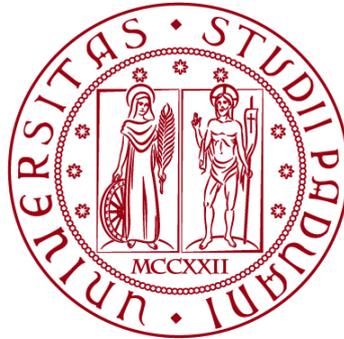


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Gli aggregati di α -sinucleina inducono ferroptosi:
interazione fra calcio, ferro e perossidazione lipidica**

**Tutor: Prof. Marco Bisaglia
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Beatrice Questori

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Abstract:

Con il termine sinucleinopatie si fa riferimento ad un insieme di patologie caratterizzate dal misfolding della proteina α -sinucleina, con conseguente formazione di aggregati ad azione neurotossica. Sempre più evidenze suggeriscono che la citotossicità indotta da questi aggregati risieda nelle protofibrille solubili formatesi nella fase iniziale del processo di aggregazione, ma i meccanismi con cui svolgono tale azione sono ancora poco compresi.

Nel presente elaborato viene analizzato un articolo nel quale vengono utilizzate iPSC per modellizzare le sinucleinopatie e indagarne i meccanismi. In particolare, nel lavoro preso in considerazione vengono studiate le proprietà di oligomeri solubili di α -sinucleina, formati endogenamente come conseguenza di un sovra-dosaggio del gene codificante la proteina, e il loro ruolo nell'indurre patogenesi. Nello specifico, è stata confermata la capacità degli oligomeri di aumentare la velocità di produzione di specie reattive dell'ossigeno, le quali hanno un ruolo diretto nell'alterare lo stato ossidativo dei lipidi di membrana. Nelle membrane perossidate vengono conseguentemente alterate alcune proprietà funzionali, e queste alterazioni inducono, tra le altre cose, la capacità di legare gli oligomeri. Questi oligomeri possono poi inserirsi nella membrana agendo come pori, alterandone la permeabilità agli ioni quali ad esempio il calcio, a seguito di stimoli depolarizzanti.

Infine, poiché la produzione di specie reattive dell'ossigeno è catalizzata dalla presenza di ferro, e poiché chelanti del ferro o inibitori della perossidazione lipidica comportano una riduzione nel livello di morte cellulare analoga a quella che è osservata anche in seguito all'aggiunta di inibitori della ferroptosi, i ricercatori suggeriscono che gli oligomeri portino a morte cellulare anche tramite ferroptosi.

INDICE

1. INTRODUZIONE

- 1.1 α -Sinucleina: struttura e ruolo nella patogenesi della Malattia di Parkinson
 - 1.1.1 Oligomeri di α -sinucleina e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)
 - 1.1.2 Le protofibrille che si inseriscono in membrana agiscono come pori
 - 1.1.3 Effetti indotti dagli oligomeri di α -sinucleina a livello mitocondriale
 - 1.1.4 Il ruolo degli oligomeri di α -sinucleina nella perossidazione lipidica
 - 1.1.5 Legame tra protofibrille e Ca^{2+} intracellulare
 - 1.1.6 Relazione tra oligomeri di α -sinucleina e ferroptosi

2 MATERIALI E METODI

- 2.1 Generazione iPSC
 - 2.1.1 Differenziamento a neuroni dalle iPSC
- 2.2 Rilevamento della fluorescenza con live-imaging
 - 2.2.1 Misurazione di $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tramite Fura 2AM
 - 2.2.2 Quantificazione dei ROS
 - 2.2.3 Stima della perossidazione lipidica
- 2.3 Patch clamp
 - 2.3.1 Configurazione outside-out
- 2.4 Tecnica ADPAINT
 - 2.4.1 ADPAINT per rilevare gli oligomeri di α -sinucleina

3 RISULTATI

- 3.1 Neuroni indotti da iPSC SNCAx3 rispondono con flussi anomali di Calcio a stimoli fisiologici
- 3.2 Gli aggregati di α -sinucleina si inseriscono in membrana e consentono flussi ionici
- 3.3 Gli oligomeri di α -sinucleina inducono la formazione di ROS che provocano perossidazione lipidica
- 3.4 La perossidazione lipidica stimola l'inserimento degli oligomeri in membrana ed è responsabile del maggior influsso di Calcio
- 3.5 L'azione citotossica degli oligomeri può indurre ferroptosi

4 CONCLUSIONI

5 BIBLIOGRAFIA

1 INTRODUZIONE

1.1 α -Sinucleina: struttura e ruolo nella patogenesi della Malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (PD) è una malattia neurodegenerativa, caratterizzata dalla morte preferenziale dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta della via nigrostriatale e da una conseguente diminuzione nel rilascio di dopamina, che risulta responsabile della maggior parte dei sintomi motori. I meccanismi di patogenesi rimangono ad oggi in larga parte sconosciuti. Ciò che è accertato è che l'insorgenza della patologia, sia nella forma sporadica che in quella familiare, risulta essere associata alla presenza di aggregati intracellulari, definiti Corpi di Lewy (LB), formati in conseguenza a misfolding di proteine e costituiti in larga parte da α -sinucleina. Tali aggregati inoltre non sono specifici esclusivamente della PD, ma sono caratteristici di tutte le forme di sinucleinopatie [4].

L' α -sinucleina è una proteina espressa in modo ubiquitario e particolarmente abbondante a livello dei terminali presinaptici, dove può legarsi alle vescicole sinaptiche e contribuire a regolarne il trafficking [1]. In condizioni fisiologiche è presente prevalentemente come monomero disordinato e solubile, il quale tuttavia a seguito di interazioni con membrane fosfolipidiche può subire modifiche conformazionali, riarrangiando la sua struttura secondaria e formando α -eliche anfipatiche che ne favoriscono l'interazione con le membrane e la multimerizzazione della proteina. In condizioni patologiche, tuttavia, i monomeri tendono a formare protofibrille solubili con struttura secondaria a foglietto β . Questi oligomeri, interagendo tra loro, vanno poi a formare le fibrille amiloidi insolubili che si accumulano all'interno dei LB [1]. Mentre non è ancora stato chiarito se i LB svolgano un ruolo citotossico o protettivo, sempre più evidenze suggeriscono che la tossicità indotta dall' α -sinucleina in condizioni patologiche risieda non tanto nelle fibrille insolubili quanto negli oligomeri solubili formati precedentemente. Recenti studi hanno analizzato le proprietà biochimiche di oligomeri con diversa struttura, individuando in particolari oligomeri, definiti high-FRET per via della tecnica utilizzata per identificarli, i migliori candidati per l'induzione di effetti citotossici [5]. Si tratta di oligomeri solubili e stabili, con struttura cilindrica o ad anello e costituita per un 30-40% da foglietti β , che espongono sulla superficie residui idrofobici e che per tali caratteristiche sembrano interagire con le membrane fosfolipidiche agendo come pori transmembrana.

Da studi in vitro e in vivo risulta inoltre che una deregolazione nei livelli di dopamina, e in particolare un suo aumento per tempi prolungati, contribuisca alla neurodegenerazione indotta da α -sinucleina, per via della capacità della forma ossidata di tale neurotrasmettitore di interagire con le protofibrille favorendone la stabilizzazione e accelerando la conversione dalla forma monomeric a quella oligomeric neurotossica.

