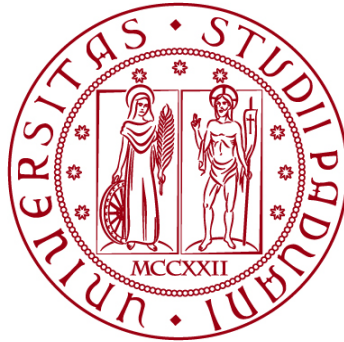


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

Espressione di α -sinucleina e caratterizzazione dello stato di aggregazione in presenza di DOPAC

**Tutor: Prof.ssa Patrizia Polverino De Laureto
Dipartimento di Scienze del Farmaco**

**Co-tutor: Dott.ssa Ilenia Inciardi
Dipartimento di Scienze del Farmaco**

Laureando: Riccardo Pol

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

1. Abstract
2. Introduzione
 - 2.1. Parkinson
 - 2.2. Superfamiglia sinucleina
 - 2.2.1. α -Sinucleina
 - 2.2.2. Plasmide pT7-7 asyn E46K
 - 2.3. Inibitori di aggregazione
3. Metodi e materiali
 - 3.1. Trasformazione dei batteri
 - 3.2. Inoculo e induzione
 - 3.3. Purificazione della proteina
 - 3.4. Precipitazione e dialisi
 - 3.5. FPLC a scambio ionico
 - 3.6. Stato di aggregazione T0, T48, T168
 - 3.6.1. Thermomixer
 - 3.6.2. Dicroismo circolare
 - 3.6.3. UV-Vis
 - 3.6.4. ThT
 - 3.6.5. SDS
4. Risultati
 - 4.1. Analisi mediante FPLC
 - 4.2. Analisi mediante SDS
 - 4.3. Analisi mediante UV-Vis
 - 4.4. Analisi mediante CD
 - 4.5. Saggio della Tioflavina T (ThT)
5. Conclusione
6. Bibliografia

1. Abstract

Lo studio applicato alla α -sinucleina valuta lo stato di aggregazione proteica in presenza e assenza di *acido 3,4-diidrossifenilacetico* (DOPAC), studiandone così la caratterizzazione della struttura proteica utilizzando diverse tecniche analitiche. Lo studio si dovrà focalizzare nell'ottenimento di un campione proteico di α -sinucleina da una coltura mutante di *E. Coli*, caratterizzata dalla presenza del plasmide "*pT7-7 asyn E46K*", analizzando in successione le caratteristiche della proteina in condizioni denaturanti e di aggregazione. Mantenendo sempre un'analisi parallela tra un campione contenente la proteina pura e un campione contenente anche DOPAC, si andrà a verificare quanto nelle varie fasi del processo la presenza di questo composto andrà a modificare l'aggregazione dell' α -sinucleina. DOPAC infatti permetterebbe la stabilizzazione dei singoli monomeri di α -sinucleina, portando alla formazione di dimeri o trimeri, strutture che renderebbero più difficile la formazione di fibrille amiloidi di α -sinucleina, strutture caratteristiche dei "*Lewy bodies*" (LB), tratto caratteristico di alcune malattie neurodegenerative come il Parkinson. Nonostante le interazioni scoperte tra α -sinucleina e altri derivati dopaminergici non si è ancora trovato un composto che impedisca l'aggregazione della proteina, pertanto sarà necessario continuare con studi più specifici per individuare un potenziale composto inibitore della formazione dei LB, cercando così di ridurre lo sviluppo di malattie neurodegenerative.

2. Introduzione

Con l'aumento dell'aspettativa di vita in alcuni paesi, come l'Italia, si è sviluppata un'incidenza sempre più maggiore di casi con pazienti affetti da malattie neurodegenerative. Le due patologie attualmente maggiormente diffuse consistono nell'Alzheimer, con una frequenza anche superiore al 32% nei soggetti di età ≥ 85 anni, e nel Parkinson, con un'incidenza di circa il 10% nei soggetti di età ≥ 80 anni. Tali malattie sono ancora oggetti di studi approfonditi atti a scoprire le esatte cause fisiopatologiche che porterebbero allo sviluppo di queste patologie e altre dedicate all'individuazione di molecole di interazione, almeno per quelle conosciute finora, che potrebbero influenzare il possibile sviluppo di tali malattie.

2.1. Parkinson

Il Parkinson costituisce la seconda malattia neurodegenerativa più comune diffusa in molti paesi, in particolare uno studio condotto nel 2020 analizza la popolazione italiana evidenziando come questa malattia presenta una incidenza non indifferente con una media 193.7/100,000 nella popolazione totale, toccando anche valori come 1235.7/100,000 se venissero considerati esclusivamente soggetti di età superiore ai 75 anni. Normalmente il Parkinson è abbinato a sintomi prevalentemente motori, tuttavia oltre questi può portare ad ulteriori complicazioni neuropsichiatriche e può compromettere altre funzioni fisiologiche. I sintomi più caratteristici dei soggetti affetti da Parkinson sono tremolii, instabilità posturale, rigidità e bradicinesia, tuttavia oltre a queste patologie è possibile inoltre che si presentino lo sviluppo di depressione, psicosi, demenza e disturbi del sonno. Le cause scatenanti per lo sviluppo dei sintomi sono principalmente collegate alla perdita di cellule nella *substantia nigra*, le quali coprono ruoli diversi in base alla localizzazione del neurone perso. In comune la perdita di questi neuroni modifica il rapporto dopaminergico corporeo, portando a un

apporto inferiore di prodotti dopaminergici ai gangli basali atti al controllo della tonicità muscolare e del movimento. Per completare un quadro patologico del Parkinson è necessario anche valutare la componente genetica la quale copre un ruolo importante nella probabilità di sviluppo di questa patologia, per esempio attraverso la sovraespressione di α -sinucleina o con un impedimento nel funzionamento mitocondriale a causa della presenza della mutazione PINK-1 e PARKIN potrebbe presentarsi una maggiore probabilità di ricorrere nello sviluppo della malattia. Attualmente il Parkinson risulta ancora materia di studio data l'impossibilità attuale nel caratterizzare con precisione tutte le cause fisiopatologiche della malattia. Tuttavia alcuni studi riconducono la possibilità dello sviluppo di questa patologia a livello del sistema nervoso autonomo periferico, diffondendosi successivamente anche al sistema nervoso centrale e interessare precocemente la struttura del basso tronco encefalico rispetto alla substantia nigra. Nonostante le varie incognite ancora collegate al Parkinson è ormai chiaro il diretto collegamento tra questa patologie e l'accumulo di α -sinucleina all'interno di neuroni dopaminergici, chiaro segnale di una possibile evoluzione in una condizione patologica.

2.2. Superfamiglia sinucleina

La sinucleina è una superfamiglia di proteine presinaptiche molto abbondanti, caratterizzata da un struttura misfolded, tale per cui si ha la formazione di fibrille amiloidi in caso di aggregazione della proteina stessa. Questa proteina è implicata direttamente nello sviluppo di diverse malattie neurodegenerative come Parkinson, Alzheimers, LB e anche NBIA (*Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation*), insieme di malattie neurodegenerative rilevanti. Il nome dato a questa proteina, "Synuclein" in inglese, deriva da *synaptic vesicles* ("syn") e *nuclear envelope* ("nuclein"), questo perché è stata identificata sperimentalmente nell'envelope nucleare presinaptico. All'interno di questa superfamiglia si identificano tre strutture della sinucleina ovvero la struttura α , β e γ , differenziandosi sia per sequenza sia per distribuzione spaziale. La conformazione di maggior interesse per studi patologici di questa superfamiglia corrisponde alla conformazione α , poiché questa è collegata alla formazione di fibrille amiloidi. L' α -sinucleina si differenzia dalla struttura β a livello di distribuzione poiché quest'ultima, seppur condivide la presenza a livello del SNC, rappresenta una distribuzione più uniforme rispetto alla α -sinucleina ed è presente nelle cellule Sertoli dei testicolo, al contrario di α presente anche a livello delle piastrine. La struttura γ , invece, è riconosciuta come BCSG1 (*Breast Cancer-specific Gene 1*) ed è maggiormente distribuita nel midollo spinale e nei "sensory ganglia", differenziandosi ulteriormente per la maggiore presenza a livello del citoplasma al contrario di α/β -sinucleina che risultano più caratteristici negli assoni e dei corpi cellulari. Queste tre conformazioni contengono regioni di sequenza simile le une dalle altre, nonostante ciò la differenza che ha portato alla disparità del loro ruolo è riconducibile anche alla loro sequenza, data la diversità nel numero di amminoacidi per proteina. L'analisi della sequenza amminoacidica di α -sinucleina umana ha portato alla scoperta di almeno 3 isomeri della stessa, tutti originati attraverso splicing alternativo, portando così alla identificazione di una sequenza standard di lunghezza 140 basi e di due originate da splicing che daranno due sequenze di lunghezza minore, 126 basi e 112 basi. Questa differenza nel numero di basi si deve alla delezione degli esoni 3 e 5, il primo localizzato nella regione N-terminale codificando per gli aminoacidi 41-54, mentre il secondo risulta essere presente nella regione C-terminale, codificante gli

