

Nicoletta Plotegher

La biofisica delle proteinopatie: il caso speciale della malattia di Parkinson

ABSTRACT: Proteinopathies are a large class of pathologies associated to the formation of protein aggregates toxic for the cells in which they are deposited. These proteinaceous inclusions are constituted by a protein, specific for each pathology, which acquires a characteristic fibrillary structure. The formation of these aggregates reduces the amount of functional protein in the cells, hampering its capacity to perform its normal functions. Moreover, aggregates acquire detrimental functions towards cells that are mediated by different molecular mechanisms. We still do not fully understand what can impact on the aggregation propensity of the different proteins, what are the factors that can affect the aggregation process and what are the mechanisms through which this becomes dangerous for cell survival. The most known proteinopathies are those that affect the central nervous system, as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. In the latter, the protein that is converted to oligomers and eventually to amyloid fibrils is termed alpha-synuclein. Alpha-synuclein is a small protein localized at the pre-synaptic terminal, responsible for the function of the synapse in physiological conditions. In pathogenic conditions, it is instead prone to aggregation, it forms aggregates that become toxic to neurons. Biophysics has had a fundamental role in the study of alpha-synuclein aggregation process and in the characterization of the key players and molecules able to accelerate or hamper the formation of oligomers and amyloid fibrils. Moreover, the structure of these aggregates at the atomic level was determined by means of biophysical methods. Finally, in combination with other fields, as biochemistry and cell biology, biophysics has allowed to identify how aggregates and aggregation can contribute to neuronal damage in a more physiological environment, as the one found in Parkinson's disease cellular models. In this article, proteinopathies will be introduced and the specific case of Parkinson's disease will be described, taking into account symptomatology and pathological features, to move towards the characteristics of the aggregation process and of the alpha-synuclein aggregates, as studied using biophysical methods. The role of these aggregates in the etiopathogenesis and in the progression of the pathology will be also discussed. Finally, the importance of biophysical studies on alpha-synuclein aggregation in developing new diagnostic tools and in the discovery of new therapeutic strategies for Parkinson's disease will be underlined.

KEY WORDS: Proteinopathies, Parkinson's disease, Amyloid fibrils, Alpha-synuclein, Biophysics, Protein aggregation.

Nicoletta Plotegher, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova, Via U. Bassi 58b, 35131 Padova (Italia), email: nicoletta.plotegher@unipd.it.

RIASSUNTO: Le proteinopatie sono una vasta classe di patologie associate alla formazione di aggregati proteici tossici per le cellule in cui si depositano. Queste inclusioni proteinacee sono costituite da una proteina, specifica per ogni patologia, che si struttura in quelle che vengono chiamate fibrille amiloidi. La formazione di questi aggregati è un problema perché sottrae la proteina alle sue funzioni essenziali all'interno della cellula, ma anche perché queste strutture aggregate acquisiscono funzioni dannose, mediate da diversi meccanismi molecolari. Che cosa alteri la propensione all'aggregazione di queste proteine, che cosa influenzi il processo di aggregazione e tramite quali meccanismi questo diventi pericoloso per la sopravvivenza cellulare è stato oggetto di studi intensivi negli anni passati, e lo è ancora. Le proteinopatie più note sono certo quelle che colpiscono il sistema nervoso centrale, quali per esempio la malattia di Alzheimer e quella di Parkinson. Nel caso di quest'ultima, la proteina che viene convertita in oligomero e poi in fibrilla amiloide è l'alfa-sinucleina. L'alfa-sinucleina è una piccola proteina localizzata al terminale presinaptico che svolge, in condizioni fisiologiche, funzioni legate al funzionamento delle sinapsi. In condizioni patogeniche invece, la proteina tende ad aggregare e diventa tossica per i neuroni. La biofisica ha avuto e ha un ruolo fondamentale nello studio dell'aggregazione dell'alfa-sinucleina e nella caratterizzazione degli elementi o delle molecole in grado di accelerare o rallentare il processo di formazione di oligomeri e di fibrille amiloidi. Inoltre, grazie alla biofisica siamo riusciti a caratterizzare la struttura dei vari aggregati con un livello di dettaglio atomico. Infine, combinandosi con altre discipline come la biochimica e la biologia cellulare, la biofisica ha permesso e permette di identificare in che modo, in contesti più simili a quelli fisiologici come quello dei modelli cellulari per la malattia di Parkinson, l'aggregazione e gli aggregati contribuiscano al danno neuronale. In questo articolo vengono introdotte le proteinopatie e viene descritto il caso specifico della malattia di Parkinson, partendo dalle sue caratteristiche sintomatologiche e patologiche, per poi passare alle caratteristiche del processo di aggregazione e degli aggregati di alfa-sinucleina studiati con metodi biofisici, e del loro ruolo nell'insorgenza e nella progressione della patologia. Infine, viene discussa l'importanza dello studio biofisico di questi meccanismi anche dal punto di vista traslazionale, per il ruolo che potrebbero avere determinati risultati nella ricerca di metodi per la diagnosi precoce e nello sviluppo di nuovi trattamenti per la malattia di Parkinson.

PAROLE CHIAVE: Proteinopatie, Malattia di Parkinson, Fibrille amiloidi, Alfa-sinucleina, Biofisica, Aggregazione di proteine.

Cosa sono le proteinopatie e che cosa ha a che vedere la biofisica con queste patologie?

Le proteinopatie sono una classe di malattie molto ampia, possono colpire organi diversi, tra cui il cervello, e sono caratterizzate principalmente da difetti in alcune proteine oppure da condizioni patologiche che le rendono prone all'aggregazione, cioè alla formazione di agglomerati costituiti da più di una unità proteica.

Le proteine sono piccole macchine dalla struttura e dalla funzionalità definite (anche se siamo ben lontani dall'aver compreso i compiti e i meccanismi di funzionamento di ciascuna di esse) che regolano ogni singola attività delle cellule che compongono il nostro organismo. Da un lato, quindi, l'aggregazione di una proteina determina una perdita di funzionalità dei processi da

essa regolati, dall'altro gli aggregati proteici che ne derivano (parleremo poi più nel dettaglio di che cosa si intende con la parola "aggregati") hanno la possibilità di acquisire delle funzioni potenzialmente dannose per la cellula e per il tessuto in cui si accumulano.

Queste malattie sono spesso definite 'amiloidosi' perché gli aggregati proteici che le caratterizzano sono insolubili e organizzati in strutture ordinate chiamate fibrille amiloidi, che hanno proprietà biofisiche molto peculiari. Le proteinopatie forse più note sono le molte che interessano il sistema nervoso centrale, tra cui la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson. Queste patologie sono neurodegenerative, cioè associate ad un progressivo ed inarrestabile (almeno per lo stato attuale delle nostre conoscenze) danneggiamento delle cellule neuronali del sistema nervoso. Ciascuna di esse colpisce preferenzialmente una certa regione dell'encefalo ed è caratterizzata dalla presenza di fibrille amiloidi costituite principalmente da una specifica proteina.