1.1.1 Oligomeri di α -sinucleina e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Studi condotti in neuroni derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) hanno dimostrato che una alterazione nel dosaggio di α -sinucleina è in grado di aumentare la velocità di produzione di ROS con un'intensità che è dipendente dalla conformazione assunta dalla proteina: mentre nella forma monomericamente la proteina non induce un aumento nei livelli basali di ROS, sia nella sua forma oligomericamente che in forma di fibrille si osserva un aumento dei livelli tali specie reattive [2]. Gli oligomeri, in particolare, portano ad un aumento significativo e dose-dipendente della produzione di ROS, maggiore di quello indotto dalle fibrille, in virtù delle proprietà biochimiche assunte in relazione alla loro conformazione.

La produzione di ROS sembra essere indipendente dai principali pathway cellulari di produzione di radicali dell'ossigeno, ed essere correlata piuttosto alla capacità degli oligomeri ricchi in foglietti β di legare ioni metallici, in particolare ferro e rame, e utilizzarli per catalizzare ossido-riduzioni [2].

L'aumento della quantità di ROS prodotti sottopone la cellula a stress ossidativo, che si pensa essere in grado di promuovere una ulteriore aggregazione nei monomeri di α -sinucleina e che può portare a morte cellulare per apoptosi, mediando l'attivazione delle caspasi 3/7.

1.1.2 Le protofibrille che si inseriscono in membrana agiscono come pori

A differenza di monomeri e fibrille, le protofibrille di α -sinucleina sono in grado di inserirsi in doppi strati lipidici carichi negativamente, causandone una permeabilizzazione dose-dipendente poiché agiscono come pori che consentono il passaggio non selettivo di piccole molecole, come ioni, piccoli soluti o peptidi [3]. Questo fenomeno porta a conseguenze anche molto gravi per la cellula e ne può indurre l'apoptosi. Ad esempio, può aumentare la conduttanza della membrana a stimoli sia depolarizzanti che iperpolarizzanti, può portare a depolarizzazione della membrana a livello mitocondriale; può promuovere la fuoriuscita di dopamina a livello delle vescicole sinaptiche e può indurre flussi di calcio non regolati.

1.1.3 Effetti indotti dagli oligomeri di α -sinucleina a livello mitocondriale

Nonostante i meccanismi con cui questi oligomeri inducano tossicità e morte neuronale non siano ancora stati interamente elucidati, alcuni degli eventi da loro indotti sono stati descritti.

È stata infatti chiarita la capacità degli oligomeri di interagire con la membrana mitocondriale interna, e in particolare di inserirsi in essa agendo come un poro transmembrana che consente il flusso di ioni. Qui, inoltre, in virtù delle loro capacità intrinseche di generare ROS, alterano lo stato ossidativo di lipidi di membrana e proteine a loro prossime, compromettendone la funzionalità. Tra le

proteine suscettibili all'ossidazione da parte dei ROS figura anche l'ATP-sintasi [6], in particolare la subunità β ricca in cisteine e metionine, in prossimità della quale tendono a localizzarsi gli oligomeri inseriti in membrana. A seguito di tali modifiche il complesso perde funzionalità, con conseguenze importanti e dannose: si accumula NADPH all'interno del mitocondrio e viene ridotto il flusso protonico attraverso la membrana mitocondriale interna, provocando una lenta depolarizzazione. Si suppone inoltre che l'azione degli oligomeri possa indurre l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (PTP) attraverso meccanismi ancora non completamente compresi, e che ne abbassino la soglia di attivazione a seguito della ricezione di aumenti di calcio o ROS citosolici. L'apertura del PTP può provocare la redistribuzione di ioni, soluti e proteine a livello del citosol; alcuni di questi, come ad esempio il citocromo C, agiscono a livello citosolico come noti segnali apoptotici portando a morte cellulare.

1.1.4 Il ruolo degli oligomeri di α -sinucleina nella perossidazione lipidica

I tessuti del sistema nervoso centrale sono ricchi in acidi grassi polinsaturi (PUFA) particolarmente suscettibili a danni di tipo ossidativo. Tali danni potrebbero essere indotti in conseguenza della produzione di ROS da parte dell' α -sinucleina in forma oligomerica, poiché questi sono in grado di innescare nei PUFA una cascata di reazioni auto-ossidative di tipo non enzimatico. Inoltre, alcuni studi hanno evidenziato una forte affinità di legame tra oligomeri di α -sinucleina e PUFA perossidati, suggerendo che a seguito della perossidazione dei lipidi sia favorito da un lato l'inserimento degli oligomeri in membrana e dall'altro un'ulteriore aggregazione dei monomeri di α -sinucleina ad oligomeri, portando così ad un aggravamento degli effetti citotossici della proteina.

La perossidazione dei lipidi delle membrane plasmatiche e intracellulari ne altera le proprietà e porta alla formazione o liberazione di una serie di molecole che fungono da induttori di pathway apoptotici [7]. In primo luogo, altera la fluidità delle membrane modificandone di conseguenza la permeabilità, provocando una deregolazione nel flusso di ioni attraverso queste e portando tra le altre cose a depolarizzazione della membrana mitocondriale, evento in grado di innescare pathway apoptotici. In secondo luogo, l'ossidazione dei legami insaturi presenti nella cardiolipina può alterarne le proprietà impermeabilizzanti e permettere la fuoriuscita del citocromo C mitocondriale a livello citosolico, il quale sarà anch'esso responsabile dell'attivazione di pathway apoptotici. Infine, dai PUFA perossidati ancorati alle membrane possono essere rilasciati metaboliti tossici in

grado di danneggiare proteine e acidi nucleici, attivando cascate di segnale apoptotiche.

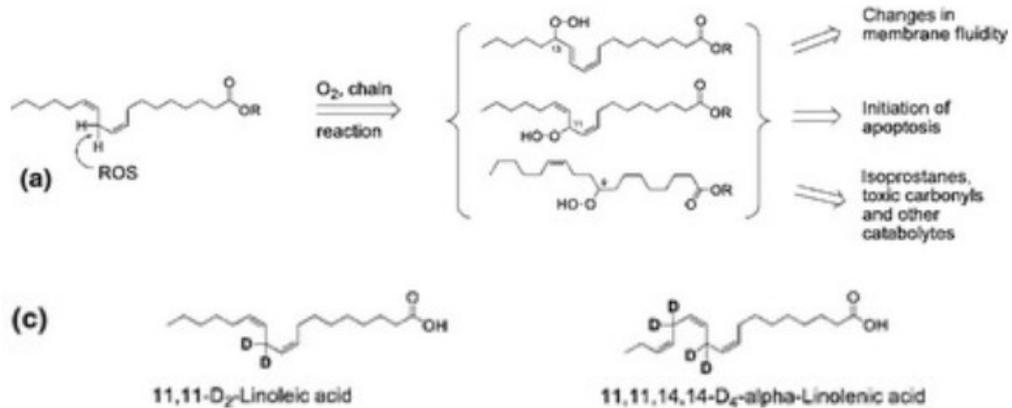


Figura 1: immagine rappresentativa della cascata di reazioni auto-ossidative innescata nei PUFA dai ROS (a) e di come la forma deuterata di questi risultati resistente all'innescio di tale cascata di reazioni (c)

Sperimentalmente, gli effetti degli oligomeri di α -sinucleina nella perossidazione lipidica possono essere efficacemente rallentati sostituendo i PUFA con la forma deuterata di questi acidi polinsaturi. Questi risultano molto piú resistenti alla rimozione dell'idrogeno e sono dunque in grado di rallentare notevolmente l'innescio della cascata di reazioni che culminerà con la perossidazione dei lipidi (figura 1), mitigando gli effetti citotossici dell' α -sinucleina e riducendo significativamente la velocità di morte cellulare.