aminoacidi 103-130. Analizzando la struttura di α -sinucleina umana completa, quindi considerando la sequenza completa di 140 basi, si possono identificare 3 regioni: 1-60 pb, 61-95 pb e 96-140 pb. La regione 1-60 corrisponde alla regione N-terminale la quale include 4 sequenze di 11 amminoacidi conservati con un motif caratteristico (XKTKEGVXXXX), la regione 61-95 costituisce la regione centrale e contiene le sequenze responsabili dell'aggregazione proteica della α -sinucleina, ovvero le sequenze NAC (*Non- A β Component of Alzheimer's disease*), le quali contengono tre ulteriori siti KTKEGV. Infine la regione 96-140 differenzia principalmente γ -sinucleina da α - e β -sinucleina, data appunto l'assenza della regione stessa, la quale è caratterizzata dalla presenza di prolina e anche da 3 residui tirosinici molto conservati all'interno della superfamiglia.

2.2.1. α -Sinucleina

La prima conformazione scoperta della superfamiglia della sinucleina è stata α -sinucleina, identificata da Maroteaux nel 1988 come una proteina neurale durante un'analisi di esemplari di *Torpedo californica*, solo successivamente verranno scoperte β -sinucleina nel 1990 e γ -sinucleina nel 1997. α -Sinucleina ottenne un notevole interesse nell'ambito della ricerca dopo la scoperta del suo ruolo centrale nello sviluppo di malattie neurodegenerative avvenuta nel 1997. Per mezzo di esami immunostochimici si è infatti dimostrata la presenza di α -sinucleina nei LB, struttura caratteristica comune in alcune malattie neurodegenerative come *Parkinson*, *Alzheimer*, *Demenza ai LB* e *NBIA*. Nonostante sia comunque una proteina soggetta a molti studi risulta possedere ancora molte caratteristiche sconosciute, sia a livello funzionale sia nei suoi ruoli fisiologici. A livello di sequenza α -sinucleina presenta, come detto in precedenza, una sequenza di 140 pb e le varie mutazioni minsenso della stessa sono focalizzate nel dominio adibito all'interazione con la membrana, influenzandone i legami lipidici. L'interazione con le membrane lipidiche è fondamentale per la struttura proteica poiché α -sinucleina è caratterizzata da una assenza intrinseca di struttura e quindi presenta similitudine con le proteine intrinsecamente disordinate. Questa struttura tridimensionale comporta una modificazione importante a livello spaziale in presenza di membrane, questa modifica dipende non solamente dalla presenza della membrana stessa, ma anche dalla curvatura della membrana d'interazione. In base a tale curvatura α -sinucleina può assumere una struttura *α -helix* o *broken α -helix*, la prima più presente con membrane di maggiori dimensioni mentre la seconda tipicamente caratteristiche per vescicole di piccole dimensioni. L'interazione comporta l'oligomerizzazione di α -sinucleina in multimeri sulla membrana, mentre in condizioni patologiche non si avrà la formazione di *α -helix* ma *β -sheet*, comportando lo sviluppo di fibrille data dall'aggregazione della proteina, favorendo così lo sviluppo di una condizione neurotossica di α -sinucleina che porterebbe al deposito di questa forma fibrillare nei LB. L'esatto processo di formazione di questi aggregati e la natura di questa neurotossicità non è ancora stata identificata con precisione, tuttavia per quanto scoperto finora il processo di deposito nei LB consiste nella formazione di oligomeri di *β -sheet* definiti "*protofibrille*" che in caso di deposito all'interno dei LB verrebbero convertite in fibrille amiloidi.

2.2.2. Plasmide pT7-7 asyn E46K

La struttura di base di questo plasmide è caratterizzata dalla presenza di due promotori ovvero “*T7 promoter*”, utilizzato come promotore basato sull'utilizzo di una RNA polimerasi 5'→3' e “*AmpR promoter*”, promotore opposto a T7 che precede la sequenza codificante la resistenza all'ampicillina “*AmpR*”. La caratteristica principale di questo plasmide consiste nella mutazione della sequenza codificante α -sinucleina portando alla sostituzione di un acido glutammico (*E*) in posizione 46 con una lisina (*K*), da cui ne deriva il nome E46K. La scelta di questo plasmide per la sintesi di α -sinucleina non è casuale, infatti negli anni sono state identificate diverse mutazioni della proteina come A30P, H50Q, G51D, A53E e A53T, tuttavia il mutante E46K risulta essere la mutazione ereditaria più influente nella formazione dei LB. Grazie a studi basati sull'utilizzo di NMR si è scoperto un massiccio riarrangiamento spaziale della proteina come conseguenza della presenza di tale mutazione, comportando così un aumento della patogenicità di E46K possibilmente collegata ad una maggiore abilità dell' α -sinucleina di legare fosfolipidi, tuttavia questo è stato confermato solo da studi in vitro. A livello di sequenza la modificazione puntiforme dell'amminoacido in posizione 46 determina nella struttura proteica la perdita di un “*salt bridge*” tra E46 e K80, tale per cui sostituendo il residuo di acido glutammico (*E*) con una lisina (*K*) si avrà lo sviluppo di una forza di repulsione elettrostatica tra K46 e K80, permettendo lo sviluppo di una struttura tridimensionale differente.

2.3. Inibitori di aggregazione

L'analisi dell'interazione tra α -sinucleina e altre macromolecole ricopre un ricco campo di ricerca ancora pieno di incognite. Gli studi dedicati alla scoperta delle molecole di interazione hanno portato all'identificazione di diversi composti come con la proteina “*Parkin*” (PRKN), l'enzima “*Leucine-rich repeat kinase 2*” (LRRK2) e prodotti dopaminergici. PRKN consiste in una proteina con un ruolo attivo di ubiquitinazione nel sistema dei proteasomi, implicati nella degradazione di proteine, LRRK2 invece corrisponde ad un componente della superfamiglia delle “*Leucine-rich repeat kinase family*”, la quale è stata associata allo sviluppo del Parkinson se presentasse mutazioni a livello dei rispettivi geni regolatori. Infine i composti dopaminergici coprono una parte importante degli studi focalizzati sulla comprensione dei possibili inibitori della formazione di fibrille di α -sinucleina, infatti tra questi i più studiati rimangono 3,4-diidrossifenilacetaleide (DOPAL), da cui ne derivano acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPET) e DOPAC. Le ricerche svolte su DOPAL suggeriscono che in presenza di α -sinucleina si ha la formazione di legami covalenti tra i residui di lisina, tali per cui la proteina manterrebbe una conformazione oligomerica inibendo la formazione di fibrille. Gli studi dedicati all'interazione con DOPET non hanno ancora permesso una comprensione approfondita del processo alla base di tale interazione, seppur è stato dimostrato come anche questa riesca a portare alla formazione di oligomeri non tossici per la cellula. Infine DOPAC copre un ruolo importante nella risposta agli aggregati di α -sinucleina, infatti oltre che potenzialmente inibirne la formazione di fibrille attraverso modificazioni alla struttura dell' α -sinucleina causerebbe delle variazioni strutturali che permetterebbero una riduzione nella produzione di composti citotossici e di ROS causati dalla presenza di aggregati proteici, oltre che potenzialmente favorire un assorbimento da parte di lisosomi delle strutture formate da α -sinucleina dopo l'interazione con DOPAC.