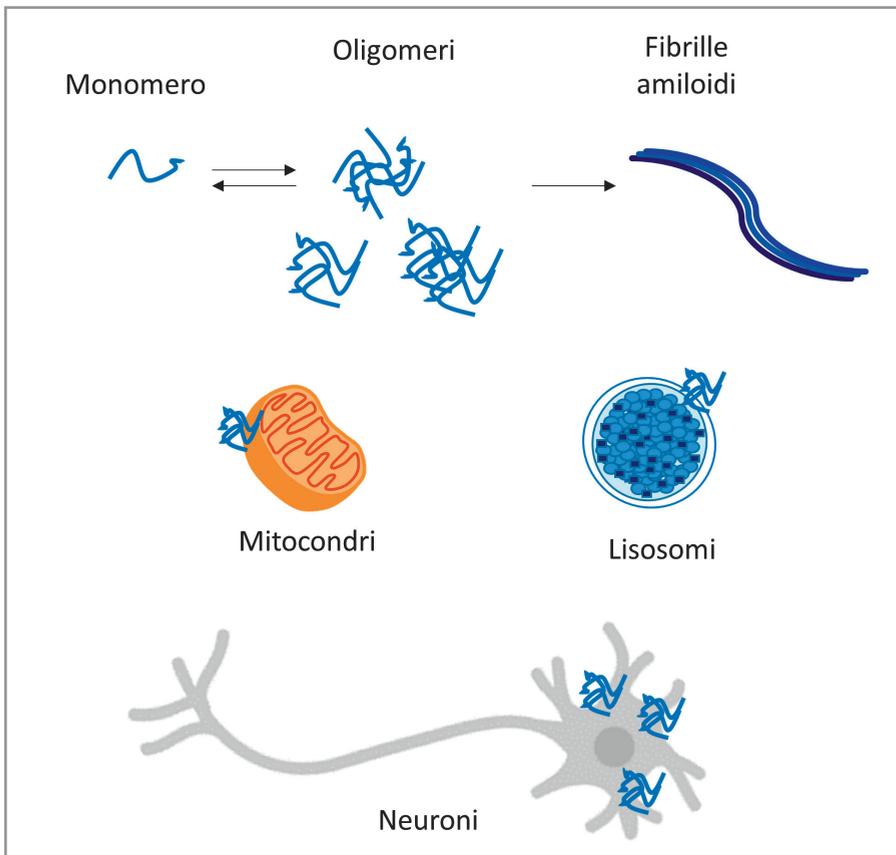
'Preferenzialmente' è una parola cruciale, perché spesso gli aggregati in questione vengono ritrovati anche al di fuori delle zone del cervello maggiormente coinvolte. Quel che si osserva è che gli aggregati sono spesso presenti anche in altre regioni del sistema nervoso, o in neuroni del sistema enterico (quella parte di sistema nervoso che regola le funzioni fondamentali dell'apparato digerente), che si trova in prossimità degli organi del tubo digerente, ben lontani quindi dal cervello. Tuttavia, una prevalente presenza di aggregati in una regione specifica o in un tipo di neuroni specifico spiega bene parte dei sintomi principali della patologia.

Inoltre, è cruciale precisare che, sebbene queste forme fibrillari di una determinata proteina siano un importante elemento distintivo di ciascuna patologia, sono solo una parte delle molecole che compongono gli aggregati insolubili che sono stati identificati dall'analisi *post mortem* dei tessuti dei pazienti deceduti. Queste deposizioni, presenti all'interno delle cellule colpite o nello spazio extracellulare, sono infatti composte anche da altre proteine che possono co-aggregare con la proteina fibrillare principale, e da molecole lipidiche.

La ricerca in ambito biomedico si è occupata e si occupa di cercare di comprendere i meccanismi che promuovono la formazione di questi aggregati e quali siano le conseguenze per la fisiologia, cioè il funzionamento, delle cellule colpite e più in generale delle aree del cervello che sono caratterizzate dalla presenza di queste inclusioni. Lo scopo ultimo è quello di cercare dei metodi per interferire con la formazione di questi aggregati dannosi o, nel caso si arrivi più tardivamente, di promuovere dei meccanismi intracellulari per rimuoverli in maniera possibilmente indolore per i neuroni o i tessuti in cui sono localizzati.

È interessante notare che, in queste patologie neurodegenerative che presentano aggregati, spesso i sintomi si presentano quando una parte dei neuroni maggiormente coinvolti nella patologia è già degenerato e la presenza di deposizioni proteiche e lipidiche è già diffusa. Da qui la necessità di ideare dei metodi per intervenire su queste inclusioni quando sono già formate e di limitarne i danni. Ben più auspicabile sarebbe comunque lo sviluppo di sistemi di diagnosi precoce che ci permettano di identificare la formazione di aggregati nelle prime fasi del processo di aggregazione e quindi di intervenire ben prima che la situazione sia compromessa. Uno dei metodi su cui la ricerca sta molto investendo è proprio quello di valutare la presenza di aggregati al presentarsi dei primi sintomi della patologia, o addirittura in una fase definita prodromica. La strategia più interessante è quella di utilizzare dei marcatori che siano in grado di riconoscere in maniera specifica gli aggregati, che possano essere somministrati facilmente ai pazienti e che riescano a raggiungere il sistema nervoso dal circolo ematico. L'ultima caratteristica essenziale di questi marcatori è quella di essere visualizzabili tramite le tecniche di imaging non invasivo utilizzate per studiare il sistema nervoso, come per esempio la PET (tomografia a emissione di positroni) (1). Ulteriore interesse diagnostico nei confronti di questi aggregati è la loro identificazione nei fluidi corporei. Infatti, nonostante gli aggregati si formino principalmente nel cervello o in altre parti del sistema nervoso periferico, essi possono essere trovati anche nell'ambiente extracellulare e quindi nel liquido cerebrospinale, nel sangue o, anche se a concentrazioni decisamente più limitate, nella saliva (2). In tutte queste situazioni, sono necessari sistemi di identificazione che non si basino solo sull'identità della proteina prona all'aggregazione, che potrebbe essere comunque presente nei biofluidi considerati, ma anche e soprattutto sulla struttura degli aggregati proteici.

Un altro aspetto interessante di queste patologie è il fatto che, sebbene le proteine coinvolte siano caratteristiche per ogni determinata patologia, la struttura 'comune' dell'aggregato insolubile è quella di una fibrilla amiloide. Dal punto di vista biofisico quindi, questi oggetti hanno strutture analoghe, indipendentemente dalla proteina che costituisce la singola unità fondamentale, che è chiamata monomero. Infatti, per quanto la struttura tridimensionale del monomero di queste proteine che possono andare incontro ad aggregazione in fibrille amiloidi possa essere varia in condizioni fisiologiche, in seguito a mutazioni o condizioni che li rendono prони all'aggregazione, i monomeri tendono ad oligomerizzare. La formazione di questi oligomeri avviene con un primo cambio di conformazione dei monomeri di proteina, che quindi si assemblano in oligomeri formati da poche unità fino a decine di



1. Schematica rappresentazione del processo di aggregazione per la proteina amiloidogena alfa-sinucleina. Il monomero di alfa-sinucleina, in condizioni patogeniche, tende ad aggregare, formando un insieme eterogeneo di oligomeri, che vengono poi convertiti in fibrille amiloidi, strutture ordinate costituite da molti oligomeri in cui l'alfa-sinucleina è ripiegata in foglietti beta. Oligomeri e fibrille di alfa-sinucleina sono responsabili di eventi tossici potenzialmente letali per i neuroni in cui si formano, tra cui danni alle membrane lipidiche, disfunzioni mitocondriali e danneggiamento del sistema autofagico lisosomiale del neurone.

unità monomeriche. Questi oligomeri intermedi sono un insieme di oggetti molto eterogeneo, costituito da multimeri della proteina monomerica, che poi tendono ad assemblarsi ulteriormente in strutture fibrillari. In Figura 1 è mostrato lo schema del processo di aggregazione di una di queste proteine, l'alfa-sinucleina, legato all'insorgenza della malattia di Parkinson. Mentre gli oligomeri possono avere strutture e morfologie variabili e sono poco stabili

nel tempo, poiché vengono in larga misura convertiti in fibrille, la struttura di queste ultime è ben definita e ha delle analogie anche se le patologie (e quindi le proteine aggregate) sono diverse.

Si è dimostrato che le specie oligomeriche intermedie e le fibrille stesse possono essere responsabili almeno in parte della neurodegenerazione. Le azioni tossiche attribuite a questi aggregati sono molteplici e vanno dal danneggiamento delle membrane che costituiscono le cellule, o dei mitocondri (quegli organelli che producono l'energia necessaria per il funzionamento delle cellule, oltre a svolgere altri ruoli chiave per il metabolismo cellulare), al danneggiamento del sistema intracellulare deputato al riciclo di molecole o organelli disfunzionali (chiamato sistema autofagico-lisomiale), fino alla stimolazione di processi di neuroinfiammazione cronica che esitano in disfunzione e morte neuronale (Figura 1) (3).