1.1.5 Legame tra protofibrille di α -sinucleina e Ca^{2+} intracellulare

Il calcio è un secondo messaggero che regola processi fisiologici essenziali nei tessuti della maggior parte degli organismi. Per questo motivo, una deregolazione nella sua concentrazione e conseguentemente nei pathway da esso regolati possono avere conseguenze letali a livello cellulare.

Per quanto riguarda le protofibrille di α -sinucleina, è stato osservato che inducono un maggior influsso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare in modo dose-indipendente, non tanto attraverso l'attivazione di uno qualsiasi dei canali voltaggio-dipendenti del Ca^{2+} noti, quanto piuttosto per via della loro capacità di agire come pori o canali ionici transmembrana [8].

L'aumento nella concentrazione di calcio induce una serie di conseguenze patologiche: stimola una ulteriore aggregazione delle protofibrille, accentuandone l'azione citotossica; deregola i meccanismi di trasmissione sinaptica calcio-dipendenti, induce l'apertura del PTP mitocondriale ed attiva una serie di pathway apoptotici.

1.1.6 Relazione tra protofibrille di α -sinucleina e ferroptosi

La ferroptosi è una forma di morte cellulare regolata non apoptotica, dovuta a stress ossidativo e caratterizzata principalmente da accumulo di perossidazione lipidica dipendente dal ferro [10].

Il mantenimento dell'omeostasi dei livelli di Fe^{2+}/Fe^{3+} è infatti essenziale per il corretto funzionamento cellulare, e numerose evidenze suggeriscono che l'aumento di ferro intracellulare abbia un ruolo chiave nell'indurre questo tipo di morte cellulare. Questo è dovuto sia alla sua capacità di aumentare la produzione di ROS tramite la reazione di Fenton, sia alla sua abilità di agire come cofattore per l'azione di numerosi enzimi, tra cui idrossilasi e lipossigenasi, capaci di avviare una cascata di reazioni che culminerà con perossidazione lipidica, agendo in particolar modo sui PUFA abbondanti a livello cerebrale. Nell'indurre o prevenire la ferroptosi ricoprono dunque un ruolo chiave proteine quali la transferrina, IRP1/2 e la ferritina, le quali partecipano all'omeostasi delle concentrazioni di ferro intracellulari.

Molte molecole endogene e sintetiche si sono dimostrate avere un ruolo essenziale nell'indurre o proteggere dalla ferroptosi, come ad esempio antiossidanti, chelanti del ferro, ed enzimi coinvolti nel metabolismo aminoacidico o lipidico. Tra queste l'enzima glutatione perossidasi (GPX4) riveste particolare rilevanza: si tratta di un'ossidoreduttasi contenente residui di selenocisteina, in grado di catalizzare una reazione che riduce fosfolipidi ossidati (PLOOH) alla forma alcolica corrispondente prevenendo i danni alle membrane [9].

Recenti studi hanno evidenziato come la ferroptosi possa rappresentare una delle principali tipologie di morte cellulare coinvolte nella malattia di Parkinson. Più nello specifico, recenti evidenze suggeriscono che gli oligomeri di α -sinucleina possano avere un ruolo diretto nell'indurre ferroptosi. Oltre a stimolare la produzione di ROS e indurre di conseguenza perossidazione lipidica, gli oligomeri sembrano interferire con l'omeostasi del ferro attraverso diversi meccanismi. Ne stimolano l'ingresso a livello cellulare interagendo con la transferrina, lo riducono a Fe^{2+} , aumentando dunque la sua capacità produrre ROS, e stimolano la degradazione della ferritina da parte dei lisosomi. L'ipotesi del legame tra ferroptosi e PD è rafforzata da studi su modelli animali e cellulari che mostrano come l'uso di inibitori della ferroptosi sia in grado di rallentare il processo di morte cellulare in questa patologia neurodegenerativa, mentre inibitori di GPX4 o induttori della ferroptosi sembrano aggravarne i sintomi e accelerarne la progressione [10].

2 MATERIALI E METODI

2.1 Generazione iPSC

Le iPSC sono cellule staminali pluripotenti, generate a partire da cellule somatiche differenziate, generalmente fibroblasti, grazie alla trasduzione di vettori di espressione retrovirali ingegnerizzati per contenere i fattori di riprogrammazione di Yamanaka: Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc.

2.1.1 Differenziamento a neuroni dalle iPSC

Nelle iPSC indotte può essere successivamente stimolato il differenziamento a specifiche linee cellulari modulando attivamente l'inibizione e la presenza di opportuni morfogeni. In particolare, per indurre il differenziamento a neuroni si procede aggiungendo alle colture cellulari inibitori di BMP, quali Noggin, Chordin o SB431542; il giorno successivo verranno aggiunti morfogeni responsabili del differenziamento neurale quali SHH, FGF8 o WNT.

Nell'articolo in analisi, è stato indotto il differenziamento a neuroni a partire da due tipologie di iPSC: generate da biopsie prelevate da individui sani, denominati cloni CTRL e utilizzate come controllo, o da biopsie prelevate da individui affetti da PD autosomico dominante dovuto alla presenza del locus SNCA codificante per l' α -sinucleina triplicato, denominati cloni SNCAx3, utilizzati per studiare gli effetti della sovraespressione della proteina. Si è inoltre generata una linea cellulare di controllo isogenico, detta Iso-CTRL, rimuovendo con la tecnologia CRISPR/cas9 due dei tre alleli SNCA dai cloni SNCAx3, e mantenendo il resto del locus inalterato, per verificare che gli eventuali effetti patologici osservati nelle cellule differenziate fossero dovuti esclusivamente al sovradosaggio nel gene codificante l' α -sinucleina. Ogni induzione è stata effettuata in triplicato, a partire da tre diversi cloni di iPSC di controllo, tre cloni SNCAx3 e tre cloni di controllo isogenico.

2.2 Rilevamento della fluorescenza con live-imaging

Si tratta di una tecnica che consiste nell'aggiungere a cellule in vivo specifici indicatori fluorescenti, i quali variano il picco di assorbimento o il proprio spettro di emissione a seguito del legame con specifici composti di interesse, e li si utilizza per quantificare la presenza di tali composti. In questo esperimento la tecnica è stata utilizzata per misurare la $[Ca^{2+}]_c$, quantificare la presenza di ROS e di lipidi perossidati.