3. Materiale e Metodi

3.1 Trasformazione batteri

Questo step iniziale sarà fondamentale per lo svolgimento dell'esperienza poiché grazie a tecniche di ingegneria genetica si andrà a inserire il plasmide pT7-7 asyn E46K (Figura 1) all'interno di una popolazione di *E. Coli*, permettendo così di esprimere una tipologia di α -sinucleina con mutazione E46K. Per iniziare questo processo di trasformazione dei batteri sarà necessario inserire in una eppendorf una soluzione contenente i batteri di interesse e il plasmide, fatto ciò sarà richiesto di lasciare in ghiaccio per abbassare la temperatura per poi incubare la soluzione per 1 minuto a 42°C, causando così uno shock termico che permetterà al plasmide di inserirsi all'interno della popolazione batterica. Il cambiamento repentino di temperatura porterà appunto ad una destabilizzazione momentanea della membrana, favorendo la formazione di pori utili per il passaggio all'interno della cellula del plasmide. Terminata questa fase si potrà aggiungere terreno LB (senza antibiotico), per poi lasciarlo in un incubatore in agitazione per circa un'ora, permettendo così la replicazione del plasmide nelle cellule batteriche. Ottenuta questa soluzione contenente sia batteri trasformati con il plasmide, sia batteri in cui il plasmide non è riuscito ad inserirsi, sarà fondamentale iniziare una selezione poiché le cellule d'interesse si limitano ai batteri mutati e quindi quelli che possono essere utilizzati per l'espressione del mutante della α -sinucleina. Per poter riuscire in questo scopo verrà prelevato un quantitativo di batteri, i quali verranno piastrati in una piastra LB-Agar con ampicillina over week-end, rendendo così selettiva la crescita. La scelta di piastrare su un terreno con questo antibiotico è dovuta dalla resistenza conferita ai batteri mutati per la presenza della regione *AmpR* nel plasmide (Figura 1), ovvero una regione che conferisce resistenza all'ampicillina.

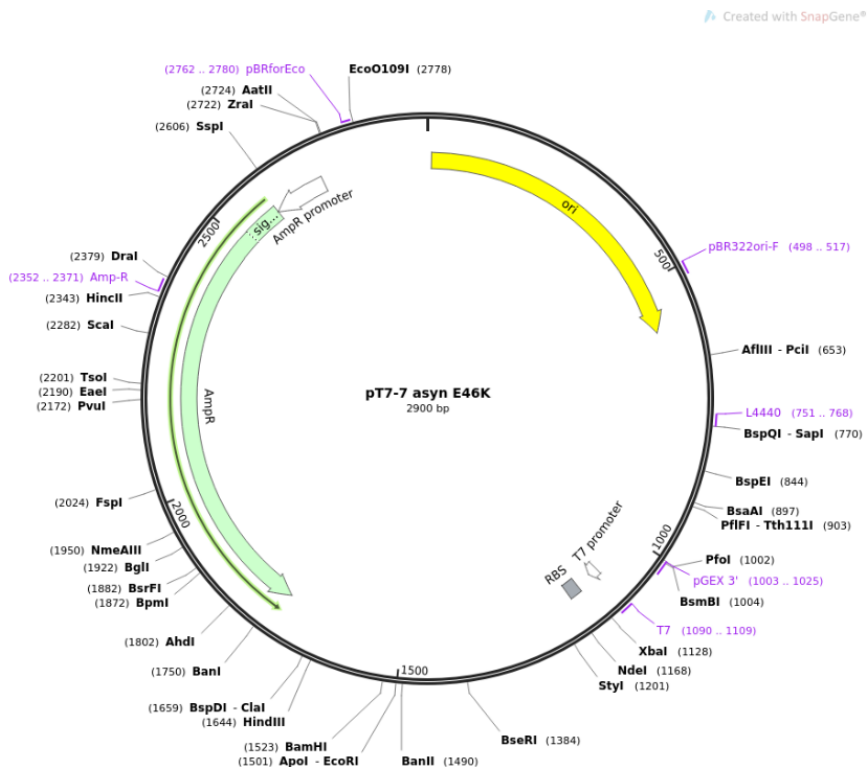


Figura 1: Plasmide Alpha-Synuclein pT7-7 E46K

3.2 Inoculo e induzione

Ottenuto così una selezione di esclusivamente cellule batteriche che presentano il plasmide di nostro interesse sarà possibile iniziare una fase di pre-inoculo, in cui si avrà la crescita di batteri trasformati, sempre in terreno LB, che successivamente saranno utilizzati per l'inoculo finale e l'induzione dell'espressione della α -sinucleina. Terminato il pre-inoculo si può procedere con l'inoculo terminale, nel quale avremo il trasferimento e l'incubazione in agitazione dei batteri mutati all'interno di beute con terreno LB. Questo cambiamento di terreno comporterà una crescita notevole della popolazione batterica nelle beute e ciò permetterà il controllo della crescita dei batteri nelle sue diverse fasi attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro, infatti sarà necessario acquisire l'assorbanza durante la crescita dei batteri. Quando attraverso queste misurazioni verrà rilevata un'assorbanza a 600 nm di 0.6 si potrà procedere con l'induzione dell'espressione della α -sinucleina attraverso l'aggiunta di IPTG come induttore della replicazione in *E. Coli*.

3.3 Purificazione della proteina

Attendendo alcune ore dall'aggiunta di IPTG si raggiungerà una produzione di α -sinucleina all'interno delle cellule batteriche sufficiente da poter iniziare il processo di purificazione e per riuscire in tale scopo verranno utilizzate diverse tecniche. La prima impiegata permetterà la separazione delle cellule dal terreno di coltura, questo avverrà per mezzo di una centrifugazione, al termine della quale si avrà la formazione di un pellet contenente le cellule batteriche mentre il surnatante conterrà esclusivamente il terreno di coltura. Eliminato quest'ultimo sarà necessario risospendere il pellet per continuare il processo. Per la sospensione si prevederà l'aggiunta di una soluzione di *Osmotic Shock Buffer*, la quale porterà a un danneggiamento della membrana cellulare causando la formazione di pori, pertanto sfruttando l'utilizzo di una centrifugazione sarà possibile differenziare in soluzione composti citoplasmatici fuoriusciti dalle cellule batteriche e un pellet contenente batteri con all'interno α -sinucleina. Eliminato il surnatante avverrà l'aggiunta di una soluzione per la risospensione del pellet cellulare, in particolare tale soluzione conterrà anche $MgCl_2$, il quale renderà permeabile la membrana delle cellule batteriche permettendo la fuoriuscita delle proteine contenute. Dopo una breve incubazione in ghiaccio si procederà con un'ulteriore centrifugazione, portando alla separazione tra i composti proteici, in soluzione, e le cellule, in un pellet. Infine il surnatante ottenuto verrà sottoposto ad un aggiustamento del pH, una fase di bollitura e una centrifugazione per estrarre dal campione la α -sinucleina disciolta.

3.4 Precipitazione e dialisi

Ricavata la sinucleina in una soluzione più pura, sarà necessario eliminare ulteriori proteine che potrebbero inquinare il campione, per tale ragione alla soluzione verranno aggiunti in agitazione 194 g/L di $(NH_4)_2SO_4$ (s). Questo sale permetterà il sequestro da parte del sale di molecole d'acqua, andando così a modificare le interazioni tra le proteine in soluzione e il solvente permettendo la precipitazione di alcuni composti proteici. Attraverso centrifugazione della soluzione sarà possibile ottenere un surnatante più selettivo e ripetendo questo processo modificando ulteriormente la concentrazione salina, infatti verranno aggiunti ulteriori 118 g/L di $(NH_4)_2SO_4$ (s), sarà possibile ottenere un pellet contenente sinucleina. Per un'ulteriore eliminazione di proteine superflue dovrà essere

eseguita una doppia centrifugazione e recuperando il pellet contenente la proteina sarà necessario risospenderla in un tampone di Tris-HCl pH 8. La soluzione ottenuta sarà trasferita in una membrana da dialisi con un cut-off di 3,5 kDa, permettendo così di utilizzare il principio della dialisi per l'eliminazione dei sali inseriti precedentemente e anche eventuali proteine con peso molecolare inferiore a 3,5 kDa. Per ottimizzare questo processo si dovrà utilizzare un volume di dialisi notevolmente maggiore rispetto al volume di soluzione inserito nella membrana e inoltre, per migliorare la resa, è necessario cambiare più volte il volume di tampone in cui la membrana verrà inserita.