Alla luce di queste considerazioni non apparirà certo un mero esercizio accademico lo studio delle proprietà biofisiche delle fibrille, o degli aggregati intermedi menzionati in precedenza. Oppure delle caratteristiche cinetiche (cioè temporali) del processo di aggregazione. Infatti, grazie a questi studi, è possibile da un lato comprendere nel dettaglio come e in che misura questi vari tipi di aggregati contribuiscano al danno neuronale e tissutale, e dall'altro ideare nuove strategie terapeutiche basate sull'eliminazione di oligomeri o fibrille o su metodi che interferiscano con la loro formazione. Inoltre, la caratterizzazione di questi aggregati può permettere lo sviluppo di tecnologie per la loro identificazione nell'uomo e nei suoi biofluidi, che facilitino la diagnosi e la valutazione della progressione della patologia.

Per questi studi biofisici sono necessari metodi avanzati che abbracciano un ampio spettro di tecniche. Per discutere di come la biofisica abbia contribuito alla comprensione di alcuni meccanismi importanti per l'aggregazione patologica delle proteine nel contesto della neurodegenerazione, ci focalizzeremo ora sulla malattia di Parkinson e sulla proteina neuronale chiamata alfa-sinucleina, la cui aggregazione è associata all'eziogenesi della patologia.

Il caso notevole della malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson è la seconda malattia neurodegenerativa più comune dopo la malattia di Alzheimer. Nel mondo si stima che le persone affette da questa patologia fossero circa 6,1 milioni nel 2016, e gli studi di previsione suggeriscono che nel 2050 il numero di pazienti sarà circa raddoppiato (4).

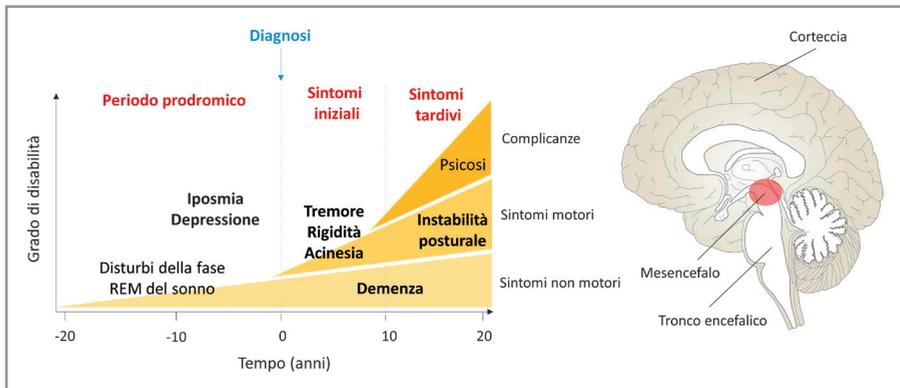
Questa patologia colpisce circa l'1% della popolazione sopra i 65 anni, e

l'incidenza aumenta all'aumentare dell'età. Nel 90% dei casi circa la malattia di Parkinson ha eziologia sporadica, cioè è di origine ignota, oppure è legata a fattori di rischio ambientali, come l'esposizione a pesticidi e altri agenti tossici. Nel restante 10% dei casi, invece, la patologia ha origine genetica. Sono stati identificati non soltanto geni le cui mutazioni sono causa della malattia (per i quali cioè è noto che, se si porta la mutazione, presto o tardi si contrarrà la patologia), ma anche geni le cui mutazioni sono fattori di rischio che aumentano la probabilità di sviluppare la malattia nel corso del tempo e che concorrono con gli altri fattori di rischio noti, quali per esempio l'età (di gran lunga il più importante) e quelli ambientali. Le forme genetiche, sebbene abbiano nella maggior parte dei casi una sintomatologia simile alle forme sporadiche, hanno in alcuni casi un'insorgenza precoce, cioè i primi sintomi si presentano quando i pazienti sono ben più giovani rispetto all'età media della popolazione afflitta dalla malattia (5).

Sebbene la malattia di Parkinson sia, dal punto di vista sintomatologico, prevalentemente nota per le disfunzioni motorie che caratterizzano la maggior parte delle sue manifestazioni (tra cui il notissimo tremore a riposo, la bradicinesia e l'acinesia), i sintomi non motori sono comuni e spesso contribuiscono in maniera determinante al peggioramento della qualità della vita dei pazienti (Figura 2). Tra di essi è bene ricordare l'anosmia (tra i primi sintomi a manifestarsi in moltissimi casi), l'ansia e la depressione, anche questi tra i sintomi precoci, i disturbi del sonno e, più avanti nel tempo, deficit cognitivi che possono culminare con una vera e propria demenza (6).

La causa della sintomatologia in questa patologia (almeno per quanto riguarda i deficit nelle capacità motorie) è la progressiva neurodegenerazione di una classe di neuroni detti neuroni dopaminergici, localizzati in particolare modo nella *substantia nigra pars compacta* del mesencefalo. Il principale neurotrasmettitore di questi neuroni è la dopamina ed essi sono quelli maggiormente coinvolti nella regolazione delle funzioni motorie. Non è invece ancora molto chiaro, né molto studiato, quale sia a livello cellulare e molecolare la causa dei sintomi non motori precedentemente menzionati.

La comunità medica non dispone in questo momento di una cura per la malattia di Parkinson. I trattamenti a disposizione dei neurologi sono utili soltanto ad alleviare la sintomatologia (specialmente per quanto riguarda i sintomi motori). Il principale farmaco utilizzato è la levodopa, un precursore della dopamina, neurotrasmettitore carente nei pazienti a causa della neurodegenerazione e morte dei neuroni dopaminergici. La levodopa somministrata ai pazienti viene convertita in dopamina dai neuroni superstiti e garantisce quindi l'approvvigionamento di questo neurotrasmettitore, compensando



2. Schematica rappresentazione temporale della presentazione dei sintomi nella malattia di Parkinson, dalla fase prodromica, a quella iniziale e a quella finale della patologia, suddivisi per sintomi non motori, sintomi motori e complicanze. Sulla destra, una rappresentazione schematica del cervello, e la localizzazione della regione più coinvolta nella patologia. Il mesencefalo ospita infatti la *substantia nigra pars compacta*, cioè quella zona in cui i neuroni dopaminergici risultano danneggiati o morti nei pazienti affetti dalla malattia di Parkinson.

la perdita di funzionalità dei neuroni danneggiati dalla patologia o la loro morte. Purtroppo, la levodopa non funziona per tutti i pazienti e in alcuni casi c'è una perdita di responsività nel tempo che impedisce di tenere sotto controllo i sintomi motori. Altri farmaci vengono utilizzati come coadiuvanti della levodopa, per esempio risparmiatori di dopamina, oppure altre medicine utili ad alleviare i sintomi non motori, come per esempio ansiolitici e antidepressivi. Nessuno di questi è naturalmente in grado di rallentare o fermare la patologia o di revertire i danni accumulati.

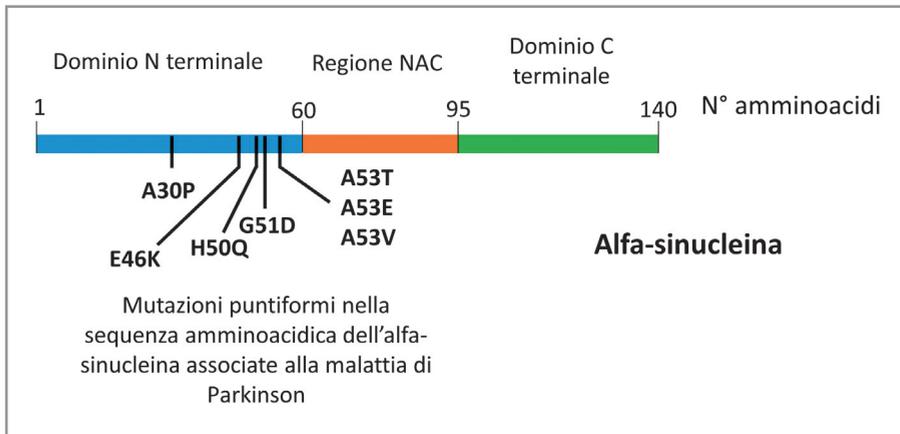
Il ruolo cruciale della proteina alfa-sinucleina nella malattia di Parkinson