2.2.1 Misurazione di $[Ca^{2+}]_c$ tramite Fura-2AM

L'estere Fura-2-acetossimetil, Fura-2AM, è un indicatore raziometrico che varia il proprio picco di assorbimento da 380 nm a 340 nm a seguito del legame con ioni Ca^{2+} . Negli esperimenti a seguito riportati, le cellule di cui si voleva quantificare $[Ca^{2+}]_c$ sono state eccitate da un fascio di luce emesso da un arco allo Xeno e fatto passare attraverso un cromatore centrato a 340 nm e successivamente a 380 nm. La fluorescenza emessa è stata poi filtrata per lasciar passare solo raggi con

lunghezza d'onda maggiore di 515 nm, e osservata utilizzando un microscopio invertito a fluorescenza. Il rapporto dell'assorbanza di Fura-2AM tra 340 nm e 380 nm è stato poi utilizzato per ricavare $[Ca^{2+}]_c$.

2.2.2 Quantificazione dei ROS

Per determinare e quantificare la presenza di ROS si è utilizzato il diidroetidio (DHE), un fluoroforo che a seguito dell'interazione con l'anione superossido (O_2^-) viene ossidato e convertito a etidio (HE) e che a seguito di tale ossidazione varia il suo picco di assorbimento da 380 nm a 530 nm.

2.2.3 Stima della perossidazione lipidica

Per misurare il livello di perossidazione lipidica è stato utilizzato come fluoroforo il colorante lipofilico C11-BODIPY 581/591, aggiunto al terreno di coltura per 20 min. Questa molecola si accumula in membrana e, a seguito della perossidazione dei lipidi, varia il proprio picco di emissione da 590 nm a 510 nm ma non la sua capacità di legare le membrane, permettendo dunque di rilevare il grado di perossidazione dei lipidi di membrana. In questo caso è stato eccitato da un fascio laser con lunghezza d'onda rispettivamente di 488 nm e 565 nm e la fluorescenza è stata osservata con un microscopio confocale.

2.3 Patch clamp

Il patch clamp è una tecnica di elettrofisiologia, ed in particolare un'evoluzione del voltage clamp, utilizzata per misurare le correnti generate dal flusso di uno o più ioni attraverso le membrane cellulari. Esistono diverse conformazioni di patch clamp, e quella utilizzata negli esperimenti successivamente riportati è la conformazione outside out.

2.3.1 Configurazione outside-out

Si tratta di una configurazione ottenuta appoggiando una micro-pipetta contenente un micro-elettrodo ad un tassello di membrana della cellula, detto patch. Applicando una suzione di forza sufficiente viene indotta la recisione del patch dal resto della cellula, il quale si manterrà in conformazione lineare con il lato intracellulare della membrana a contatto con la micro-pipetta e quello extracellulare a contatto con un bagno che mima l'ambiente extracellulare. Il micro-elettrodo all'interno della pipetta, grazie alla suzione applicata, permette di isolare e rilevare la corrente attraverso il patch, e dunque il flusso di ioni attraverso i canali presenti nel tassello. Poiché questo micro-elettrodo è collegato ad un voltmetro a cui è collegato anche un secondo elettrodo immerso nel bagno extracellulare, è possibile rilevare la differenza di potenziale presente tra il patch e l'ambiente extracellulare e, nel caso in cui questa differisca rispetto ad un potenziale V_m fissato dall'operatore, sarà possibile generare una corrente compensatoria di intensità e ampiezza nota in grado di annullare la differenza tra i valori dei due potenziali. Poiché tale differenza è generata esclusivamente dal

flusso di ioni attraverso i canali nel patch, sarà possibile risalire alla corrente che fluiva attraverso questi.

Negli esperimenti successivamente riportati, la disposizione outside out è stata utilizzata perché consente di studiare come vari il flusso di ioni attraverso i canali al variare della composizione del bagno, e dunque consente di studiare come vari l'attività dei canali al variare dei segnali extracellulari come i neurotrasmettitori. In particolare si sono effettuate misurazioni di patch clamp in configurazione outside-out nei neuroni indotti da iPSC SNCAx3 e CTRL, al fine di determinare se gli oligomeri di α -sinucleina, inserendosi in membrana, potessero agire come canali ionici transmembrana: si sono escisi patch dal soma dei neuroni, mantenendoli ad un potenziale V_m di -70mV, e si sono aggiunti alla soluzione extracellulare antagonisti dei principali canali ionici ligando-dipendenti espressi a livello neurale, al fine di isolare l'eventuale contributo fornito dagli oligomeri di α -sinucleina al flusso ionico attraverso il patch.

2.4 Tecnica ADPAINT

Si tratta di una tecnica ad alta risoluzione utilizzata per verificare la presenza di aggregati proteici e caratterizzarli con una risoluzione nanometrica e con elevata specificità. Il suo utilizzo risulta preferibile ad altre tecniche che analizzano molecole singole basate sull'uso di fluorofori o coloranti. Questi ultimi, infatti, da un lato possiedono una minor specificità per la molecola in analisi e dall'altro possiedono una minor sensibilità e non sono di conseguenza in grado di rilevare la presenza degli aggregati di piccole dimensioni, molto spesso i più rilevanti per fini diagnostici o terapeutici.

Da un punto di vista sperimentale si basa sull'utilizzo di un aptamero, corto oligonucleotide a singolo filamento sviluppato in modo tale da avere elevata affinità per la molecola bersaglio, utilizzato in combinazione con la tecnica DNA PAINT. Quest'ultima è una tecnica di microscopia a super risoluzione in cui vengono utilizzati due filamenti di DNA: uno di docking, coniugato ad un anticorpo o proteina di interesse; uno complementare di imaging coniugato ad un fluoroforo. Il legame stocastico tra i due filamenti consentirà di rilevare la presenza e la localizzazione della proteina in analisi tramite microscopia TRIF (Total Internal Reflection Fluorescence). In ADPAINT, il filamento docking viene coniugato all'estremità dell'aptamero e, legandosi ripetutamente e in modo transiente con il filamento imaging, consente di ricostruire con super-risoluzione localizzazione e conformazione degli aggregati di interesse.

2.4.1 ADPAINT per rilevare oligomeri di α -sinucleina

Nell'articolo preso in considerazione la tecnica ADPAINT è stata applicata per verificare la presenza di oligomeri formati nei cloni SNCAx3, utilizzando un aptamero specifico per la conformazione assunta dagli oligomeri di α -sinucleina e un imaging strand coniugato al fluoroforo ATTO-425, e confrontando i valori di

fluorescenza rilevati con quelli ottenuti dall'analisi dei cloni CTRL e Iso-CTRL utilizzati come controllo. Risulta particolarmente adeguata a questo scopo, considerando sia la grande eterogeneità di strutture che gli oligomeri possono formare e di localizzazioni in cui possono trovarsi sia considerando le loro ridotte dimensioni e la ridotta abbondanza.