3.5 FPLC a scambio ionico

Attraverso le metodologie applicate precedentemente si otterrà un campione contenente prevalentemente sinucleina e una piccola concentrazione di sali e di altre proteine con caratteristiche simili, compresi anche eventuali isomeri della stessa sinucleina. Utilizzando come ulteriore metodo di purificazione un'analisi FPLC con una colonna a scambio ionico (AKTA Resorce Q da 6 ml) si potranno sia eliminare i sali dalla soluzione, eluiti all'inizio della corsa, sia altre proteine non corrispondenti a quella d'interesse. L'utilizzo di questa tecnica analitica si basa sul principio di affinità per carica, pertanto dovrà essere sempre specificata la tipologia di colonna utilizzata. Per questa analisi sarà impiegata una colonna per uno scambio ionico, ovvero la colonna sarà dotata di cariche negative che interagiranno con i componenti carichi positivamente del campione, formando legami ionici con tali gruppi. La formazione di tali interazioni sarà fondamentale poiché queste verranno utilizzate per bloccare le proteine sulla matrice della colonna, permettendo l'eluizione di sali o di altre proteine che non avranno formato alcuna interazione di carica. Essendo la FPLC uno strumento che utilizza 2 pompe sarà possibile programmare in modo indipendente l'una dall'altra, questa caratteristica è fondamentale poiché in questo strumento verranno utilizzati 2 buffer diversi per la stessa corsa, il primo tampone denominato "buffer A" sarà una miscela di Tris-HCl 20mM pH8, mentre il secondo tampone denominato "buffer B" consiste in una soluzione di Tris-HCl 20mM pH8 + NaCl 500mM. Il buffer A avrà la stessa composizione del buffer in cui verrà inserito il campione una volta sottoposto ad una ulteriore filtrazione che utilizzerà un filtro Millex®-PVDF per siringa, con il filtrato così ottenuto sarà possibile iniziare le analisi in FPLC. Per iniziare la soluzione sarà diluita 1:5 con il buffer A, permettendone così l'inserimento direttamente nello strumento e l'inizio della corsa, all'inizio della quale sarà presente esclusivamente il flusso del buffer A mentre il buffer B avrà un flusso nullo. Questa differenza permetterà di eluire, come spiegato in precedenza, tutti i composti che non formeranno interazioni con la matrice e una volta terminato il lavaggio della colonna le proteine di nostro interesse avranno formato legami con gli anioni della matrice. Per il distacco dalla colonna di α -sinucleina si andrà a modificare il flusso del buffer B, in tal modo si avrà un graduale aumento di flusso del buffer e pertanto anche di concentrazione, comportando delle variazioni delle interazione tra matrice e campione. Queste modifiche causeranno la rottura dei legami ionici in modo selettivo, iniziando da quelli con forza minore, pertanto per permettere il riconoscimento e la raccolta della frazione di interesse verrà utilizzato una lampada che misurerà in tempo reale l'assorbanza del campione in uscita dalla colonna. In particolare avendo impostato come flusso d'uscita 1 ml/minuto la frazione che verrà raccolta corrisponderà alla sinucleina effluita dallo strumento tra il 39° e il 42° minuto, corrispondenti a 39 ml e 42 ml di volume, favorendo così la selezione di un

campione ancora più puro poiché con l'impiego di questo strumento si elimineranno tutti i sali residui, eluiti all'inizio della corsa, ed eventuali composti proteici che fossero rimasti nel campione inserito in FPLC.

3.6 Stato di aggregazione T0, T48, T168

Avendo ottenuto un campione contenente sinucleina pura, attraverso i metodi di purificazione precedentemente trattati, sarà possibile applicare ulteriori metodi di analisi per valutare lo stato di aggregazione della sinucleina in condizioni denaturanti a diversi tempi di riferimento, valutandone sia le caratteristiche in assenza sia in presenza di DOPAC. Per questa analisi infatti il campione dovrà essere diviso in due eppendorf, una contenente α -sinucleina (*Syn*) e una contenente sia α -sinucleina sia DOPAC (*Syn/DOPAC 1:5*), in quest'ultima si andrà ad inserire un quantitativo di DOPAC tale da ottenere un rapporto sinucleina-DOPAC pari a 1:5. Ottenuto questi due campioni sarà necessario collezionare piccole frazioni del campione al tempo 0 (*T0*), dopo 48 ore (*T48*) e dopo 168 ore (*T168*) dalle eppendorf inserite in un thermomixer, permettendo così la valutazione dello stato di sinucleina attraverso l'utilizzo di diversi metodi di analisi.

3.6.1 Thermomixer

Questo strumento è composto principalmente da un thermoblock con pozzetti ideati per l'inserimento di eppendorf, tale thermoblock oltre che ospitare le fiale contenenti il campione svolge una funzione fondamentale per la denaturazione del composto. Infatti questo componente può essere riscaldato a una data temperatura per tutta la durata del processo, rendendo più specifica la denaturazione del campione e permettendo un controllo migliore di questa fase. Oltretutto il thermomixer è utilizzato anche per garantire una agitazione prolungata a un determinato rpm, favorendo anche l'aggregazione del campione. Per queste ragioni una volta inserito nel thermoblock i campioni e programmato lo strumento inizierà il processo di aggregazione e di denaturazione, inoltre per aumentare l'isolamento del campione da possibili variabili esterne è possibile inserire tra il coperchio trasparente del thermomixer e il thermoblock un foglio di alluminio, così da ovviare a possibili alterazioni dovuta all'esposizione prolungata della proteina alla luce.

3.6.2 Dicroismo Circolare

Il Dicroismo Circolare (CD) è un metodo ampiamente usato per l'analisi di composti proteici che caratterizza la struttura secondaria del campione sfruttando la spettroscopia. Utilizzando questo metodo sarà possibile valutare il cambiamento strutturale della proteina in varie condizioni sia di denaturazione sia di aggregazione, pertanto confrontando lo spettro risultante dalla misurazione del campione con uno standard (Figura 2) sarà possibile ricostruire quale struttura secondaria sia predominante nell'organizzazione della proteina in analisi. Il dicroismo circolare è una tecnica analitica utilizzata sia per l'analisi di campioni proteici sia di acidi nucleici, andando in entrambi i casi a fornire informazioni sulla struttura secondaria del campione. Per quanto concerne le proteine il CD andrà ad analizzare la presenza di legami peptidici e in particolare gli andrà a caratterizzare in base all'assorbimento di radiazioni polarizzate, rendendo caratteristico il grafico per ogni struttura secondaria. Il principio alla base dell'utilizzo di un fascio di luce polarizzata consiste nel

rilevare le differenze di assorbimento da parte del campione dei due raggi polarizzati, destroso e sinistroso, usati per l'analisi. L'assorbimento del campione di questi raggi causa una modifica della luce uscente tale per cui si avrà una luce ellitticamente polarizzata dipendente dalla differenza tra i *coefficienti di estinzione* (ϵ) del fascio destroso e sinistroso. Il coefficiente di estinzione consiste in un valore che definisce la densità ottica di una sostanza, normalmente utilizzato a concentrazione unitaria e con un cammino ottico di 1 cm. Tale valore può o essere già noto oppure può essere calcolato, a condizione che si conosca l'esatta composizione amminoacidica del campione proteico. Il calcolo può essere svolto sia attraverso siti specifici, come Expasy - ProtParam tool, sia più semplicemente con la formula seguente (1).

$$\epsilon_{280} = N_{trp} * 5500 + N_{tyr} * 1490 + N_{cys} * 125 \quad (1)$$

Attraverso questi strumenti si può ricavare pertanto il valore di ϵ di una data proteina a 280 nm, lunghezza d'onda caratteristica in cui si avrà l'assorbanza dei residui di triptofano, tirosina e una debole influenza di ponti disolfuro dovuti alla presenza di cisteine. Per l'utilizzo di questa tecnica nell'analisi di acidi nucleici non si andrà a calcolare l'assorbimento dei legami peptidici, ma l'assorbanza dovuta alla presenza di basi pirimidiniche e puriniche. Attraverso l'analisi di un campione di acidi nucleici si può pertanto ricostruire la struttura del campione preso in analisi, infatti come mostrato dal grafico (Figura 2), si è riusciti a calcolare anche per il DNA e l'RNA degli standard.