Dal punto di vista istopatologico, la caratteristica principale della malattia di Parkinson è la presenza di inclusioni intracellulari di proteine e lipidi, chiamate corpi di Lewy, nei neuroni che sopravvivono. Da un'analisi *post mortem* dei cervelli dei pazienti deceduti con la patologia, si è scoperto che la componente principale di queste inclusioni è una forma aggregata fibrillare di una proteina chiamata alfa-sinucleina (7). L'alfa-sinucleina è una proteina 'piccola', costituita cioè da 140 amminoacidi e dal peso molecolare di 14461 Dalton. È loca-

lizzata principalmente al terminale presinaptico del neurone, dove è coinvolta nei meccanismi fondamentali che regolano il rilascio dei neurotrasmettitori e quindi la funzionalità sinaptica. Mentre la maggior parte delle proteine è caratterizzata da una struttura secondaria (tridimensionale), determinata dagli amminoacidi da cui è composta e dalle loro proprietà a livello di carica, polarità e interazione con gli amminoacidi adiacenti, oltre che dalle modificazioni post-traduzionali a cui le proteine possono andare incontro, l'alfa-sinucleina monomerica ha la peculiare caratteristica di non avere una struttura ben definita. Questo significa che assume delle conformazioni tridimensionali in maniera dipendente dall'interno chimico-biologico in cui si trova e dalle interazioni che stabilisce con altre proteine e con strutture lipidiche. In particolare, è stato dimostrato che l'alfa-sinucleina è in grado di interagire con vescicole sinaptiche e membrane lipidiche con un'affinità che dipende dalla curvatura delle membrane in questione e dalla loro carica elettrica. A causa di tale interazione, la proteina assume una struttura secondaria detta ad alfa-elica nella sua parte iniziale. Inoltre, l'alfa-sinucleina viene talvolta definita una proteina 'sociale', nel senso che, per svolgere la sua funzione nel mantenimento dell'attività al terminale presinaptico, interagisce con gran numero di altre proteine (8).

I corpi di Lewy ricchi di fibrille di alfa-sinucleina sono stati trovati nei neuroni dei pazienti affetti da forme idiopatiche della patologia, ma anche in quelli affetti da forme genetiche. Tra queste, di particolare importanza in relazione all'alfa-sinucleina, quelle causate da mutazioni nel gene *SNCA*, cioè proprio quello che codifica per questa proteina. In particolare, sono per il momento state identificate varie mutazioni puntiformi, cioè in un singolo amminoacido della proteina, nella sua regione centrale (Figura 3). Stando agli studi comparativi tra l'alfa-sinucleina e i suoi mutanti patologici, in queste forme genetiche della patologia legate a mutazioni in *SNCA*, sono le variazioni indotte dalla sostituzione di un singolo amminoacido della proteina che ne aumentano la propensione all'aggregazione, in maniera diretta o indiretta. È interessante notare che anche duplicazioni e triplicazioni del gene *SNCA* causano la malattia. E, come è logico ipotizzare e come è stato poi provato sperimentalmente, in questo caso è l'aumento della concentrazione della proteina indotta da queste moltiplicazioni del gene che la codifica ad indurre un'incrementata velocità di aggregazione.

Molto interessante dal punto di vista della ricerca e della patogenesi di queste malattie è il fatto che aggregati di alfa-sinucleina si ritrovino anche in altre patologie, come per esempio nell'atrofia multi-sistemica, e non soltanto nei neuroni ma anche negli oligodendrociti, un tipo di cellule del sistema nervoso che svolgono funzioni di supporto ai neuroni (9).

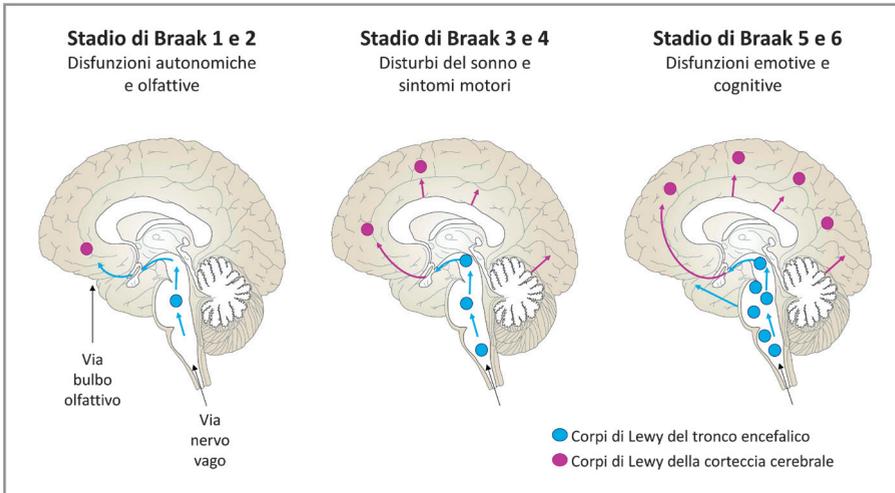


3. Schema rappresentante la sequenza amminoacidica dell'alfa-sinucleina, suddivisa nei suoi tre domini fondamentali: la regione N terminale, coinvolta nell'interazione della proteina con le membrane cellulari; il dominio NAC (acronimo della locuzione inglese *non-amyloid beta component*), principalmente coinvolto nell'aggregazione della proteina, e il dominio C terminale, che rimane non strutturato ed è coinvolto in maniera limitata nelle interazioni che determinano il funzionamento della proteina e la sua aggregazione.

Il fatto che l'alfa-sinucleina fibrillare sia il componente principale dei corpi di Lewy ha suggerito che potessero essere questi aggregati, oppure delle forme oligomeriche di questa proteina formate durante il processo di aggregazione, a determinare il danno neuronale. Questo ha quindi dato il via ad un notevole sforzo per studiare il processo di aggregazione, le caratteristiche degli aggregati e il loro effetto tossico nei confronti dei neuroni e di altri tipi cellulari presenti nel cervello (10).

Si è inoltre osservato che altre proteine possono co-aggregare con l'alfa-sinucleina. Non è ancora chiaro tuttavia a che stadio del processo questo si verifichi, cioè se quando la proteina è in forma monomerică, oligomerică o se quando si è già convertita in fibrille.

Come nel caso di molte altre proteine amiloidogeniche, non sono soltanto mutazioni in un singolo amminoacido o aumenti della concentrazione intracellulare della proteina a causare un'aumentata propensione all'aggregazione, ma anche cambiamenti dell'intorno chimico-biologico della proteina, alterazioni nelle sue modifiche post-traduzionali (cioè quelle che avvengono dopo che la proteina è stata prodotta seguendo le 'informazioni' scritte nel gene che la codifica) e variazioni nella sua localizzazione (11). Questo ha reso necessario quindi lo studio dell'aggregazione dell'alfa-sinucleina non soltanto



4. Stadiazione proposta da Braak per la malattia di Parkinson. La presenza di corpi di Lewy nel tronco encefalico, dove si formano per via del seeding dell'aggregazione da parte dell'alfa-sinucleina che raggiunge la regione dal nervo vago o dal bulbo olfattivo, correla con i sintomi prodromici della malattia (Stadi di Braak 1 e 2); la propagazione dei corpi di Lewy nel tronco encefalico, fino al mesencefalo, all'amigdala e, seppure in maniera limitata, alla corteccia, sono associati ai sintomi motori classici (Stadi 3 e 4); nelle fasi più avanzate della patologia, i corpi di Lewy si diffondono estensivamente nelle varie regioni della corteccia, causando deficit cognitivi e comportamentali (Stadi 5 e 6).

in un contesto semplificato utilizzando la proteina ricombinante, cioè prodotta per questo scopo *in vitro*, ma anche lo studio della sua aggregazione in modelli cellulari e neuronali per la patologia, che tenessero conto quindi non solo delle caratteristiche stesse della proteina, ma anche del contesto in cui essa si trova ad operare.

Infine, è necessario sottolineare che, sebbene i neuroni dopaminergici sembrano quelli più vulnerabili nella patologia, per ragioni probabilmente riconducibili alle loro caratteristiche fisiologiche, gli aggregati della proteina alfa-sinucleina si trovano anche in altre regioni del cervello, in neuroni che non sono dopaminergici, e addirittura nei neuroni del sistema enterico e periferico.