Gli aptameri in grado di legare specificatamente gli oligomeri solubili di α -sinucleina, discriminandoli dai monomeri e dalle fibrille insolubili che possono essere compresenti a livello citosolico, vengono isolati a partire da una libreria a DNA di aptameri aventi diverse conformazioni, utilizzando due metodi di selezione: il saggio EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) e, successivamente, un saggio competitivo. Nel saggio EMSA si fanno correre su un gel di agarosio campioni ottenuti mischiando 1 μ M di DNA della libreria con 20 μ g di oligomeri di α -sinucleina, al fine di individuare i campioni in cui gli aptameri presenti sono in grado di legare la proteina. Ciò è possibile perché il legame tra i due porta ad un rallentamento della corsa dell' α -sinucleina, visualizzabile al transilluminatore. Poiché tuttavia questo saggio non è in grado di discriminare se gli aptameri legano l' α -sinucleina in forma monomerica, oligomerica o fibrillare, è seguito da un saggio competitivo in cui il DNA prelevato dalla corsa elettroforetica, a seguito di amplificazione tramite PCR, viene incubato su un filtro di cellulosa sulla quale sono stati immobilizzati separatamente campioni di α -sinucleina in forma monomerica, oligomerica o fibrillare. A seguito di un lavaggio per rimuovere i legami aspecifici, viene estratta la sequenza di DNA degli aptameri leganti specificatamente gli oligomeri di α -sinucleina.

3 RISULTATI

L'obiettivo dell'articolo in esame è stato quello di studiare alcune delle conseguenze della formazione di oligomeri endogeni di α -sinucleina in neuroni SNCAx3, e in particolare indagare alcuni dei meccanismi con cui essi inducono citotossicità e morte cellulare.

3.1 Neuroni indotti da iPSC SNCAx3 rispondono con flussi anomali di Ca^{2+} a stimoli fisiologici

A seguito del differenziamento a neuroni, e in minor parte a cellule della glia, delle iPSC di controllo (CTRL), di controllo isogenico (Iso-CTRL) e di iPSC con triplicazione di SNCA (SNCAx3), attraverso tecniche di immunohistochimica è stata confermata la presenza di elevate quantità di α -sinucleina nelle cellule nervose derivate da iPSC SNCAx3 ma non in quelle derivate da iPSC CTRL (figura 2).

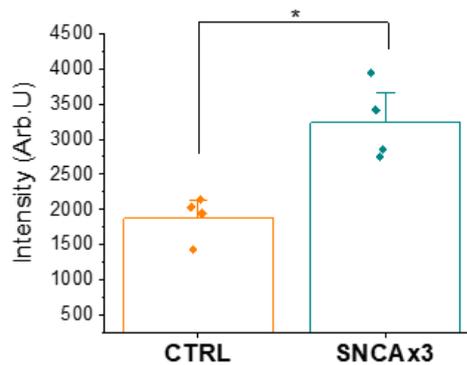


Figura 2: intensità della fluorescenza, espressa in unità arbitrarie, rilevata a seguito dell'aggiunta di anticorpi specifici per α -sinucleina. Appare evidente che la quantità di α -sinucleina presente in neuroni SNCAx3 è significativamente maggiore di quella presente in cloni CTRL

In seguito, è stato svolto un esperimento per testare come rispondevano le varie tipologie di neuroni indotti se sottoposti a particolari stimoli. In particolare, si sono stimolati i tre diversi cloni con concentrazioni fisiologiche di glutammato ($5\mu\text{M}$) e con concentrazioni di KCl tali da portare ad una depolarizzazione del potenziale di membrana (50mM).

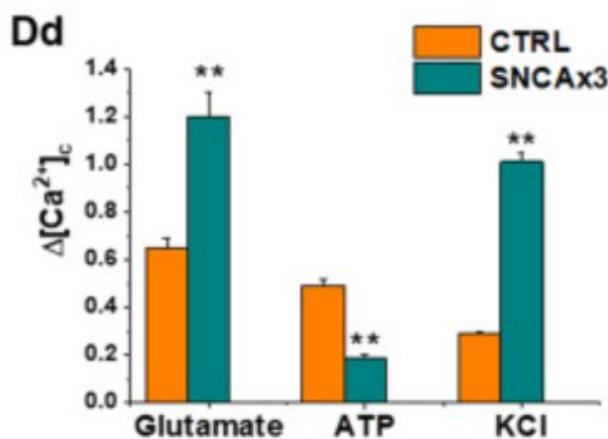


Figura 3: il signaling del calcio indotto da concentrazioni fisiologiche di glutammato e KCl è significativamente più alto in neuroni derivati da iPSC SNCAx3. Al contrario, la risposta evocata da concentrazioni fisiologiche di ATP negli astrociti derivati da iPSC SNCAx3 è significativamente più bassa rispetto agli astrociti derivati da iPSC CTRL

Entrambi gli stimoli inducono l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti espressi a livello neuronale, portando conseguentemente ad un aumento nella concentrazione di Ca^{2+} citosolico. Per quanto non si sia osservata una differenza significativa nella percentuale di cellule reagenti allo stimolo, con le tecniche di rilevamento della fluorescenza si è quantificata la concentrazione di $[\text{Ca}^{2+}]_c$ citosolico e si è osservato che il

suo aumento risultava sensibilmente più elevato nei neuroni SNCAx3 rispetto ai neuroni CTRL (figura 3).

Si sono poi stimulate le cellule nervose con 100 μ M di ATP extracellulare per indurre l'attivazione dei recettori metabotropici P2Y, espressi soprattutto a livello degli astrociti, e portare ad un aumento della concentrazione di $[Ca^{2+}]_c$ citosolico. Anche in questo caso la risposta evocata nei cloni SNCAx3 è risultata diversa e il segnale indotto è apparso significativamente più basso che nei cloni CTRL (figura 3).

3.2 Gli aggregati di α -sinucleina si inseriscono in membrana e consentono flussi ionici

Tramite la tecnica ADPAINT, basata sull'utilizzo di aptameri complementari a oligomeri di α -sinucleina, si è confermata la presenza di aggregati solubili di α -sinucleina in modo specifico in neuroni SNCAx3.

Poiché è stato ipotizzato che i flussi anomali di Ca^{2+} descritti sopra insorgessero come conseguenza della capacità di questi oligomeri di α -sinucleina di alterare la conduttanza della membrana, inserendosi in essa e agendo come pori transmembrana, sono stati effettuati esperimenti di patch-clamp, in configurazione outside-out, su tasselli di membrana in neuroni SNCAx3, CTRL e Iso-CTRL.

Per isolare la corrente che attraversa i canali ionici formati dagli aggregati di α -sinucleina inseriti in membrana, si sono aggiunti alla soluzione esterna inibitori dei principali canali ionici noti. In particolare,

sono stati aggiunti D-APV e NBQX, antagonisti del glutammato, picrotossina, antagonista del GABA, e stricnina, antagonista della glicina. A conferma dell'ipotesi, solo in neuroni derivati da iPSC SNCAx3 si è rilevata attività e corrente di singolo canale (figura 4), la cui ampiezza aumentava a seguito dell'applicazione di stimoli depolarizzanti e che risultava azzerata previa aggiunta di anticorpi anti- α -sinucleina, in grado di legare e sequestrare i monomeri impedendo la formazione di aggregati.

