

Meccanismi “prion-like” e patologie neurodegenerative



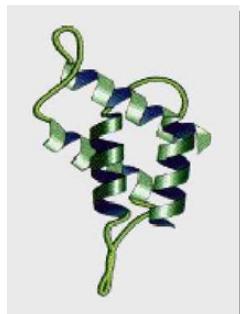
Alma Mater Studiorum Università di Bologna

Andrea Mastrangelo, Davide Murgia, Federico Zingarelli

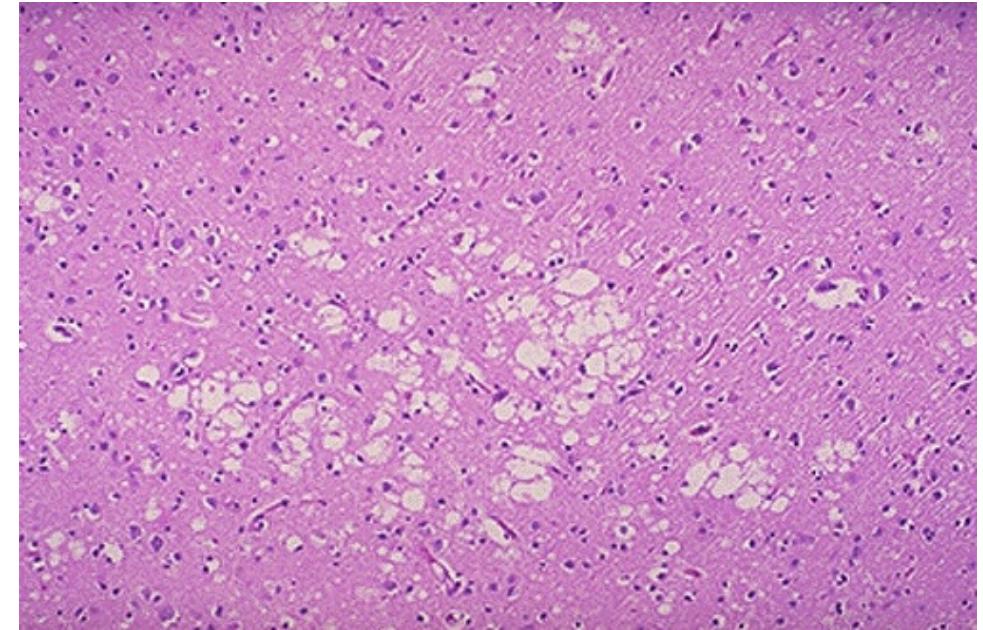
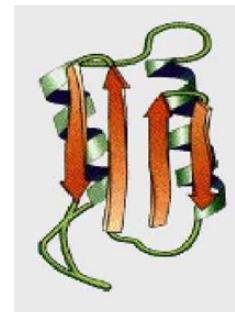
Tutor: prof. Fabio Dall’Olio

5 aprile 2017

Malattie prioniche



Modello di Prusiner

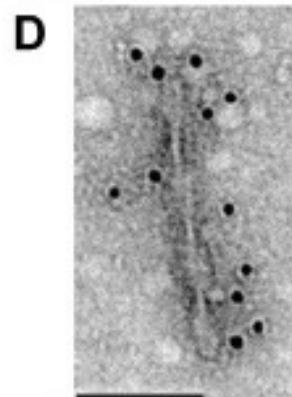
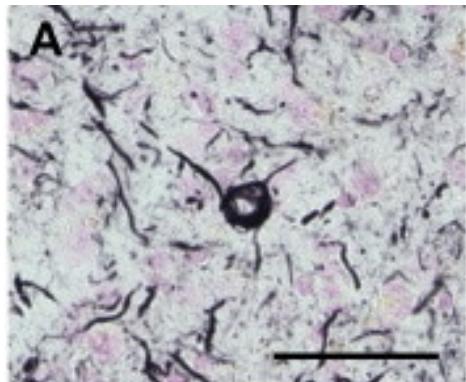


Malattia di Creutzfeldt-Jakob

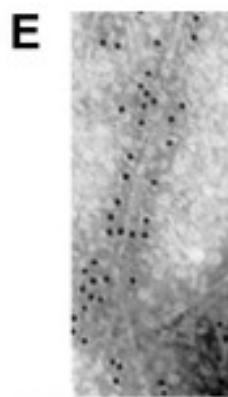
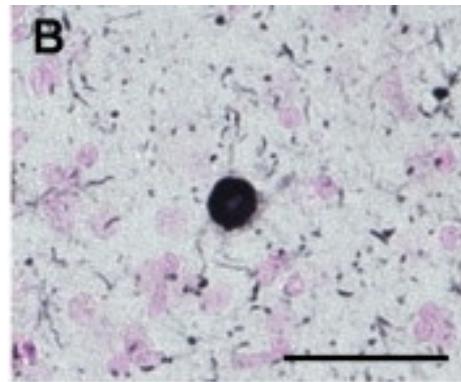
- Malattia di Creutzfeldt-Jakob
- Malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker
- Insonnia familiare fatale