In tale contesto, è stato anche proposto un metodo per stadiare la progressione della patologia dal punto di vista istopatologico, detto 'staging di Braak' (dal nome del medico tedesco che lo ha per la prima volta proposto) (12). Secondo il professor Heiko Braak, infatti, la stadiazione istopatologica della malattia di Parkinson può essere effettuata studiando la presenza degli aggregati di alfa-sinucleina in varie regioni del sistema nervoso. La loro pre-

senza nella *substantia nigra pars compacta*, cioè la zona maggiormente colpita e in altre regioni del cervello ben correla infatti con i sintomi e la progressione della patologia. Gli aggregati di alfa-sinucleina si diffondono dal nervo vago al bulbo olfattivo in una prima fase (quella prevalentemente asintomatica, o con sintomi minori come l'anosmia), fino al tronco encefalico (quando si manifestano i sintomi motori e i disturbi del sonno). Agli stadi più avanzati della malattia, durante i quali i sintomi includono anche deficit cognitivi e disturbi del comportamento, gli aggregati si possono trovare anche nella corteccia cerebrale (13). Così come il processo di aggregazione dell'alfa-sinucleina è stato intenso oggetto di studi negli ultimi 25 anni, anche la diffusione degli aggregati nel sistema nervoso come modalità di progressione della patologia è stato estensivamente investigato.

La biofisica dell'aggregazione dell'alfa-sinucleina

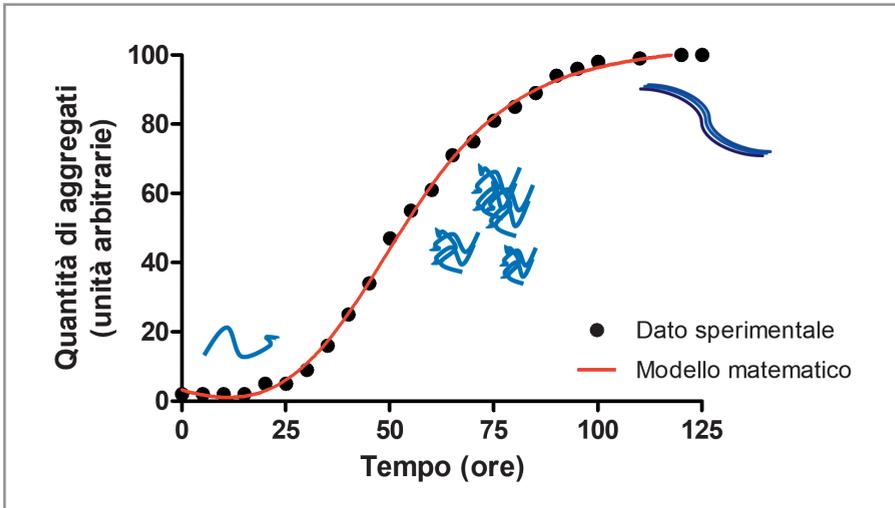
Dal 1997, quando per la prima volta è stato scoperto che la proteina alfa-sinucleina in una forma fibrillare (7) è il maggior costituente dei corpi di Lewy, una parte della comunità scientifica, specializzata nello studio dei meccanismi molecolari della patologia o nella biofisica che regola le interazioni molecolari tra proteine e i loro processi di aggregazione, ha orientato i suoi sforzi verso la codifica delle caratteristiche di questo processo e verso la comprensione dei possibili approcci per interferire con la formazione di aggregati di alfa-sinucleina tossici per i neuroni.

Studi di cinetiche di aggregazione e rilevanza per la patologia

Uno degli aspetti più interessanti riguardo allo studio dell'aggregazione dell'alfa-sinucleina è la caratterizzazione della sua cinetica di aggregazione. Per cinetica di aggregazione si intende, in questo ambito, l'andamento della formazione di aggregati potenzialmente tossici nel tempo.

In Figura 5 si può osservare un esempio di studio della cinetica di aggregazione dell'alfa-sinucleina. La curva di formazione degli aggregati nel tempo segue un tipico andamento sigmoidale: ad una prima fase di crescita zero, in cui cioè gli aggregati che si formano sono ancora troppo pochi o troppo "piccoli" per essere misurati, segue una seconda fase in cui la formazione dei primi multimeri cresce con un andamento esponenziale, per poi assestarsi su un plateau.

Per studiare l'aggregazione dell'alfa-sinucleina *in vitro* si utilizza la proteina ricombinante, cioè la proteina umana prodotta però in un sistema di espressione eterologo (cioè che normalmente non la produrrebbe). Nel caso



5. Esempio empirico di cinetica di aggregazione dell'alfa-sinucleina e relativo modello matematico che ne descrive l'andamento.

dell'alfa-sinucleina il sistema scelto è il batterio *Escherichia coli*, perché semplice, economico ed in grado di produrre la proteina identica a quella che si trova nei neuroni nell'uomo (salvo modifiche post-traduzionali, che nel caso devono essere introdotte con metodi particolari). La proteina viene fatta produrre dal batterio tramite metodi di biologia molecolare e purificata utilizzando metodi di biochimica. Per indurre poi l'aggregazione si agisce su alcune condizioni fondamentali che sono in grado di favorire il processo di oligomerizzazione e fibrillazione dell'alfa-sinucleina, quali la temperatura, la forza ionica della soluzione in cui la proteina è disciolta, la velocità di agitazione della soluzione proteica e la presenza in soluzione di molecole in grado di favorire o ritardare l'aggregazione.

I metodi biofisici che permettono di studiare l'andamento dell'aggregazione dell'alfa-sinucleina, ma anche di altre proteine amiloidogeniche, sono basati su due principi: (i) lo studio della variazione nella struttura secondaria (tridimensionale) della proteina che aggrega e (ii) il monitoraggio delle dimensioni degli oggetti che si formano a causa dell'aggregazione nel tempo.

Nel primo caso si utilizzano delle molecole in grado di legarsi alla tipologia di struttura secondaria che si forma nel momento in cui la proteina aggrega. È il caso per esempio del colorante fluorescente 'tioflavina T': questa molecola infatti si intercala nelle fibrille di alfa-sinucleina che si formano, perché è in

grado di legarsi alla struttura tridimensionale che la proteina assume in questi aggregati, che è a foglietti beta (si veda il paragrafo '*Studi delle caratteristiche e delle strutture degli aggregati*' per i dettagli a tal proposito). Quando legata a queste strutture la tioflavina T, se illuminata con luce di fluorescenza caratterizzata da una lunghezza d'onda di 440 nm, emette luce di colore verde (ad una lunghezza d'onda cioè tra 480 e 500 nm). L'intensità della luce emessa può essere misurata usando degli appositi strumenti detti fluorimetri: maggiore è la quantità di fibrille, maggiore sarà la quantità di tioflavina T legata e quindi maggiore sarà l'intensità della luce di fluorescenza emessa. Seguendo l'andamento di quest'intensità nel tempo è possibile studiare l'andamento dell'aggregazione della proteina.

La seconda possibilità è quella di utilizzare dei sistemi per valutare la dimensione degli oggetti presenti nella soluzione proteica, e poter quindi monitorare la variazione della presenza in soluzione di aggregati di dimensioni superiori al monomero. Trattandosi di oggetti che hanno dimensioni di poche decine di nanometri, fino ad un massimo di qualche micrometro di lunghezza per circa 8-10 nm di diametro nel caso delle fibrille, va da sé che i metodi utilizzati siano necessariamente indiretti. Un classico esempio è un metodo biofisico piuttosto raffinato, basato sulla risposta alla luce polarizzata da parte di fluorofori legati a oggetti di dimensioni variabili. La luce emessa in risposta a questo stimolo luminoso può essere misurata, e lo studio della sua polarizzazione può essere effettuato con dei fluorimetri equipaggiati con filtri e polarizzatori non dissimili da quelli degli apparecchi fotografici.

L'aspetto più interessante è che la misura di polarizzazione di fluorescenza di un fluoroforo legato ad un oggetto di pochi nanometri sarà inferiore a quella di oggetti grandi decine di nanometri. Questo permette, nel caso dell'alfa-sinucleina e una volta che un fluoroforo viene legato ad essa con metodi biochimici, di monitorare la polarizzazione di fluorescenza della proteina nel tempo, e di conseguenza le dimensioni degli aggregati in soluzione.