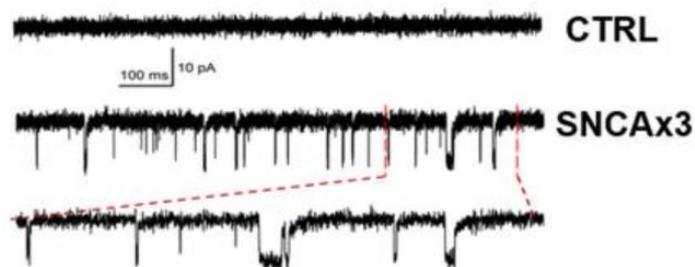


Figura 4: in alto, misurazioni in configurazione outside-out in neuroni CTRL. In basso, misurazioni in configurazione outside-out in neuroni SNCAx3

3.3 Gli oligomeri di α -sinucleina inducono la formazione di ROS che provocano perossidazione lipidica

Con le tecniche di rilevamento della fluorescenza si è confermato che gli oligomeri di α -sinucleina endogeni presenti in neuroni SNCAx3 aumentano i livelli di

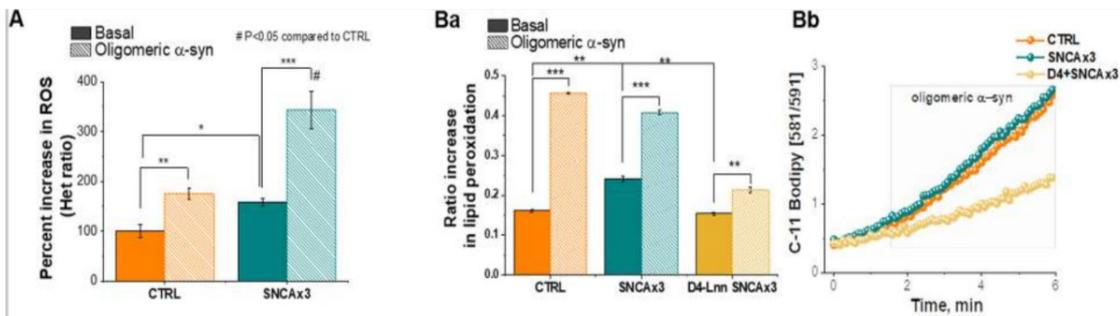


Figura 5: La produzione di ROS e nella perossidazione dei lipidi è maggiore nei neuroni derivati da iPSC SNCx3, ed è ulteriormente incrementato dall'aggiunta di oligomeri applicati esogenamente (A e Ba). L'incorporazione in membrana di D4-Lnn ripristina il rate di perossidazione lipidica a livelli fisiologici anche nei neuroni SNCAx3 (Ba e Bb)

produzione di ROS (figura 5, A), i quali sono risultati ulteriormente accresciuti a seguito dell'aggiunta di oligomeri ricombinanti nello spazio extracellulare. Parallelamente si è osservato un aumento nei livelli di perossidazione lipidica (figura 5, Ba), dovuto verosimilmente all'innescare di una cascata ossidativa da parte dei ROS prodotti e aventi come target i PUFA in membrana. Anche i livelli di perossidazione sono risultati ulteriormente accresciuti a seguito dell'aggiunta di oligomeri applicati esogenamente. Tuttavia, trattando precedentemente le cellule con 10 μ M di D4-Lnn, forma deuterata dell'acido linoleico che in virtù delle sue caratteristiche biochimiche risulta più resistente alla cascata autossidativa innescata dai ROS, sono stati ripristinati i livelli di perossidazione lipidica nei neuroni SNCAx3 (figura 5, Ba e Bb).

3.4 La perossidazione lipidica stimola l'inserimento degli oligomeri in membrana ed è responsabile del maggior influsso di Calcio

Dai dati di letteratura, è nota sia l'alta affinità dei lipidi perossidati per gli oligomeri di α -sinucleina che la capacità di favorire l'aggregazione di essi. Ciò che è stato indagato nell'articolo preso in considerazione, è la possibilità che lo stato ossidativo dei lipidi di membrana sia in grado di guidare anche l'inserimento degli oligomeri in essa, influenzando di conseguenza la loro capacità di agire come pori transmembrana. Questo aspetto influirebbe direttamente sulla loro capacità di alterare il normale flusso ionico insorto in conseguenza di stimoli depolarizzanti, e potrebbe spiegare i flussi anomali di Ca^{2+} precedentemente osservati.

Per confermare tale ipotesi, è stato svolto un esperimento in cui i neuroni SNCAx3 sono stati preincubati per 24 ore con D4-Lnn prima di esporli a glutammato, KCl o ATP, per indurre l'incorporazione nelle membrane e osservare come variasse la risposta nel signaling del Ca^{2+} . Il trattamento con PUFA deuterati alterava il signaling del Ca^{2+} indotto da glutammato, KCl e ATP: nel primo caso, l'aumento di

$[Ca^{2+}]_c$ veniva ripristinato ai valori fisiologici osservati anche in neuroni CTRL e Iso-CTRL; nel secondo caso risultava abolito il passaggio del calcio all'interno della

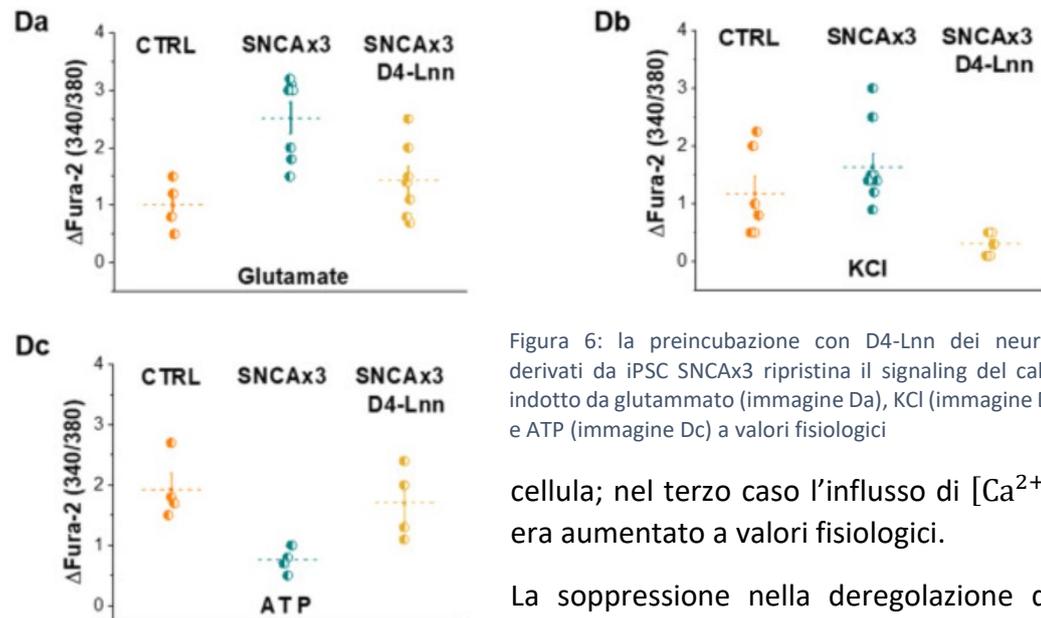


Figura 6: la preincubazione con D4-Lnn dei neuroni derivati da iPSC SNCAx3 ripristina il signaling del calcio indotto da glutammato (immagine Da), KCl (immagine Db) e ATP (immagine Dc) a valori fisiologici

cellula; nel terzo caso l'influsso di $[Ca^{2+}]_c$ era aumentato a valori fisiologici.