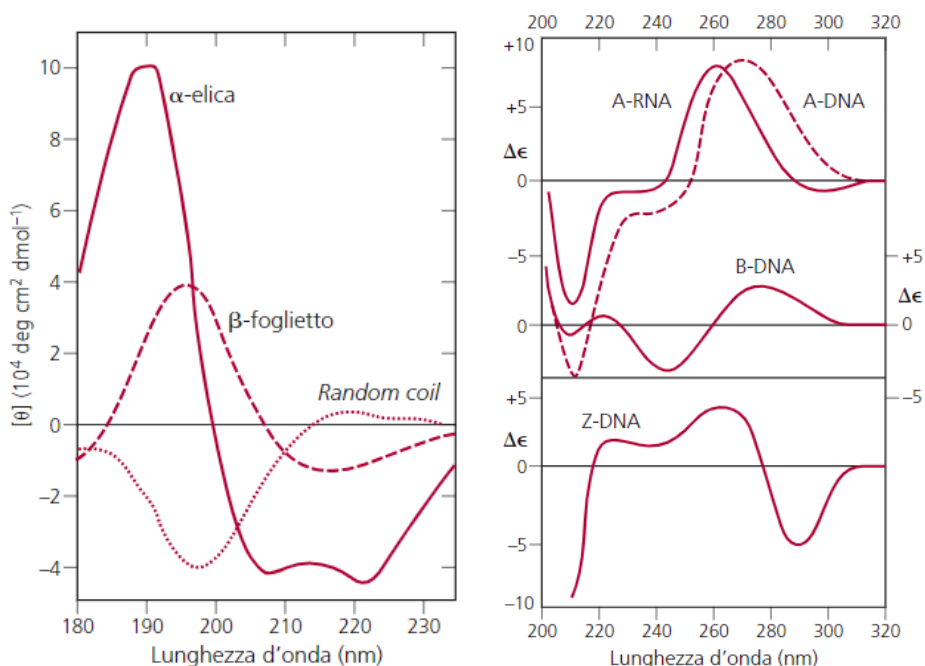


Figura 2: Immagine tratta dal libro "Metodologie biochimiche" di M.C. Bonaccorsi di Patti, R. Contestabile, M.L. Di Salvo, Ed Zanichelli. A sinistra sono rappresentati i rispettivi spettri CD dei legami peptidici delle diverse strutture secondarie, mentre a destra sono raffigurati gli spettri CD degli acidi nucleici.

3.6.3 UV-Vis

L'utilizzo come metodo di analisi dell'UV-Visibile (UV-Vis) può essere applicato sia per analisi qualitative sia per analisi quantitative come il calcolo della concentrazione del campione, in particolare lo strumento non darà come risultato il valore esatto della concentrazione proteica ma restituirà all'operatore un grafico dell'assorbanza tra $\lambda=240$ nm e $\lambda=350$ nm. Tali valori ricavati con questa analisi saranno utilizzati per ricavare la concentrazione proteica attraverso la formula inversa della "Legge di Lambert-Beer" (2).

$$\text{Legge di Lambert – Beer: } A = \varepsilon * l * C \quad (2)$$

In questa formula per il calcolo dell'assorbanza sarà necessario conoscere ε (*coefficiente di assorbimento molare*), l (*cammino ottico della cuvetta*) e C (*concentrazione del campione*). Pertanto dalla formula iniziale (2) si può ottenere la formula inversa (3), utilizzata per il calcolo della concentrazione avendo ottenuto con un'analisi UV-Vis l'assorbanza del campione.

$$\text{Formula calcolo concentrazione generale: } C = \frac{A}{\varepsilon * l} \quad (3)$$

Ottenuto così la formula per il calcolo della concentrazione sarà possibile calcolare la concentrazione proteica, tuttavia l'assorbanza (A) utilizzata nella formula (3) in realtà sarà ottenuta da un'ulteriore calcolo. Infatti per ottenere un valore più reale di concentrazione si andrà a sottrarre dall'assorbanza ottenuta a $\lambda=280$ nm il valore di A a $\lambda=350$ nm, eliminando così ulteriori interazioni di base tra il buffer e lo strumento. Pertanto la formula seguente (4) sarà la reale formula utilizzata nell'analisi per il calcolo della concentrazione proteica.

$$\text{Formula calcolo concentrazione: } C = \frac{A_{280} - A_{350}}{\varepsilon * l} \quad (4)$$

3.6.4 ThT

La ThT corrisponde ad una analisi con Tioflavina T, ovvero un sale utilizzato nelle analisi per lo stato di aggregazione di composti proteici data la sua caratteristica intrinseca di emettere fluorescenza se legata a strutture β -sheet, struttura predominante negli aggregati fibrillari. Questa sua peculiarità ne permette l'utilizzo in diversi studi, infatti è una tecnica ampiamente utilizzata nell'analisi dello stato di aggregazione di α -sinucleina, la quale in caso di formazione di fibrille amiloidi favorirà lo sviluppo di patologie neurodegenerative a discapito della formazione di oligomeri, struttura che non comporta lo sviluppo di neurotossicità. La sua fluorescenza è dovuta dalla formazione di legami tra la Tioflavina T e le proteine poiché questo sale durante la formazione di aggregati si intercalerebbe nella struttura proteica e questo comporterebbe una modificazione conformazionale causando la fluorescenza del sale, permettendo sia di identificare se sia avvenuta la formazione di fibrille sia il possibile calcolo della concentrazione.

3.6.5 SDS-PAGE

Elettroforesi in SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) corrisponde a una tecnica di differenziamento attraverso denaturazione delle proteine del campione. Questa tecnica si basa sul rapporto peso/carica impiegando una matrice a carica negativa, infatti attraverso la matrice ogni proteina coprirà una lunghezza di percorso diversa dalle altre. Questo differenziamento di percorso si basa sulla caratteristica che le proteine con peso molecolare minore riusciranno a districarsi nella matrice del gel con più facilità di altre proteine con peso maggiore. Questa tecnica presenta un vantaggio notevole rispetto ad altre tecniche analitiche, ovvero presenta la possibilità di lavorare con frazioni multiple del preparato e utilizzando un marker con peso specifico sarà possibile ricavare il peso di alcune proteine all'interno del campione. Tali pregi permettono l'utilizzo di SDS sia come tecnica di controllo dello stato del campione, valutando anche se le lavorazioni precedenti del campione sono risultate efficaci, sia a svolgere un ruolo di identificazione, tuttavia non specifico, del peso molecolare delle proteine in analisi. Durante la preparazione del gel si differenziano due gel diversi, il primo gel corrisponde allo *stacking gel* a pH 6,8 necessario per la formazione di un'interfaccia tra i due gel, favorendo così la concentrazione dei campioni inseriti nei vari pozzetti allo stesso livello; il secondo ha il ruolo più importante nella separazione dei campioni caricati nel gel, infatti questo viene identificato come *running gel* a pH 8,8 e svolge appunto il ruolo di separare in base al peso e alle cariche le proteine contenute nel campione, favorendo la corsa dei composti proteici con peso minore. Entrambi i gel avranno la stessa composizione tuttavia la differenza tra questi non è limitata al loro pH ma sarà influenzata anche dalla diversa concentrazione dei vari composti. Il principio alla base di questa tecnica analitica corrisponde all'attrazione delle proteine al catodo, queste infatti avranno una carica negativa conferitagli dai detergenti presenti nella soluzione, in particolare la carica delle singole proteine sarà proporzionale alla loro massa. Ulteriore fattore fondamentale per la riuscita di questa tecnica corrisponde al tampone di corsa ossia Tris-glicina a pH 8,3 e al sample buffer. Il campione di corsa contiene glicina non a caso, infatti nell'utilizzo dei due gel a pH diversi si avrà una discontinuità di corsa anche della glicina poiché avrà una mobilità minore nello *stacking gel* rispetto al *running gel*. All'interno dello *stacking gel* si avranno anche ioni Cl⁻ i quali una volta attivato il flusso di corrente migreranno velocemente verso il catodo, portando alla formazione di un gradiente di voltaggio che modifica la mobilità della glicina e ciò consentirebbe la concentrazione delle proteine. Nel *running gel* la mobilità della glicina aumenta notevolmente e pertanto le proteine libere potranno iniziare a correre nella matrice del gel. Il sample buffer utilizzato dovrà necessariamente contenere anche un forte agente riducente, il quale verrà utilizzato per la rimozione di ponti disolfuro inter/intramolecolari e inibire l'eventuale riformazione.

4. Risultati

4.1. Analisi mediante FPLC

Attraverso l'analisi attuata in FPLC sarà possibile differenziare ulteriormente il campione in frazioni contenenti composti proteici diversi, utilizzando come metodo di selezione un'interazione ionica tra la matrice e il campione. Il grafico (Figura 3) ottenuto in output dallo strumento evidenzia, oltre le tracce iniziali di sali, la presenza di piccole concentrazioni di o proteine o di peptidi residui dalle analisi precedenti, tuttavia si ottiene un'elevata concentrazione proteica dopo una eluizione di un volume pari a 39ml, riconducibile al volume di eluizione della sinucleina per sostituzione con il buffer B della sua interazione con la matrice. Infine è possibile riscontrare un picco identificato dopo un volume di 43 ml, possibilmente riconducibile a una forma dimerica della sinucleina.