- Forma ereditaria
- Forma infettiva
- Forma sporadica

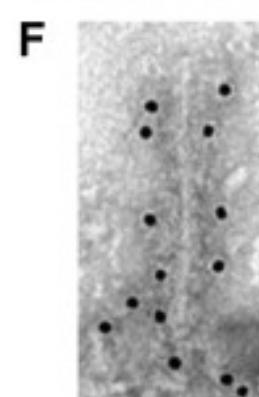
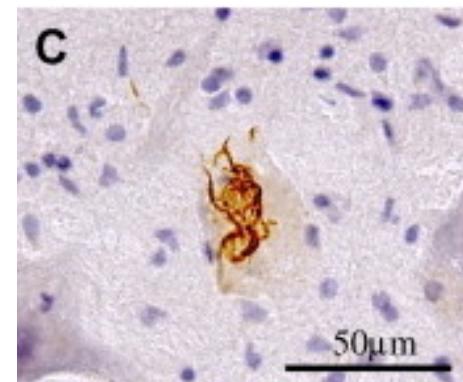
Malattie neurodegenerative



Malattia di Alzheimer



Malattia di Parkinson



Sclerosi laterale amiotrofica

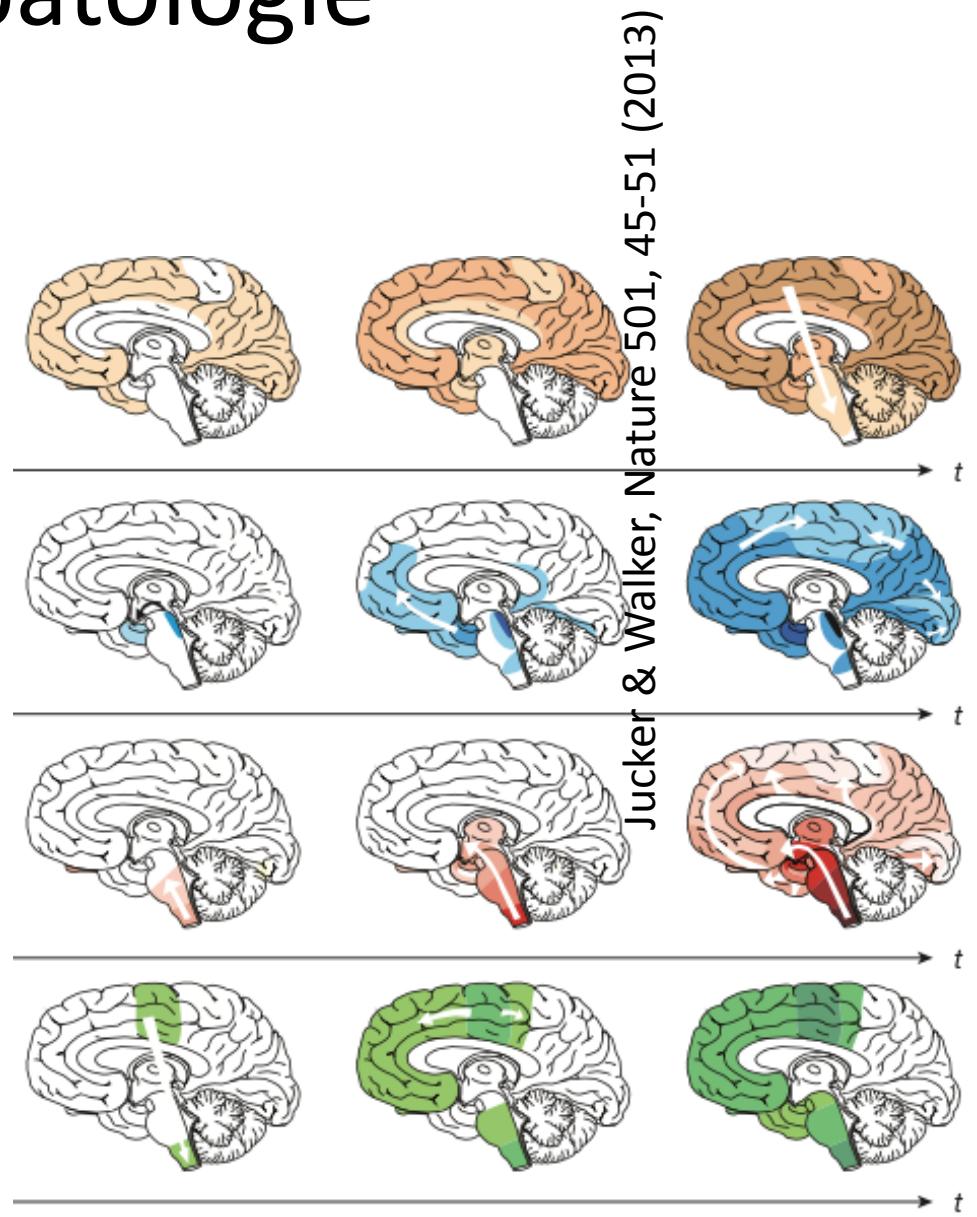
Meccanismi “prion-like” e patologie neurodegenerative