Da notare come la polarizzazione di fluorescenza sia un parametro che viene influenzato anche da altri fattori, come la viscosità della soluzione in cui la proteina viene disciolta. Nel caso di studi in condizioni che non alterino altri parametri, il problema non è rilevante al fine dei risultati. Tuttavia se, per esempio, una molecola di cui vogliamo studiare l'effetto sulla cinetica di aggregazione, ha proprietà chimico-fisiche in grado di alterare anche la viscosità della soluzione, questa questione andrà considerata in maniera attenta.

In generale, gli studi delle cinetiche di aggregazione dell'alfa-sinucleina risultano interessanti nel momento in cui vengono utilizzati per confrontare l'evoluzione dell'aggregazione nella proteina rispetto ai mutanti patologici

(cioè quelle forme della proteina che sono prodotte quando il gene che codifica per essa porta una mutazione che si riflette nella sequenza amminoacidica della proteina) oppure quando si vuole valutare l'effetto di una molecola in grado di alterare la velocità e/o la formazione degli aggregati.

Una volta ottenuti dei dati sperimentali che descrivono l'andamento della cinetica di aggregazione dell'alfa-sinucleina (o di un'altra proteina con un comportamento simile) è necessario, per avere informazioni quantitative sul fenomeno, applicare dei modelli matematici che possano ben descrivere i dati ottenuti (14). Questo permette di definire dei parametri e stabilire come singole mutazioni o determinate molecole possano influenzarli, in maniera più o meno significativa. I modelli utilizzabili sono molteplici: in Figura 5, per esempio, l'equazione utilizzata per parametrizzare i dati sperimentali è la seguente:

$$Y = (y_i + m_i \cdot x) + \frac{(y_f + m_f \cdot x)}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{\tau}}}$$

Dove Y descrive il processo di aggregazione, $(y_i + m_i \cdot x)$ descrive la pendenza della curva prima che inizi a crescere, mentre $(y_f + m_f \cdot x)$ dà conto della pendenza finale della curva prima del plateau, x_0 è invece valore di tempo al quale l'aggregazione ha raggiunto il 50% del suo massimo, mentre τ tiene conto del tempo trascorso prima che la curva inizi a crescere esponenzialmente.

Senza alcuna pretesa di essere la migliore possibile, per stessa ammissione dei ricercatori che l'hanno proposta (14), quest'equazione non correla in maniera precisa con gli eventi molecolari che determinano l'aggregazione dell'alfa-sinucleina dal punto di vista della biochimica delle proteine, ma ha l'enorme merito di permettere di confrontare in maniera semplice le cinetiche. Per questo motivo, diventa uno strumento utile nello studio analitico delle condizioni e delle molecole in grado di alterare l'andamento dell'aggregazione.

È comunque importante osservare che i risultati ottenuti nella valutazione delle cinetiche di aggregazione dell'alfa-sinucleina, così come quelli di altre proteine amiloidogeniche, vanno sempre considerati anche alla luce del metodo scelto. Per esempio, nel caso del metodo di polarizzazione di fluorescenza descritto in precedenza, una molecola che riduca la velocità di formazione di oggetti compatibili con le dimensioni di una fibrilla, potrebbe comunque portare alla formazione di oligomeri, al limite della rilevabilità per questa tecnica, ma comunque tossici. Trarre la conclusione quindi che la molecola studiata sia *necessariamente* benefica è prematuro, a fronte di un'analisi di questo tipo, e richiederà certamente altri studi complementari.

Un altro aspetto importante è dato dal fatto che questi metodi sono in grado di fornire una misura di insieme della soluzione che si sta studiando, quindi una 'media' degli oggetti presenti, che saranno sicuramente vari (da monomeri che ancora non sono aggregati a oligomeri di varie dimensioni e strutture, fino a fibrille amiloidi lunghe anche alcuni micrometri). La misura effettuata non ci dirà nulla sui rapporti relativi tra le varie specie, soprattutto nelle fasi intermedie dell'aggregazione.

Infine, è importante sottolineare che lo studio di un processo di aggregazione *in vitro*, è limitato dal contesto in cui si opera, cioè una situazione completamente artificiale. Allo stesso tempo, il contesto semplificato permette di trarre conclusioni che non sono influenzate da un ambiente come quello intracellulare o di un modello animale, dove le variabili in gioco sono centinaia e molto difficili da controllare e quantificare in maniera precisa.

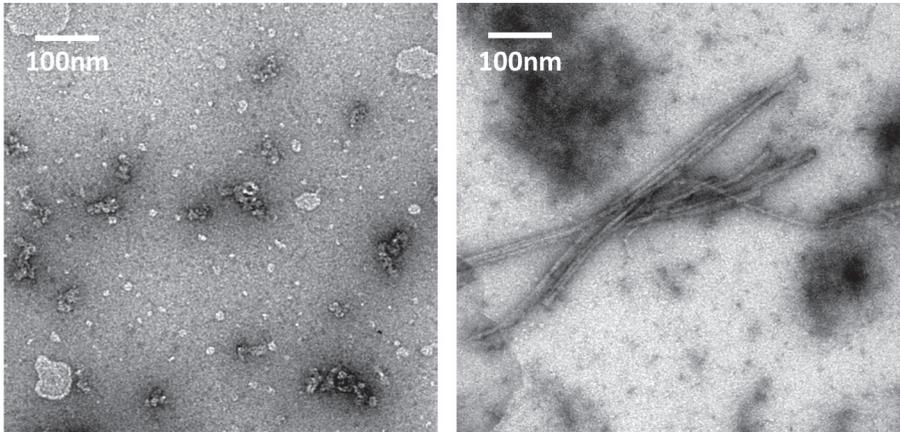
Studi sulle caratteristiche e sulle strutture degli aggregati

Un'altra parte degli studi biofisici sull'aggregazione dell'alfa-sinucleina riguarda la caratterizzazione degli aggregati, a partire dai vari tipi di oligomeri fino alle fibrille, dal punto di vista della morfologia e della struttura anche a livello atomico (distanze cioè dell'ordine di pochi nm).

Come abbiamo discusso in precedenza, l'aggregazione dell'alfa-sinucleina procede per gradi: il monomero forma oligomeri, un insieme eterogeneo e difficile da studiare proprio alla luce di questa eterogeneità. Gli oligomeri si dividono in un sottoinsieme che si converte a fibrille mano a mano che l'aggregazione procede, e in un sottoinsieme che è invece definito *off-pathway*, cioè che non procede fino alla formazione di fibrille amiloidi. Tutte queste forme di aggregati sono di interesse perché potenzialmente coinvolte in vari meccanismi di tossicità neuronale. Ne consegue che la loro caratterizzazione morfologica e strutturale potrebbe fornire informazioni utili a elaborare nuove strategie per interferire con la loro formazione, per favorire la loro eliminazione o per inibirne l'effetto dannoso per le cellule.

Dal punto di vista dello studio della morfologia degli aggregati, le principali metodologie utilizzate sono due: microscopio elettronico e microscopio a forza atomica. Entrambi questi sistemi permettono di raggiungere una risoluzione nell'ordine dei nanometri, ben al di sotto dei limiti imposti dalla microscopia ottica standard e per questo in grado di fornire immagini degli aggregati come quelle mostrate in Figura 6.

Le tecniche di imaging consentono di visualizzare gli aggregati e, una volta ottenuto un adeguato numero di immagini per cui i dati saranno statisticamente solidi, di valutarne l'eterogeneità e misurarne le caratteristiche mor-



6. Esempi di oligomeri (a sinistra) e fibrille (a destra) di alfa-sinucleina osservati con un microscopio elettronico a trasmissione. Il contrasto tra il fascio di elettroni che illumina il campione e l'acetato di uranile utilizzato per 'colorare' le proteine, permette di osservare la morfologia degli aggregati e di stimarne le dimensioni (immagini realizzate presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova).

fometriche. Sebbene questi metodi forniscano un sistema per classificare gli aggregati sulla base della loro caratteristiche morfologiche in funzione delle mutazioni patologiche della proteina o delle molecole utilizzate per interferire con la formazione di oligomeri e fibrille, non danno indicazioni strutturali o atomiche, precludendo quindi l'accesso ad informazioni importanti per comprendere quali sono gli elementi che determinano la propensione all'aggregazione della proteina.

