confermano che queste regioni flessibili evolvono in strutture regolari di filamenti β dando origine ad un'architettura complessa di aggregati β -foglietto. Sulla base dell'ipotesi della cascata amiloide, sono state testate centinaia di molecole, come possibili terapeutici contro l'AD in grado di disaggregare le fibrille A β o prevenirne la formazione. Più recentemente, all'interno della comunità scientifica si è diffusa l'ipotesi che l'immunoterapia mirata al peptide A β abbia un grande potenziale per il trattamento o la prevenzione dell'AD. Di conseguenza, sono stati sviluppati diversi anticorpi mirati a diversi epitopi di A β (1-42). In questo contesto, parte della mia attività di ricerca si è concentrata sullo studio di nuovi peptidi come possibili ligandi dell'A β (1-42) progettati sul modello dei siti di legame di diversi anticorpi

monoclonali. In particolare, abbiamo selezionato solanezumab e crenezumab che legano i segmenti $^{16}\text{K-S}^{26}$ e $^{13}\text{H-D}^{23}$ di $\text{A}\beta(1-42)$ e aducanumab che lega il frammento N-terminale $^3\text{E-E}^{11}$. I peptidi progettati sono stati studiati per la loro interazione con $\text{A}\beta(1-42)$ utilizzando tecniche di spettroscopia CD e NMR; quindi, abbiamo studiato il loro effetto sull'aggregazione $\text{A}\beta(1-42)$ utilizzando la microscopia a forza atomica. I nostri dati mostrano che WAibH e SYSTPGK sono dotati di un'interessante capacità di legare $\text{A}\beta(1-42)$. Sebbene caratterizzati da una modesta costante di dissociazione (KD), inibiscono la formazione di fibrille mature $\text{A}\beta(1-42)$, come dimostrato da una diminuzione quantitativa del grado di fibrillazione alla microscopia AFM.

L'attività di ricerca del mio Ph.D. svolta presso l'Università di Copenaghen sotto la supervisione della Prof.ssa Birthe B. Kragelund era incentrato sullo studio NMR dell'interazione dell' α -sinucleina con i glicosaminoglicani, in particolare l'eparina. La proteina α -sinucleina (aSN), intrinsecamente disordinata, è nel suo stato fibrillato, il componente principale dei corpi di Lewy che sono i segni distintivi della malattia di Parkinson. Componenti aggiuntivi includono glicosaminoglicani, ad es. proteoglicani eparan solfato. È stato dimostrato che l'aumento dei livelli di solfatazione dell'eparan solfato è età-dipendente. L'eparina, un glicosaminoglicano altamente solfato, è un mimetico rilevante dell'eparan solfato e ha dimostrato di influenzare la fibrillazione di aSN. In questo contesto, utilizzando esperimenti NMR, ho dato il mio contributo per dimostrare che una regione corrispondente ai residui 1-61 di aSN è priva di propensione intrinseca alla fibrillazione, mentre la fibrillazione può essere indotta dall'eparina in modo concentrazione-dipendente. Spostamenti strutturali dal disordine, attraverso β -turn di tipo I, al β -foglietto, sono stati osservati in aSN1-61. Pertanto l'eparina può indurre la fibrillazione di aSN1-61 così come la proteina intera, aSN, attraverso un debole legame con l'N-terminale e i motivi KTKE; modula la struttura di aSN inducendo strutture β -turn di tipo I, che possono essere fondamentali per innescare la fibrillazione di aSN.