- La proteina malripiiegata deve mostrare una “seeding activity”
- La proteina malripiiegata deve indurre tossicità neuronale
- La proteina malripiiegata deve diffondere e propagarsi

Meccanismi “prion-like” e patologie neurodegenerative

Cosa cambia?

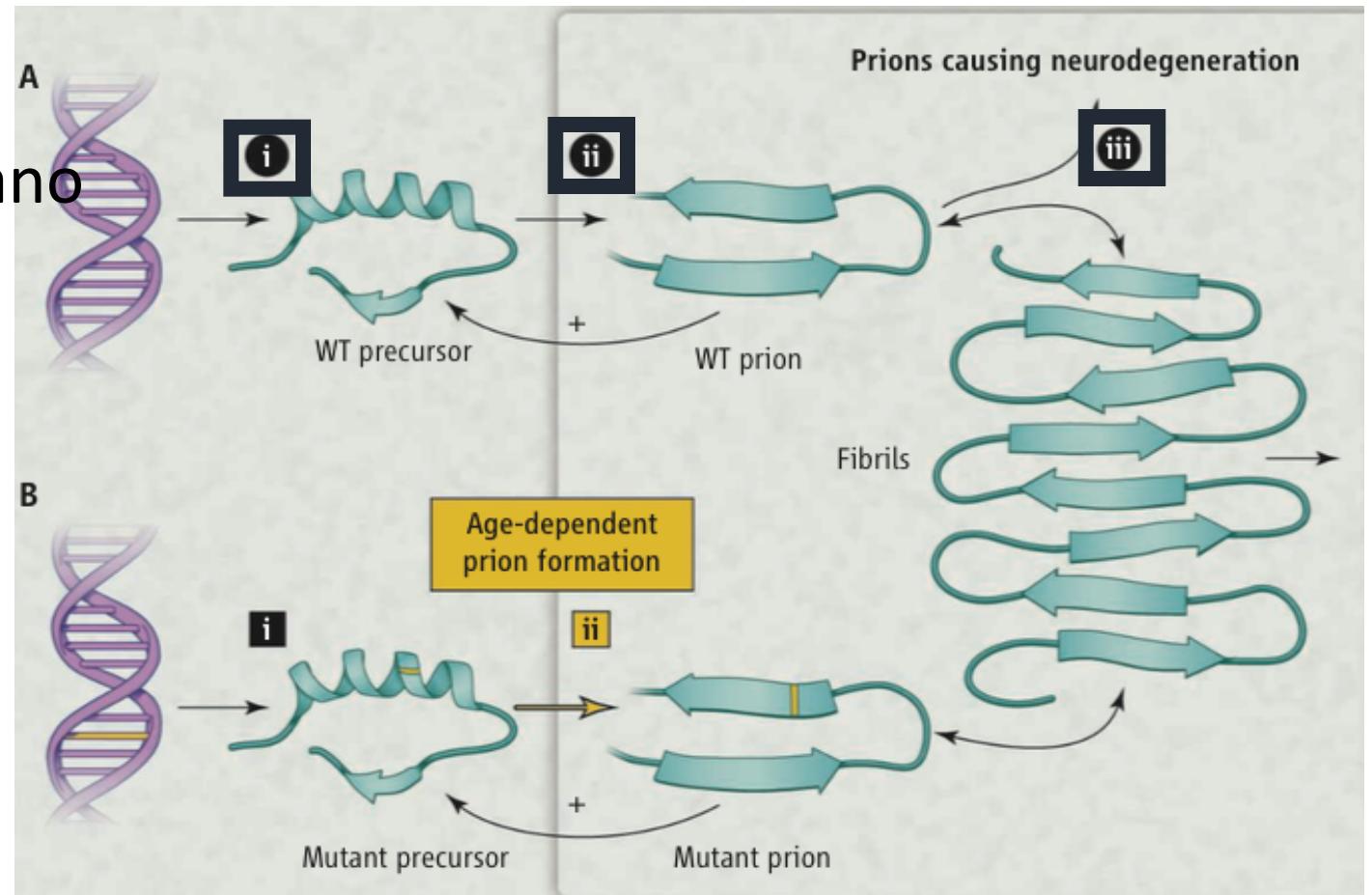
- Le malattie neurodegenerative sono delle malattie graduali, sia sul piano molecolare sia sul piano clinico
- Le malattie neurodegenerative coinvolgono progressivamente aree differenti del SNC



Meccanismi “prion-like” e patologie neurodegenerative

Cosa cambia?