Dagli studi strutturali è infatti ormai noto che, mentre la proteina monomerică è non strutturata (cosa di per sé non così frequente) in condizioni normali, l'alfa-sinucleina acquisisce una struttura secondaria (cioè tridimensionale) quando interagisce con le membrane lipidiche che delimitano le cellule e altri organelli intracellulari: in questo caso la parte iniziale della proteina si struttura in una conformazione che viene definita ad alfa-elica, mentre la parte terminale rimane non strutturata.

Nel caso degli aggregati, invece, sia oligomerici che fibrillari, si tratta di oggetti che hanno acquisito una struttura alternativa a quella 'fisiologica' della proteina, definita a foglietti beta. Questo si può verificare sia nel caso degli oligomeri, ed è ormai ben noto nel caso delle fibrille amiloidi.

Per ottenere queste informazioni strutturali relative agli aggregati, e per fare dei confronti tra di essi in diverse condizioni, si possono utilizzare tec-

niche più o meno raffinate. Per esempio, la spettroscopia infrarossa, basata sulla risposta dei legami atomici presenti nella proteina aggregata ad un'illuminazione nell'infrarosso e messa a confronto con la risposta della proteina non aggregata o aggregata in altre condizioni, permette di valutare la quantità di proteina non strutturata, strutturata ad alfa-elica o a foglietti beta in ciascuna soluzione proteica analizzata, e altre caratteristiche relative ai legami molecolari presenti. Tali risposte alla luce infrarossa infatti variano a seconda dell'intorno chimico di ciascun legame, che è influenzato dallo stato di aggregazione della proteina.

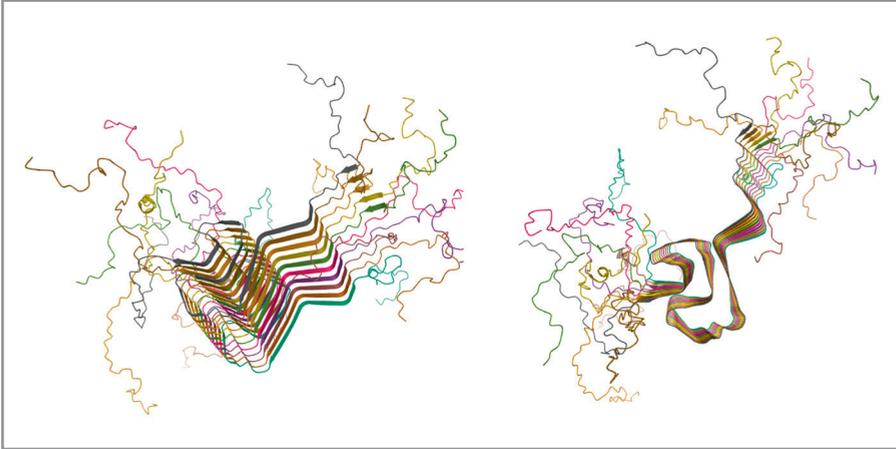
Questo tipo di metodologie, al contrario che quelle basate sulla microscopia, si basano su misure medie in un insieme di oggetti. Quel che si ottiene quindi è un'informazione mediata delle strutture presenti all'interno della soluzione proteica oggetto dello studio. Va da sé che l'interpretazione dei risultati deve essere quindi effettuata *cum grano salis*. Infatti, specie che danno contributi minoritari in termini di alterazione strutturale (per esempio perché la loro quantità assoluta presente in soluzione è solo una piccola frazione del totale degli aggregati) potrebbero comunque avere un contributo importante in termini di tossicità, ma essere poco misurabili con questi metodi.

Da questo deriva la necessità in questo genere di studi di utilizzare più tecniche biofisiche in contemporanea, che complementino i limiti e i vantaggi di ciascuna.

I metodi biofisici più potenti e avanzati (anche se non alla portata di tutti, per questioni di costi di ricerca e di difficoltà di utilizzo) riguardano al giorno d'oggi la determinazione della struttura di oligomeri e fibrille utilizzando la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare. Di recente, sono stati infatti sviluppati dei sistemi che permettono di utilizzare questo sistema in condizioni che vengono definite "di stato solido", che da qui in avanti abbrevieremo con ssNMR.

La ssNMR permette di studiare a livello atomico un film essicato di proteina aggregata, ricavandone informazioni che permettono di individuare le regioni strutturate della proteina, quelle non strutturate e le differenze fini tra strutture aggregate che apparentemente, quando studiate con altri metodi, possono sembrare simili.

Questo metodo è stato impiegato, assieme ad altri metodi biofisici, per caratterizzare strutturalmente oligomeri di alfa-sinucleina ottenuti in due condizioni, e quindi studiare come oligomeri strutturalmente diversi fossero in grado di inserirsi in membrane lipidiche, simili a quelle che costituiscono cellule e organelli, e danneggiarle (15). La ssNMR è stata anche utilizzata per definire un modello atomico della struttura delle fibrille amiloidi di alfa-sinu-



7. Struttura a foglietti beta dell'alfa-sinucleina all'interno delle fibrille amiloide, come misurata tramite la risonanza magnetica nucleare a stato solido. I monomeri di alfa-sinucleina (ciascuno colorato di un colore diverso in questa immagine) sono ripiegati a foglietti beta nella loro parte centrale, mentre parte del N e del C terminale rimangono non strutturati (visualizzazione di sinistra). La visualizzazione di destra mostra invece come i monomeri sono posizionati all'interno della fibrilla, considerando che la stessa ha nel caso di questa rappresentazione il suo asse perpendicolare al foglio. La figura è stata creata utilizzando il file PDB 2N0A della struttura ottenuta da Tuttle *et al.* 2016, tramite il sito RCSB PDB utilizzando il software Mol* (D. Sehnal, A.S. Rose, J. Kovca, S.K. Burley, S. Velankar (2018) Mol*: Towards a common library and tools for web molecular graphics MolVA/EuroVis Proceedings).

cleina (16), con migliore risoluzione rispetto agli studi precedenti (Figura 7). Come questa struttura potrà essere poi utilizzata per determinare le interazioni dell'alfa-sinucleina così strutturata con altre proteine o con strutture intracellulari di rilevanza per la patologia, o con piccole molecole designate per rendere gli aggregati inoffensivi, sarà oggetto di ulteriori ricerche, che potrebbero essere di aiuto nella diagnosi precoce e nel trattamento della patologia.

Inoltre, la caratterizzazione strutturale così dettagliata delle fibrille sta assumendo un'importanza sempre maggiore ora che si è scoperto che fibrille con strutture diverse sono in grado, quando utilizzate per realizzare modelli animali della malattia di Parkinson, di produrre malattie che sono diverse sia dal punto di vista patologico che dal punto di vista clinico, suggerendo che il legame struttura-funzione, o meglio struttura-disfunzione, sia fondamentale per l'evoluzione della patologia e che quindi sia un'informazione necessaria per procedere con una tempestiva diagnosi e un trattamento adeguato, per quanto possibile con i farmaci attualmente a disposizione (9).

Va infine sottolineato che moltissime altre tecniche biofisiche più o meno sofisticate, dalla diffrazione di raggi X da parte delle fibrille, fino allo studio dello scattering di raggi X o neutroni a basso angolo da parte di oligomeri e fibrille, sono state utilizzate per studiare gli aggregati. Per questioni di spazio, non è possibile discutere in questo articolo di ciascuna di queste metodologie e dei risultati che hanno permesso di ottenere, ma è importante sottolineare come l'attuale comprensione della struttura degli aggregati di alfa-sinucleina e lo studio del binomio struttura-funzione che da essi segue, sia possibile solo tramite l'utilizzo complementare di numerose tecniche, ciascuna in grado di fornire un pezzetto di informazione necessaria per il completamento di un puzzle complesso, che è al momento ancora in corso d'opera.