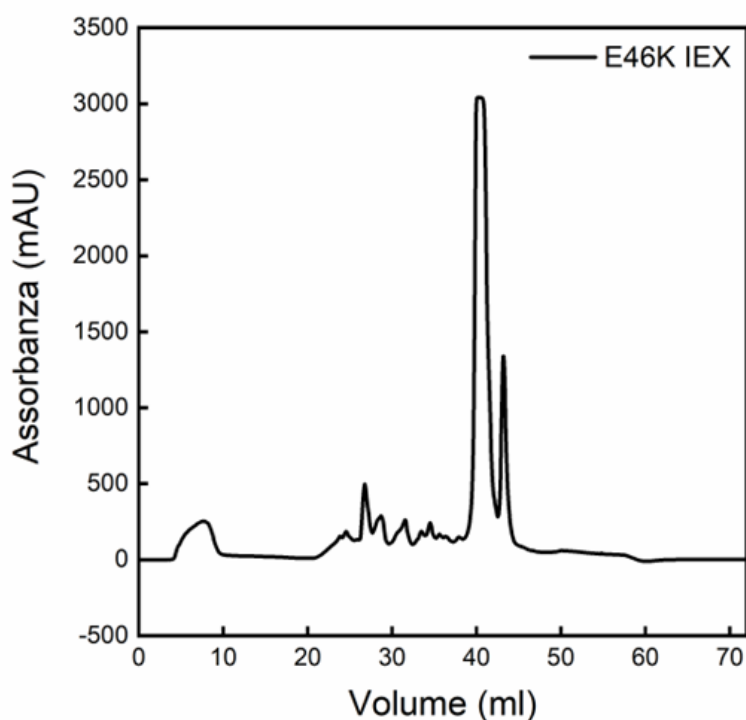


Figura 3: Grafico FPLC del campione proteico post precipitazione e dialisi. Il flusso impiegato in questa analisi corrisponde a $1 \text{ ml}/\text{min}$.

4.2. Analisi mediante SDS-PAGE

SDS-PAGE è stato utilizzato come metodo per la valutazione di purezza del campione durante le varie fasi del processo, fino all'ottenimento di un campione contenente α -sinucleina pura. Le frazioni del campione sono state caricate in ordine temporale per facilitare a livello visivo un miglioramento nelle bande, infatti leggendo da sinistra verso destra avremo un caricamento su 2 gel dei due marker molecolari, uno per gel, e rispettivamente 13 frazioni di campione prelevate in varie vasi del processo. Data l'impossibilità di avviare la corsa in presenza di pozzetti vuoti sarà necessario riempire i 5 pozzetti mancanti con lo stesso volume inserito negli altri di sample buffer, per tale ragione le bande 1-9-10-11-20 risulteranno vuote. Nelle prime fasi si avrà una notevole impurezza nel campione data la presenza di una grande quantità di proteine batteriche nei campioni, solamente dopo la fase di salting-out applicata al campione caricato nel pozzetto 16 si nota un maggiore miglioramento nella qualità del contenuto proteico, inoltre paragonando la banda con le successive si denota una netta differenza nel pool proteico del campione caricato. La presenza di una sola linea nella banda 18 predominante suggerisce che l'utilizzo di FPLC è stata efficace nella selezione della frazione contenente una proteina. Confrontando le bande 18 e 2/12, contenenti il marker, si può ipotizzare un peso molecolare della proteina isolata, poiché avendo utilizzato un marker a basso peso molecolare sarà possibile identificare più semplicemente un possibile peso molecolare. All'interno del marker le proteine con kDa minore sono rispettivamente *Aprotinina* (6,5 kDa) e *α -Lactoalbumina* (14,2 kDa), pertanto queste saranno rispettivamente le proteine che riusciranno a compiere un percorso maggiore nel gel, in particolare dato il peso molecolare minore l'aprotinina sarà la penultima linea contenuta nella banda dei marker. A livello sperimentale da sottolineare l'esclusione dell'ultima linea del marker, questa infatti non rappresenterebbe nessuna proteina ma esclusivamente un raggruppamento del colorante dovuto al limite inferiore del gel. Confrontando quindi la banda del marker e la banda 18 si denota una vicinanza tra il marker dell' α -lactoalbumina (14,2 kDa) e la proteina, pertanto analizzando il peso molecolare della α -sinucleina si ricava un valore intorno ai 14 kDa e questo confrontato con quanto ricavato dall'analisi con SDS-PAGE indica con ottima probabilità che la linea singola, contenuta nella banda 18, corrisponde alla proteina richiesta.

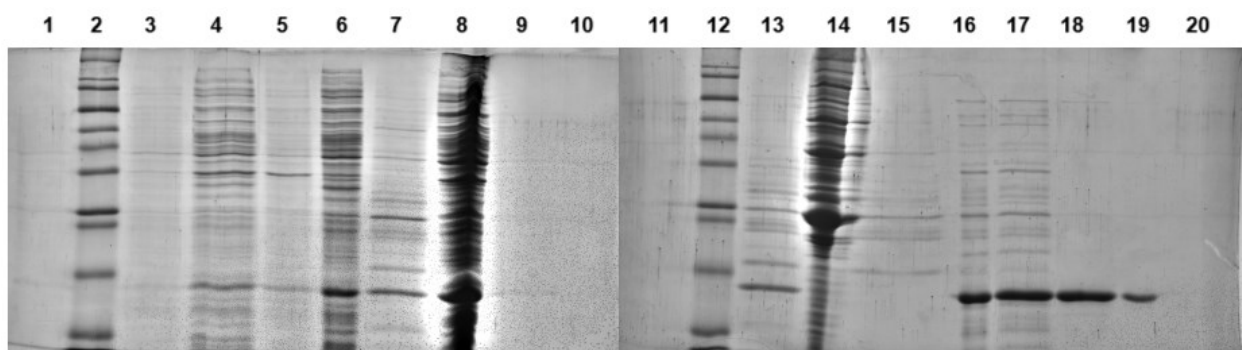


Figura 4: SDS-PAGE dei vari step di purificazione della α -sinucleina. La quantità di caricato per campione corrisponde ad un volume di 5 μ L per ciascun pozzetto. Banda 2 e 12: low molecular weight marker. Banda 1) Sample Buffer; Banda 3) Batteri pre-IPTG; Banda 4) Batteri post-IPTG; Banda 5) Surnatante prima dell'aggiunta di $MgCl_2$; Banda 6) Pellet risospeso dopo l'aggiunta $MgCl_2$; Banda 7) Surnatante ottenuto dalla centrifuga; Banda 8) Pellet dopo centrifugazione; Banda 9) 10) 11) Sample Buffer; Banda 13) Surnatante ottenuto dalla centrifuga dopo bollitura; Banda 14) Pellet ottenuto dalla centrifuga dopo bollitura; Banda 15) Surnatante dopo salting-out; Banda 16) Pellet risospeso dopo salting-out; Banda 17) Post-dialisi; Banda 18) Post-FPLC; Banda 19) Post-dialisi on night; Banda 20) Sample buffer

4.3. Analisi mediante UV-vis

Dell'analisi attuata l'utilizzo di questa tecnica è stata limitata ad una analisi quantitativa del campione per il calcolo della concentrazione proteica, informazione necessaria per alcune tecniche e processi applicati successivamente a questa analisi, in particolare verrà utilizzata la formula (4), precedentemente citata, per questo calcolo. Dai grafici ottenuti per l'analisi quantitativa di vari campioni contenenti solo composti proteici si è riusciti facilmente a ricavare la concentrazione dei rispettivi campioni, tuttavia l'analisi del grafico (Figura 5) di sinucleina (*Syn*) confrontata con il grafico di sinucleina in presenza di DOPAC (*Syn + DOPAC*) presenta una notevole differenza. Tale differenza si potrebbe ricondurre all'utilizzo di un campione contenente erroneamente una concentrazione maggiore rispetto a quello composto esclusivamente da sinucleina, ciò però non sarebbe possibile poiché la concentrazione proteica dei campioni utilizzati in queste analisi si discostavano di valori non rilevanti. Per giustificare questo risultato ci si concentra su DOPAC analizzandone ulteriormente la struttura stessa, da questa si può notare la presenza di un anello aromatico, il quale presenta un picco di assorbimento nelle analisi UV-Vis anch'esso ai 280 nm. La differenza nell'assorbanza rilevata dovuta all'interferenza causata da questo anello aromatico non corrisponde l'esatto risultato della la somma tra assorbanza degli amminoacidi aromatici della sinucleina e gruppo aromatico della DOPAC. Pertanto l'utilizzo di questa tecnica si limiterebbe all'analisi quantitativa di campioni contenenti esclusivamente proteine, come sinucleina, e non in caso di ulteriori molecole con gruppi aromatici che ne causerebbero interferenza, come DOPAC. In conclusione questo disturbo nella rilevazione dell'assorbanza corretta causa un effetto amplificativo dell'assorbanza a 280 nm rendendo così inefficace questa tecnica per un'analisi quantitativa.