- Nuove prospettive sul piano terapeutico



Meccanismi “prion-like” e patologie neurodegenerative

Sono malattie infettive?

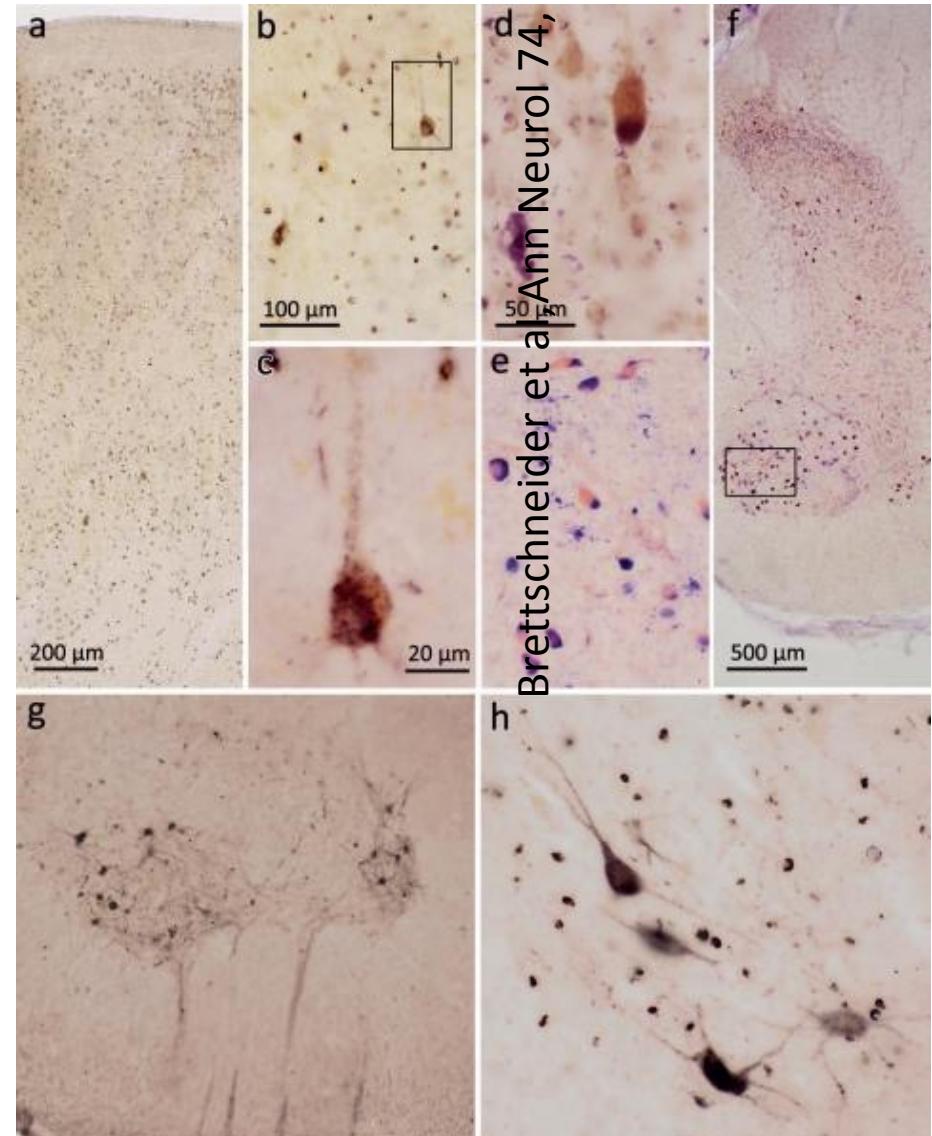
Al momento attuale non ci sono evidenze che le malattie neurodegenerative possano essere trasmesse secondo un meccanismo simil-infettivo

Sclerosi laterale amiotrofica (SLA)

- Malattia neurodegenerativa caratterizzata dalla morte dei motoneuroni (superiori ed inferiori) e dalla conseguente atrofia dei muscoli scheletrici
- La morte è causata dalla distruzione dei motoneuroni che controllano la muscolatura respiratoria
- Nel 10% dei casi è familiare, nel 90% dei casi è sporadica

Sclerosi laterale amiotrofica (SLA) – forme sporadiche

- Aggregati intracellulari insolubili nei motoneuroni superiori (UMN) ed inferiori (LMN) e negli oligodendrociti, formati da una forma alterata di TDP-43
- **TDP-43** è una proteina a prevalente localizzazione nucleare, espressa in molti tessuti e con molte funzioni