Studio del processo di aggregazione e degli aggregati in modelli cellulari

Come accennato in precedenza, il processo di aggregazione dell'alfa-sinucleina *in vitro* può essere controllato dalle condizioni in cui la proteina viene studiata. Il controllo di tali condizioni è stringente e permette di avere informazioni chiare sulla rilevanza di alcuni parametri (pH, forza ionica, concentrazione di molecole di interesse, e così via), ma è ben lontano dalle reali condizioni fisiologiche o patofisiologiche in cui si trova la proteina all'interno dei neuroni. Questa nozione ha riscontro anche nel fatto che i corpi di Lewy sono costituiti da alfa-sinucleina fibrillare ma non soltanto: altre proteine e varie strutture lipidiche sono state infatti individuate all'interno delle deposizioni, supportando l'idea che ad uno studio *in vitro* si debba far poi seguire anche uno studio di quello che succede in modelli cellulari e animali (17).

Per ovviare a questo problema nel corso degli anni si sono messe a punto delle metodologie che hanno permesso di studiare il processo di aggregazione e i suoi prodotti all'interno delle cellule. Questo tipo di studi ha dei limiti intrinseci molto più stringenti dei corrispettivi *in vitro*. Infatti, alle problematiche relative all'eterogeneità delle popolazioni di aggregati di alfa-sinucleina, si aggiungono le condizioni di variabilità biologica che si osservano quando si studiano singole cellule, oltre che i limiti imposti dalla delicatezza del modello stesso.

Infine, molte delle metodologie precedentemente descritte non sono utilizzabili in contesti cellulari, per via della presenza di altre proteine e delle membrane lipidiche, oppure il loro utilizzo è possibile ma a patto di un notevole impegno nella messa a punto sperimentale, associato ad una perdita in termini di risoluzione o di informazioni raccolte, che talvolta rende vano lo sforzo. Un'eccezione a questo discorso è la colorazione tramite tioflavina, che può essere utilizzata per individuare le fibrille che si formano all'interno del-

le cellule se queste vengono osservate utilizzando un microscopio. Tuttavia, questo metodo non permette di valutare la formazione di oligomeri che non hanno una struttura fibrillare all'interno della quale la tioflavina può intercalarsi, e sono naturalmente soggetti ai limiti della diffrazione ottica.

Le tecniche biofisiche utilizzate per studiare l'oligomerizzazione in cellule si basano in genere sulla microscopia ottica a fluorescenza, declinata nelle sue forme più raffinate. In questi casi, l'alfa-sinucleina viene coniugata ad un fluoroforo (che può essere di origine proteica o chimica) e studiando la fluorescenza emessa da quel fluoroforo nelle cellule si possono inferire delle informazioni relative al comportamento dell'alfa-sinucleina e al suo stato di aggregazione. Lo studio dell'intensità di fluorescenza in sé non rappresenta un buon sistema per valutare quest'ultimo aspetto: basandosi su questo parametro non è infatti possibile distinguere aggregati se circondati da proteina monomerica. Inoltre, come abbiamo visto in precedenza, le dimensioni tipiche di oligomeri e fibrille sono dell'ordine delle decine di nanometri, mentre la risoluzione della microscopia ottica confocale è dell'ordine delle centinaia di nanometri.

Per ovviare a questi problemi si sono utilizzati quindi dei metodi che invece di basarsi sulla semplice intensità della luce di fluorescenza emessa, che nella maggior parte dei casi non è un buon indicatore dello stato di aggregazione della proteina, si basano sulle sue proprietà intrinseche, come per esempio il tempo di vita della fluorescenza oppure la correlazione delle intensità fluorescenza nel tempo (10). In quest'ultimo caso, il concetto su cui è basata la metodologia è abbastanza intuitivo. Oggetti piccoli come i monomeri di alfa-sinucleina si muovono abbastanza rapidamente per diffusione (moto Browniano) nella cellula, quindi la fluorescenza emessa dal fluoroforo coniugato al monomero se monitorata nel tempo permetterà di valutare la correlazione temporale dell'intensità del segnale, che sarà molto bassa. Al contrario, gli oligomeri si muoveranno molto più lentamente, per cui si otterrà una correlazione temporale del segnale di fluorescenza maggiore in questo caso rispetto a quello del monomero (18). Questo permette quindi di valutare, in condizioni diverse, a tempi diversi e in modelli cellulari diversi, lo stato di aggregazione dell'alfa-sinucleina, se opportunamente coniugata con una proteina o una molecola fluorescente, in cellule vive.

Vale la pena infine sottolineare che lo studio dell'aggregazione in cellule e neuroni, fissati o vivi, aumenta il livello di complessità sperimentale non soltanto per quanto riguarda le tecniche di indagine, ma anche per la preparazione e il mantenimento dei campioni oggetto di studio.

Conclusioni

Il moderno studio delle proteinopatie, incluse quindi le sinucleinopatie e in particolare la malattia di Parkinson, non può prescindere dall'utilizzo di strumenti biofisici, sia in termini di metodologie sperimentali che per quanto riguarda i metodi computazionali e di modellizzazione. Negli ultimi anni, in particolare, passi da gigante sono stati mossi verso una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari che determinano l'aggregazione delle proteine amiloidogeniche e verso una migliore caratterizzazione dei vari aggregati che si osservano nelle patologie umane.

Allo stesso tempo, i risultati ottenuti in biofisica nello studio di questi fenomeni, devono sempre essere complementati con studi di biochimica, biologia cellulare e fisiologia, e razionalizzati alla luce dei risultati ottenuti tramite le altre discipline coinvolte nella comprensione di queste malattie e dei meccanismi molecolari che le determinano.

Referenze

1. Verdurand M, Levigoureux E, Zeinyeh W, Berthier L, Mendjel-Herda M, Cadarosanese F, et al. In Silico, in Vitro, and in Vivo Evaluation of New Candidates for α -Synuclein PET Imaging. *Mol Pharm*. 2018;15(8):3153-66.
2. Atik A, Stewart T, Zhang J. Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain Pathol*. 2016;26(110):410-8.
3. Kalia L V., Kalia SK, McLean PJ, Lozano AM, Lang AE. Alpha-Synuclein Oligomers and Clinical Implications for Parkinson Disease. *Ann Neurol*. 2013;73(2):155-69.
4. Rocca WA. The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. *Lancet Neurol* 2018;17(11):928-9.
5. Verstraeten A, Theuns J, Van Broeckhoven C. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends Genet* 2015;31(3):140-9.
6. Kalia L V, Lang AE, Shulman G. Parkinson's disease. *Lancet* 2015;386(9996):896-912.
7. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839-40.
8. Burré J. The Synaptic Function of alpha-Synuclein. *J Park Dis*. 2015;5:699-713.
9. Lau A, So RWL, Lau HHC, Sang JC, Ruiz-riquelme A, Fleck SC, et al. α -Synuclein strains target distinct brain regions and cell types. *Nat Neurosci* 2020;23.
10. Plotegher N, Greggio E, Bisaglia M, Bubacco L. Biophysical groundwork as a hinge to unravel the biology of α -synuclein aggregation and toxicity. *Q Rev Biophys*. 2014;1:1-48.
11. Zhang J, Li X, Li J, Pratt MR. The Roles of Post-translational Modifications on α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases. *Front Neurosci*. 2019;13:1-11.

12. Braak H, Del K, Rüb U, Vos RAI De, Jansen ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24:197-211.
13. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 2013;9(1):13-24.
14. Morris AM, Watzky MA, Finke RG. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: A review of the literature. *BBA - Proteins Proteomics* 2009;1794(3):375-97.
15. Fusco G, Chen SW, Williamson PTF, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science* 2017;358(6369):1440-3.
16. Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, Covell DJ, Berthold DA, Kloepper KD, et al. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat Struct Mol Biol* 2016;23:1-9.
17. Shahmoradian SH, Lewis AJ, Genoud C, Hench J, Moors TE, Navarro PP, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat Neurosci* 2019;22:1099-109.
18. Priest DG, Solano A, Lou J, Hinde E. Fluorescence fluctuation spectroscopy: an invaluable microscopy tool for uncovering the biophysical rules for navigating the nuclear landscape. *Biochem Soc Trans*. 2019;47:1117-29.