La soppressione nella deregolazione del signaling del Ca^{2+} in neuroni derivati da iPSC

SNCAx3 e caratterizzati dunque da aggregati oligomericici di α -sinucleina a livello citoplasmatico, prova che la condizione necessaria affinché questi oligomeri si inseriscano in membrana è che questa sia andata incontro a perossidazione.

3.5 L'azione citotossica degli oligomeri di α -sinucleina può indurre ferroptosi

La ferroptosi è una tipologia di morte cellulare programmata non apoptotica dipendente da perossidazione lipidica dovuta all'accumulo di Fe^{2+} a livello citosolico. Considerando il fatto che le protofibrille di α -sinucleina producono ROS, che inducono perossidazione lipidica, e sembrano alterare l'equilibrio di Fe^{2+} aumentandone i livelli citosolici, i ricercatori hanno pensato di verificare se l'azione degli oligomeri fosse in grado di indurre ferroptosi. Inizialmente, per confermare che la morte dei neuroni osservata nei cloni SNCAx3 fosse causata dalla formazione di oligomeri di α -sinucleina, nel terreno di coltura dei neuroni CTRL e Iso-CTRL sono stati aggiunti esogenamente monomeri o, alternativamente, oligomeri ricombinanti osservando solo nel secondo caso un aumento nei livelli di morte cellulare confermando quindi l'ipotesi sperimentale (figura 7).

In un secondo momento è stato svolto un esperimento nei cloni di controllo e SNCAx3, aggiungendo nel terreno di coltura inibitori o induttori della ferroptosi, per osservare le conseguenze nel livello di morte cellulare.

In particolare, l'aggiunta nel terreno di erastina, principale induttore di ferroptosi, ha provocato un aumento dose-dipendente nella percentuale di neuroni che vanno incontro a morte cellulare. Al contrario, l'aggiunta di inibitori della perossidazione lipidica come D4-Lnn hanno ridotto sensibilmente i livelli di morte cellulare osservati, riportandoli a livelli basali, sia in neuroni SNCAx3 che in cloni di

controllo a cui fossero stati precedentemente aggiunti esogenamente oligomeri di α -sinucleina. Allo stesso modo, l'aggiunta di inibitori della ferroptosi come la ferrostatina-1, antiossidante in grado di prevenire i danni ossidativi alle membrane, ha ripristinato il livello di morte cellulare a livelli basali. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche aggiungendo nel terreno chelanti di ioni metallici, come la Deferoxamina (DFO), in grado di sottrarre il Fe^{3+} (figura 7).

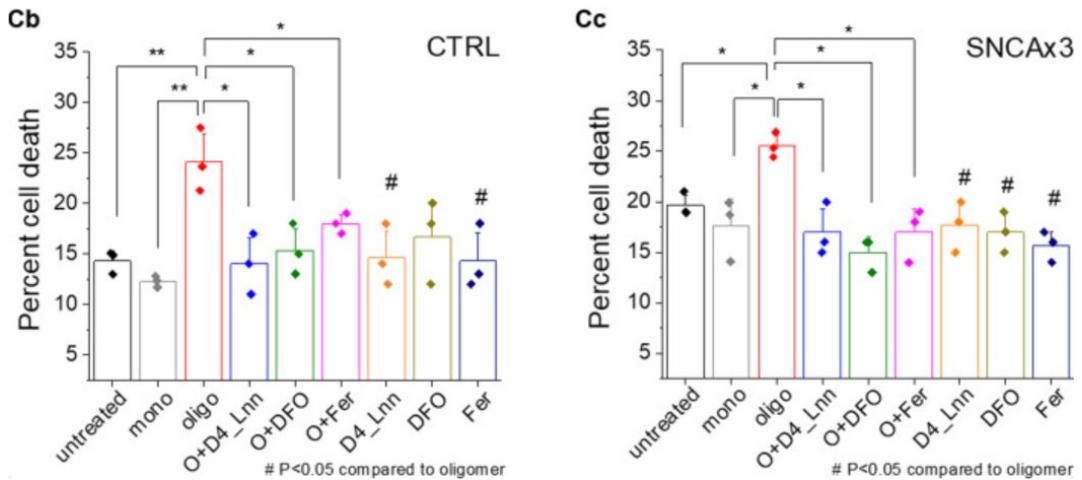


Figura 7: istogramma rappresentativo della percentuale di cellule che va incontro a morte cellulare in cloni CTRL (immagine Cb) e in cloni SNCAx3 (Cc). Il trattamento con D4-Lnn, DFO, ferrostatina-1 ha riportato a livelli basali il tasso di morte cellulare in cloni sia CTRL che SNCAx3 ai cui terreni di coltura fossero stati aggiunti esogenamente oligomeri di α -sinucleina

In conclusione, i risultati dell'esperimento sembrano confermare il fatto che gli oligomeri di α -sinucleina esercitano azione citotossica in grado di portare a morte cellulare, e che questa avvenga per ferroptosi.

4 CONCLUSIONI

Lo scopo dell'articolo qui analizzato è stato quello di investigare e cercare di chiarire alcuni dei meccanismi attraverso i quali le sinucleinopatie inducono la morte cellulare di particolari neuroni, portando allo sviluppo di malattie neurodegenerative, tra le quali la malattia di Parkinson. Nello specifico, si è indagata la complessa relazione tra aggregati di α -sinucleina, produzione di ROS e perossidazione lipidica, alterazioni dei flussi ionici e del signaling del calcio, per cercare di chiarire come questi siano coinvolti nell'indurre citotossicità o nel condurre a morte cellulare.

Inizialmente, con gli esperimenti svolti si è dimostrato che nei neuroni overesprimenti α -sinucleina, con conseguente formazione di oligomeri solubili, è aumentata la produzione basale di ROS a livello citoplasmatico. Esperimenti successivi hanno poi dimostrato che i ROS prodotti possono interagire con le membrane cellulari, alterandone lo stato ossidativo e compromettendone conseguentemente la funzionalità.

Nell'articolo in analisi una possibile soluzione proposta per prevenire l'innescò della cascata autossidativa, che ha come conseguenza la perossidazione dei lipidi di membrana, è consistita nel sostituire i PUFA particolarmente suscettibili all'azione dei ROS con i loro isotopi deuterati. In studi in vivo, questi isotopi potrebbero essere prodotti per via sintetica e venir poi forniti per via alimentare agli organismi affetti da PD, ma potrebbe trattarsi di una soluzione non applicabile per fini terapeutici, considerando l'importante ruolo che una fisiologica ossidazione lipidica ricopre nel garantire la funzionalità neuronale e il corretto metabolismo degli acidi grassi. La forma deuterata, proprio perché resistente ad alterazioni del suo stato ossidativo, potrebbe infatti non essere correttamente catabolizzata, o generare metaboliti non correttamente eliminati o riciclati. In generale, il limite di studi condotti in modelli cellulari è infatti che, per quanto siano strumenti essenziali per la delucidazione dei meccanismi molecolari di singoli fenomeni, non sono in grado di rappresentare la complessità presente in vivo nei diversi tessuti o apparati e non sono dunque sempre sufficienti per studiare gli effetti sull'organismo di un determinato approccio terapeutico. Un'altra importante considerazione da fare è che, poiché per la produzione di ROS oltre alla presenza di oligomeri di α -sinucleina sembrano essere necessari ioni metallici come cofattori, anche la modulazione dei livelli citoplasmatici di tali ioni potrebbe risultare funzionale per riportare a valori fisiologici i livelli di produzione di specie reattive dell'ossigeno. Tale aspetto, tuttavia, è stato solo parzialmente indagato in questo articolo e la modulazione nella concentrazione di ioni, in particolare del ferro, è stata applicata solo come verifica indiretta della correlazione tra l'azione degli oligomeri e l'induzione della ferroptosi.