TDP-43: meccanismi “prion-like”

La proteina malripiegata deve mostrare una “seeding-activity”

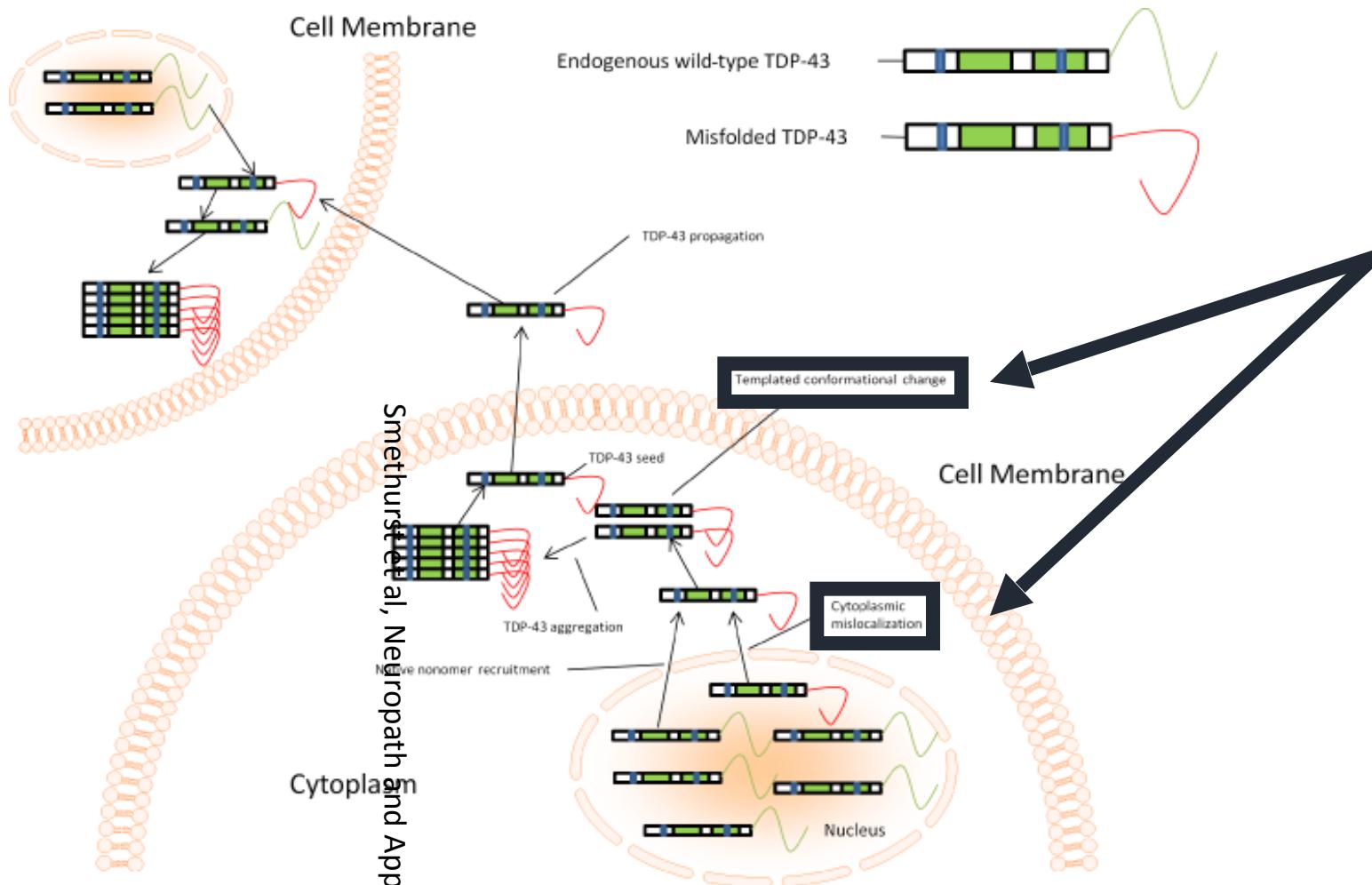
- Analisi bioinformatiche: presenza di un dominio “prion-like” ricco in glutammina e asparagina nell'estremità C-terminale della proteina
- **Evidenze in vitro:**
 - l'inoculazione di estratti umani del SNC di soggetti deceduti per SLA in una linea cellulare ha provocato la formazione di aggregati insolubili di TDP-43 simili a quelli presenti in vivo⁽¹⁾
 - l'inoculazione di fibrille sintetiche di TDP-43 alterata in una linea cellulare ha provocato la formazione di aggregati insolubili di TDP-43 simili a quelli presenti in vivo⁽²⁾