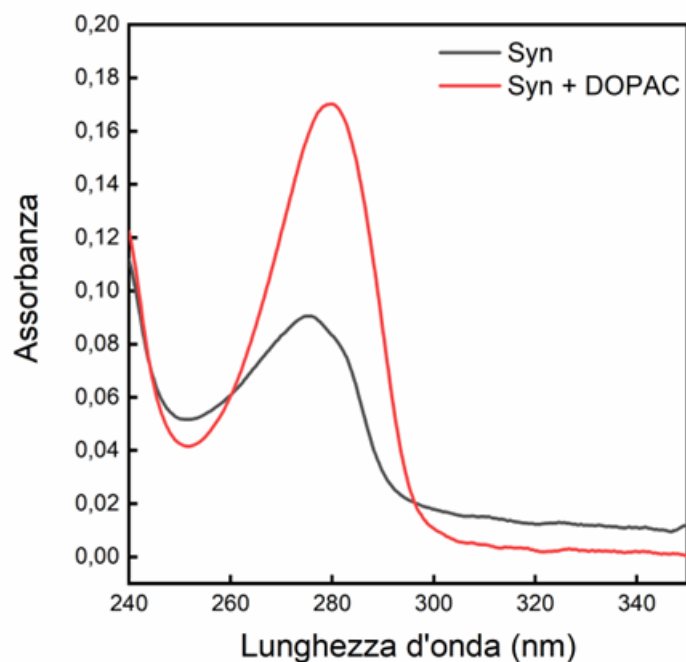


Figura 5: Confronto analisi campione contenente α -sinucleina (*Syn*) e α -sinucleina con DOPAC (*Syn+DOPAC*) attraverso analisi con UV-Vis

4.4. Analisi mediante CD

L'utilizzo di questo strumento ha permesso lo sviluppo dei grafici (Figura 4), presi in analisi. Questi risultati denotano una differenza importante in presenza di DOPAC rispetto all'assenza di questa nella struttura secondaria della proteina, infatti eseguendo un confronto tra i grafici ottenuti dall'analisi CD (Figura 6) e lo standard (Figura 2) si evidenzia come la α -sinucleina (*Syn*) in assenza di DOPAC andrà a mutare la sua struttura random coil, favorendo la formazione di conformazioni neurotossiche. Al contrario il grafico ottenuto nel campione di α -sinucleina con DOPAC in rapporto 1:5 (*Syn/DOPAC 1:5*) sottolinea come, nonostante anche questo campione sia stato esposto allo stesso trattamento denaturante e di aggregazione, la presenza di DOPAC ha svolto un ruolo importante nel mantenimento della struttura secondaria della proteina. Con il secondo campione (*Syn/DOPAC 1:5*) infatti si nota che nonostante le fluttuazioni nei valori di ellitticità viene mantenuta una struttura costante, simile alla struttura random coil standard (Figura 2).

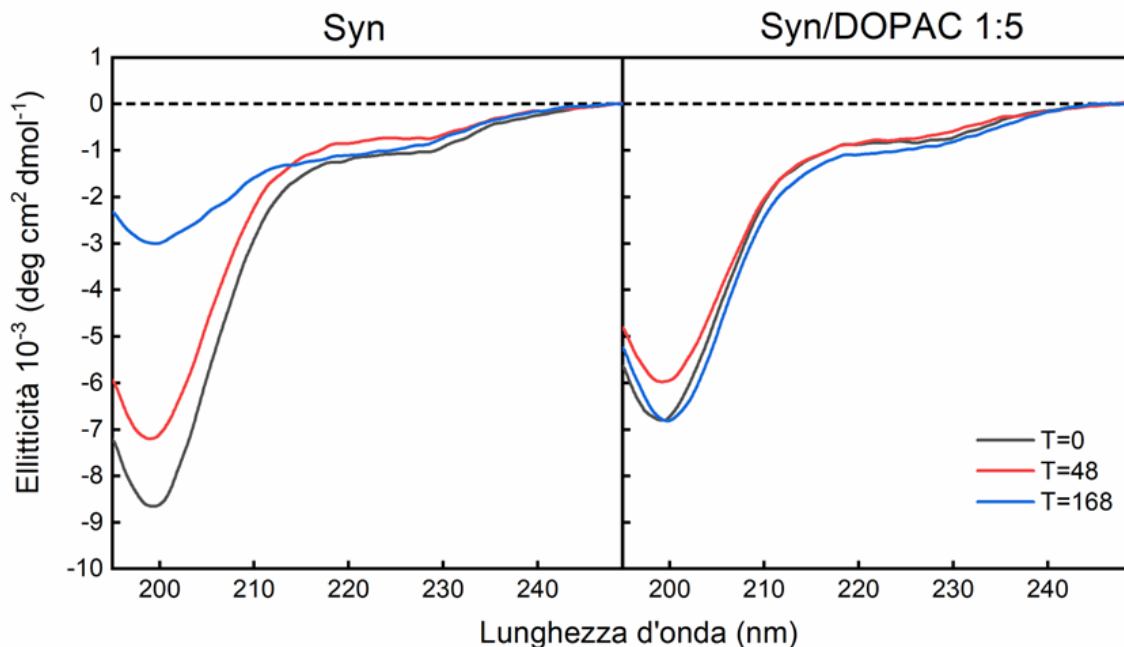


Figura 6: Confronto tra risultati ottenuti dall'analisi CD di α -sinucleina (*Syn*) e α -sinucleina con DOPAC (*Syn/DOPAC 1:5*), utilizzando frazioni di campioni mantenuti in condizioni denaturanti e in agitazione per tempi diversi (0, 48, 168 ore).

4.5. Saggio della Tioflavina T (ThT)

Essendo una tecnica di misurazione indiretta dello stato di fibrillazione del campione sarà possibile quantificare la fluorescenza del campione, permettendo così di ricondurre lo stato della proteina in base all'intensità emessa dal campione. Studiando con questa tecnica i campioni di α -sinucleina sia in presenza di DOPAC (*Syn/DOPAC 1:5*) sia in assenza (*Syn*) si sono ottenuti i seguenti grafici (Figura 7). Da questi si possono confrontare i due risultati ottenuti e attraverso questo saggio con ThT si nota una notevole differenza nello stato di aggregazione della proteina, infatti in presenza di DOPAC la α -sinucleina riscontra maggiore difficoltà nella formazione di strutture fibrillari rispetto in sua assenza. Nonostante ciò la sinucleina in agitazione e in condizioni denaturanti può ricorrere in formazioni di oligomeri, tuttavia in questi la Tioflavina T non riuscirà ad intercalarsi e pertanto anche se si presenteranno modificazioni nella struttura proteica non si avrà la formazione di fibrille, fattore importante nello sviluppo di patologie, al contrario degli oligomeri di α -sinucleina non ancora considerati fattori di sviluppo per condizioni patologiche delle malattie neurodegenerative.