Nell'articolo sono stati svolti anche esperimenti che hanno dimostrato la capacità degli oligomeri di α -sinucleina di inserirsi in membrana, agendo come pori

transmembrana in grado di alterarne la conduttanza e portare ad un deregolato fluire di ioni. Tuttavia, tale proprietà dovrebbe essere intrinseca degli oligomeri e portare ad alterazioni nelle concentrazioni citosoliche di ioni e soluti anche per valori di riposo del potenziale di membrana, mentre nel lavoro in esame sono state riportate alterazioni indotte dall'applicazione di stimoli depolarizzanti, senza specificare se queste fossero assenti o semplicemente non riportate per valori di riposo del potenziale. Nel caso in cui fossero state assenti, si sarebbero potuti svolgere ulteriori esperimenti per cercare di chiarirne i motivi. Per esempio, si sarebbero potuti condurre esperimenti per verificare se i pori transmembrana andassero incontro a modifiche conformazionali a seguito della ricezioni di stimoli depolarizzanti.

La capacità degli oligomeri di agire come pori transmembrana è risultata accentuata dalla perossidazione dei lipidi, ma non sono stati svolti ulteriori esperimenti per chiarirne le cause. L'effetto osservato potrebbe infatti derivare sia da una aumentata capacità dei lipidi ossidati di reclutare gli oligomeri in membrana che dall'amplificazione degli effetti di permeabilizzazione della membrana in seguito all'inserimento del singolo oligomero. Quest'ultima situazione potrebbe essere legata ad esempio alla capacità dei lipidi perossidati di favorire l'apertura dei pori costituiti da oligomeri di α -sinucleina, attraverso modifiche conformazionali, anche in risposta a stimoli depolarizzanti di minor intensità. In ogni caso, si tratta di un aspetto funzionale interessante e ancora poco chiaro, che si potrebbe approfondire.

Tra le conseguenze analizzate dell'azione degli oligomeri come pori transmembrana, figura la loro capacità di indurre influssi deregolati di calcio a livello citosolico in risposta a stimoli depolarizzanti. Per quanto riguarda i dati raccolti negli esperimenti svolti, si è osservato che la depolarizzazione indotta dall'attivazione di recettori del glutammato o da alte concentrazioni di KCl inducevano un aumento di $[Ca^{2+}]_c$ molto maggiore in neuroni SNCAx3 che nei neuroni usati come controllo, per un aumento del numero di canali che ne consentivano l'ingresso; al contrario, l'attivazione dei recettori P2Y da parte dell'ATP con conseguente produzione di inositolo-3-fosfato, ha comportato un aumento di $[Ca^{2+}]_c$ minore che nei cloni di controllo, presumibilmente per via di una minor quantità di Ca^{2+} immagazzinata nel reticolo endoplasmatico (RE). I ricercatori non hanno tuttavia indagato ulteriormente le possibili cause alla base di questa deplezione, le quali potrebbero includere l'inserimento degli oligomeri di α -sinucleina anche a livello delle membrane del RE.

In generale, infatti, lo studio si è concentrato sulle conseguenze che la perossidazione lipidica e la formazione di pori transmembrana hanno a livello della membrana plasmatica, tralasciando le numerose e importanti conseguenze che questi fenomeni potrebbero avere sulle proteine o le altre membrane cellulari. Ad esempio, si sarebbero potuti svolgere esperimenti per approfondire i cambiamenti

morfologici e, soprattutto, funzionali indotti a livello mitocondriale, per cercare di comprendere meglio quali delle numerose proteine presenti sulle loro membrane risultano più suscettibili ai danni ossidativi causati dall'aumento nella produzione di ROS e quali conseguenze queste ossidazioni comportino, così come il loro ruolo nella patogenesi delle sinucleinopatie. Si sarebbe poi potuto cercare di determinare con maggiore precisione la selettività dei pori costituiti dagli oligomeri, per indagare quali conseguenze avesse la loro formazione sull'omeostasi di altri ioni o piccole molecole.

Infine, benché tra gli obiettivi dell'articolo ci fosse quello di individuare una correlazione tra le conseguenze della formazione di oligomeri di α -sinucleina e l'induzione della ferroptosi, le evidenze raccolte e gli approfondimenti svolti sono stati relativamente limitati. Oltre a modulare la presenza di induttori o inibitori della ferroptosi, si sarebbero potute analizzare infatti anche le conseguenze che l'aumento di α -sinucleina a livello citosolico poteva avere su altri importanti pathway coinvolti in questo processo: ad esempio, si sarebbe potuto indagare se la loro presenza inibisse il funzionamento dell'enzima GPX4, o inducesse l'attivazione della lipossigenasi (LOX), o portasse ad una deplezione del glutatione citosolico.

In conclusione, i dati raccolti nell'articolo hanno dimostrato che l'oligomerizzazione dell' α -sinucleina comporta perossidazione nei lipidi di membrana, alterandone da un lato la permeabilità, con conseguente deregolazione dei flussi ionici, e dall'altro portando a morte cellulare tramite ferroptosi. Malgrado gli studi effettuati in questo articolo, molto resta ancora da chiarire relativamente ai meccanismi con cui avvengono questi processi.

5 BIBLIOGRAFIA

- [1] 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.
- [2] Deas E, Cremades N, Angelova PR, et al. Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(7):376-391
- [3] Fecchio C, De Franceschi G, Relini A, et al. α -Synuclein oligomers induced by docosahexaenoic acid affect membrane integrity. *PLoS One*. 2013;8(11):e82732. Published 2013 Nov 29.
- [4] Shults CW. Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1661-1668.
- [5] Meade RM, Fairlie DP, Mason JM. Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease - lessons and emerging principles. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):29. Published 2019 Jul 22.
- [6] Ludtmann MHR, Angelova PR, Horrocks MH, et al. α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nat Commun*. 2018;9(1):2293. Published 2018 Jun 12
- [7] Angelova PR, Horrocks MH, Klenerman D, Gandhi S, Abramov AY, Shchepinov MS. Lipid peroxidation is essential for α -synuclein-induced cell death. *J Neurochem*. 2015;133(4):582-589
- [8] Angelova PR, Ludtmann MH, Horrocks MH, et al. Ca^{2+} is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity. *J Cell Sci*. 2016;129(9):1792-1801
- [9] Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(4):266-282
- [10] Reichert CO, de Freitas FA, Sampaio-Silva J, et al. Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8765. Published 2020 Nov 20