⁽¹⁾ Nonaka et al, Cell Reports 4, 124-134 (2013)

⁽²⁾ Shimonaka et al, J Biol Chem 291, 8896-907 (2016)

TDP-43: meccanismi “prion-like”

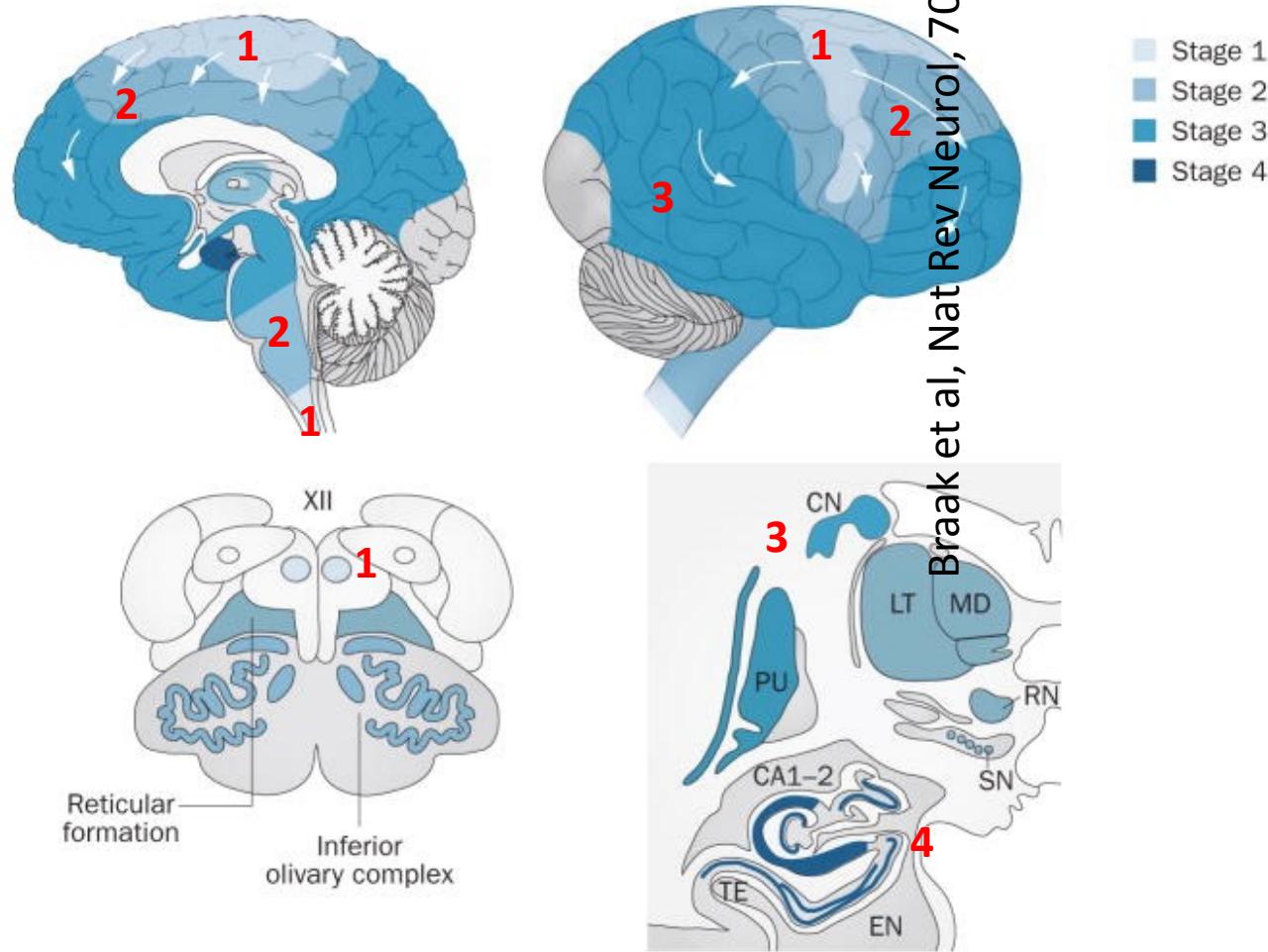
La proteina malripiegata deve mostrare una “seeding activity”



- Mutazioni
- Modificazioni post-traduzionali aberranti
- Stress cellulare cronico

TDP-43: meccanismi “prion-like”