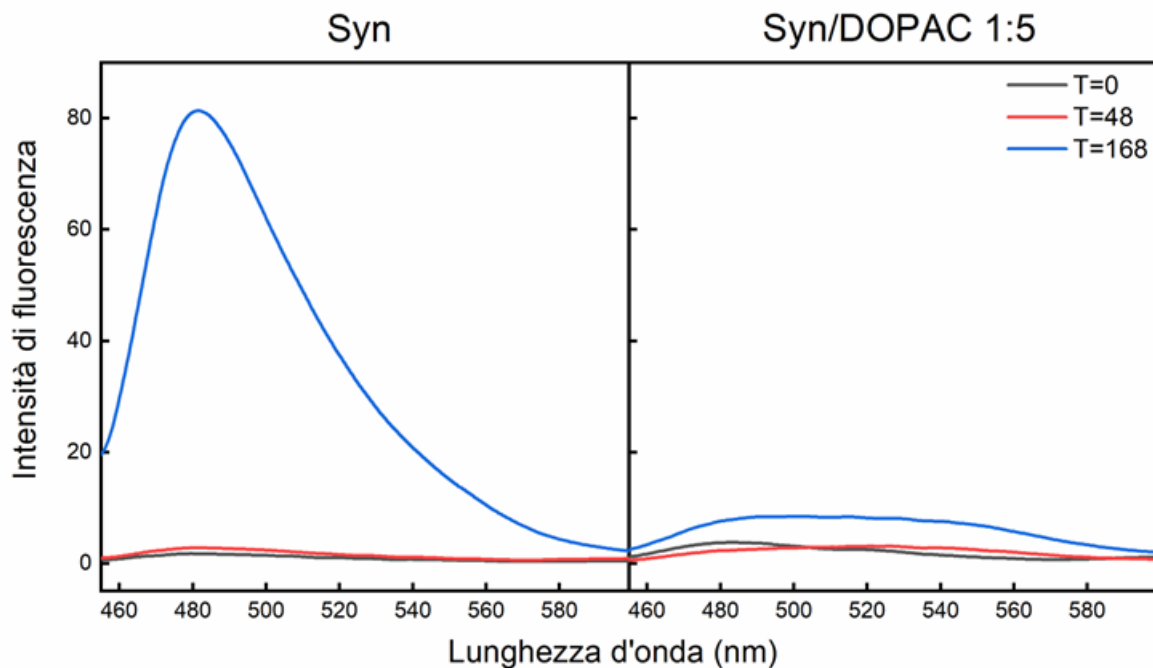


Figura 7: Analisi attraverso spettroscopia e confronto dello stato di interazione tra α -sinucleina e ThT, in presenza di DOPAC (*Syn/DOPAC 1:5*) e in assenza (*Syn*). Vengono impiegate diverse frazioni dello stesso campione raccolte in tempi diversi (0, 48, 168 ore), mantenendo sempre il campione in condizioni denaturanti e in agitazione.

5. Conclusione

Completando con successo il processo di sintesi e di purificazione si è ottenuto un campione contenente α -sinucleina isolata, tale proteina viene analizzata attraverso le varie tecniche per valutare la sua interazione con DOPAC in diverse condizioni e verificare quanto l'interazione con α -sinucleina porterebbe ad una variazione nella struttura secondaria. Tra le varie metodologie applicate i risultati più chiari sono stati ottenuti tramite l'utilizzo di spettroscopia per il saggio della ThT e anche per la valutazione della struttura secondaria attraverso il dicroismo circolare. Da questi risultati infatti si denota una alterazione non indifferente nella struttura della α -sinucleina in presenza di DOPAC, in particolare questa modificherebbe la struttura secondaria andando a diminuire la possibilità di formazione di aggregati della proteina e quindi diminuendo la possibilità di formazione di fibrille. In particolare DOPAC consentirebbe una maggior stabilizzazione nel tempo della struttura di α -sinucleina, ovviando alla possibilità che questa degeneri in una struttura β -sheet. Le analisi attuate tuttavia non dimostrano come avviene l'interazione tra DOPAC e α -sinucleina, infatti rappresentano solamente analisi atte a scoprire se la presenza del derivato dopaminergico porterebbe o meno allo sviluppo di conformazioni fibrillari. Dimostrato che tale interazione esiste, sarà opportuno approfondire attraverso ricerca su articoli scientifici come la DOPAC influenza la struttura di α -sinucleina e in particolare come questa porta alla formazione di complessi non patologici. Alcuni studi dedicati all'approfondimento di questa interazione hanno portato alla dimostrazione della capacità dei composti contenente *1,2-diidrossibenzene* nella inibizione della formazione di fibrille di α -sinucleina, gruppo chimico presente sia in DOPAC sia in altri composti dopaminergici, soggetti di ulteriori studi appunto per la loro capacità di interagire con α -sinucleina e inducendone la formazione di dimeri o trimeri. Soffermandosi in particolare sulle interazioni molecolari tra DOPAC e α -sinucleina si sottolinea un dettaglio fondamentale, infatti DOPAC non modificherebbe la struttura secondaria della proteina ma ne causerebbe una modificazione chimica e fisica, la quale comporterebbe una inibizione della fibrillazione. La presenza di DOPAC infatti porta alla stabilizzazione di forme oligomeriche di α -sinucleina, in particolare a livello chimico si avrà un'ossidazione a livello dei residui di metionina e anche la formazione di legami covalenti che interesserebbero i residui di lisina delle catene laterali. Delle modifiche attuate da DOPAC alla struttura di α -sinucleina la modifica più rilevante consiste appunto nella ossidazione dei residui di metionina, questi infatti possono guidare la proteina alla formazione di oligomeri. In conclusione la presenza di DOPAC non andrà a modificare direttamente la struttura secondaria della α -sinucleina, ma porterà modifiche chimiche e fisiche che permetteranno l'aumento di probabilità di formazione di dimeri o trimeri, strutture che non porterebbero alla formazione di fibrille amiloidi e quindi non permettendo il deposito di α -sinucleina nei LB.

Bibliografia

1. Alpha-synuclein with E46K mutation, AddGene [pT7-7 asyn E46K]
2. Boyer DR, Li B, Sun C, et al. The α -synuclein hereditary mutation E46K unlocks a more stable, pathogenic fibril structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(7):3592-3602. doi:10.1073/pnas.1917914117
3. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(3):a024091. Published 2018 Mar 1. doi:10.1101/cshperspect.a024091
4. Fongaro B, Cappelletto E, Sosic A, Spolaore B, Polverino de Laureto P. 3,4-Dihydroxyphenylethanol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid affect the aggregation process of E46K variant of α -synuclein at different extent: Insights into the interplay between protein dynamics and catechol effect. *Protein Sci*. 2022;31(7):e4356. doi:10.1002/pro.4356
5. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*. 1988;8(8):2804-2815. doi:10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988
6. Palazzi L, Fongaro B, Leri M, et al. Structural Features and Toxicity of α -Synuclein Oligomers Grown in the Presence of DOPAC. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):6008. Published 2021 Jun 2. doi:10.3390/ijms22116008
7. Riccò M, Vezzosi L, Balzarini F, et al. Prevalence of Parkinson Disease in Italy: a systematic review and meta-analysis. *Acta Biomed*. 2020;91(3):e2020088. Published 2020 Sep 7. doi:10.23750/abm.v91i3.9443
8. Scheda UniProt α -Sinucleina [P37840 · SYUA_HUMAN]
9. Uversky VN. Alpha-synuclein misfolding and neurodegenerative diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 2008;9(5):507-540. doi:10.2174/138920308785915218
10. <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/malattie-neurologiche/disturbi-del-movimento-e-cerebellari/panoramica-sui-disturbi-del-movimento-e-cerebellari>

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare in primis la Prof.ssa Polverino De Laureto per avermi dato la possibilità di svolgere questa tesi nel suo laboratorio e in particolare sono molto grato per tutto l'aiuto fornitomi dalla Dott.ssa Inciardi, sia all'interno dell'ambiente laboratoriale sia nello sviluppo della tesi. Durante questo percorso sono cambiate moltissime cose, sia grazie all'università sia a causa del lavoro, tuttavia ci sono state delle persone che mi hanno sempre affiancato per quanto fossero pesanti e tediosi alcuni momenti. In particolare appunto vorrei ringraziare coloro che mi sono stati vicini nonostante mi fossi allontanato da tutti, per questo con voi vorrei anche scusarmi. Vorrei in particolare ringraziare i miei genitori per l'aiuto fornitomi, in particolare nel corso dell'ultimo anno, che mi ha permesso di potermi dedicare maggiormente allo studio e all'università. Sono davvero molto grato ai miei compagni dell'indirizzo farmaceutico del terzo anno, grazie ai quali avevo ritrovato la voglia e la forza di continuare questo percorso non come una gara dei singoli ma come un obiettivo comune e aiutandoci per riuscire a finire tutti insieme, o almeno provandoci. Infine ai miei amici e amiche della compagnia, a quelli di vecchia data e ad alcuni colleghi non so come esprimere quanto vi sia grato. I lunedì sera, i sushi della domenica, le serate passate a chiacchierare o a giocare insieme mi sono state tantissimo d'aiuto per staccare da molti pensieri, non solo inerenti all'università. Questi ultimi anni sono stati davvero pieni di emozioni, ricordi e cambiamenti, per questo spero che anche i prossimi, per quanto faticosi, saranno ancora così, insieme a voi.