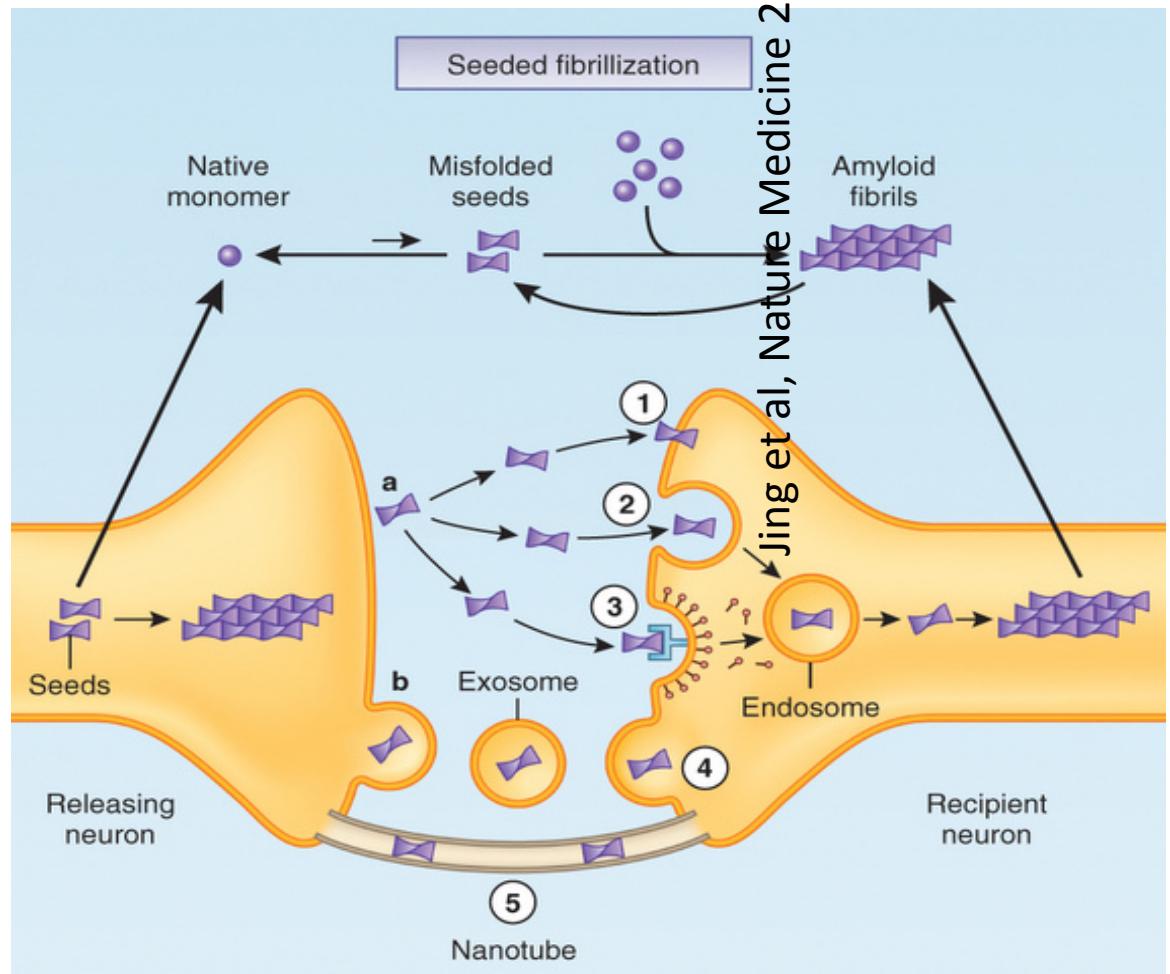
La proteina malripiegata deve diffondere e propagarsi



TDP-43: meccanismi “prion-like”

La proteina malripiegata deve diffondere e propagarsi

- La propagazione intercellulare della proteina malripiegata avviene mediante trasporto assonale anterogrado e trasmissione trans-sinaptica
 - nei neuroni sani, TDP-43 è presente ed attivamente trasportata a livello assonale
 - negli asseni dei motoneuroni bulbari e spinali affetti dalla malattia sono presenti aggregati insolubili di TDP-43



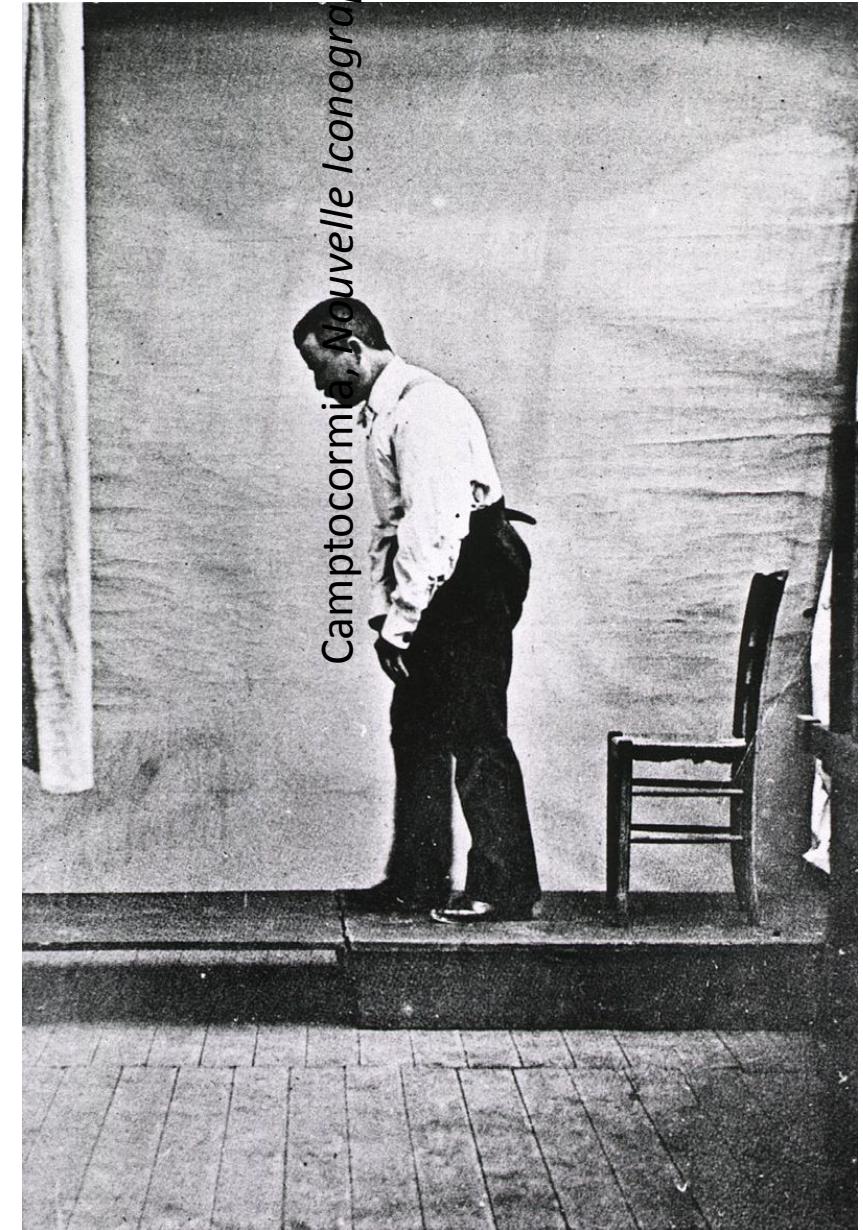
TDP-43: meccanismi “prion-like”

La proteina malripiegata deve diffondere e propagarsi

- La malattia da accumulo di TDP-43 si propaga, mediante trasporto assonale, in senso centrifugo dalla corteccia cerebrale
 - tutte le regioni che presentano un accumulo di TDP-43 ricevono fibre afferenti dalla corteccia cerebrale
 - regioni che non ricevono connessioni dirette dalla corteccia (nuclei dei nervi cranici oculomotori, neuroni pregangliari del SP/SS, locus coeruleus) risultano raramente coinvolte

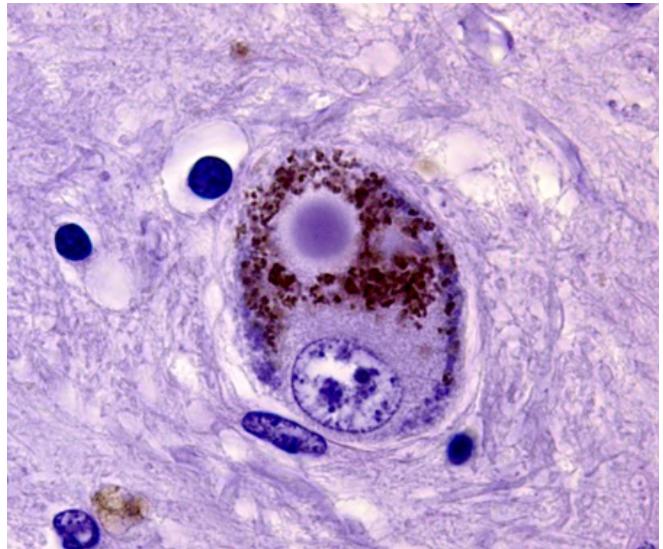
Malattia di Parkinson

- La proteina protagonista è l' **α -sinucleina** (il cui gene è sul cromosoma 4 e la cui funzione è sconosciuta).
- Questa, in forma alterata o mutata (**conformazione ricca di foglietti Beta e associata all'ubiquitina**), sembra avere la capacità di indurre il mal ripiegamento di altre molecole di **α -sinucleina ripiegate correttamente**.



Camptocormia. Nouvelle Iconographie de

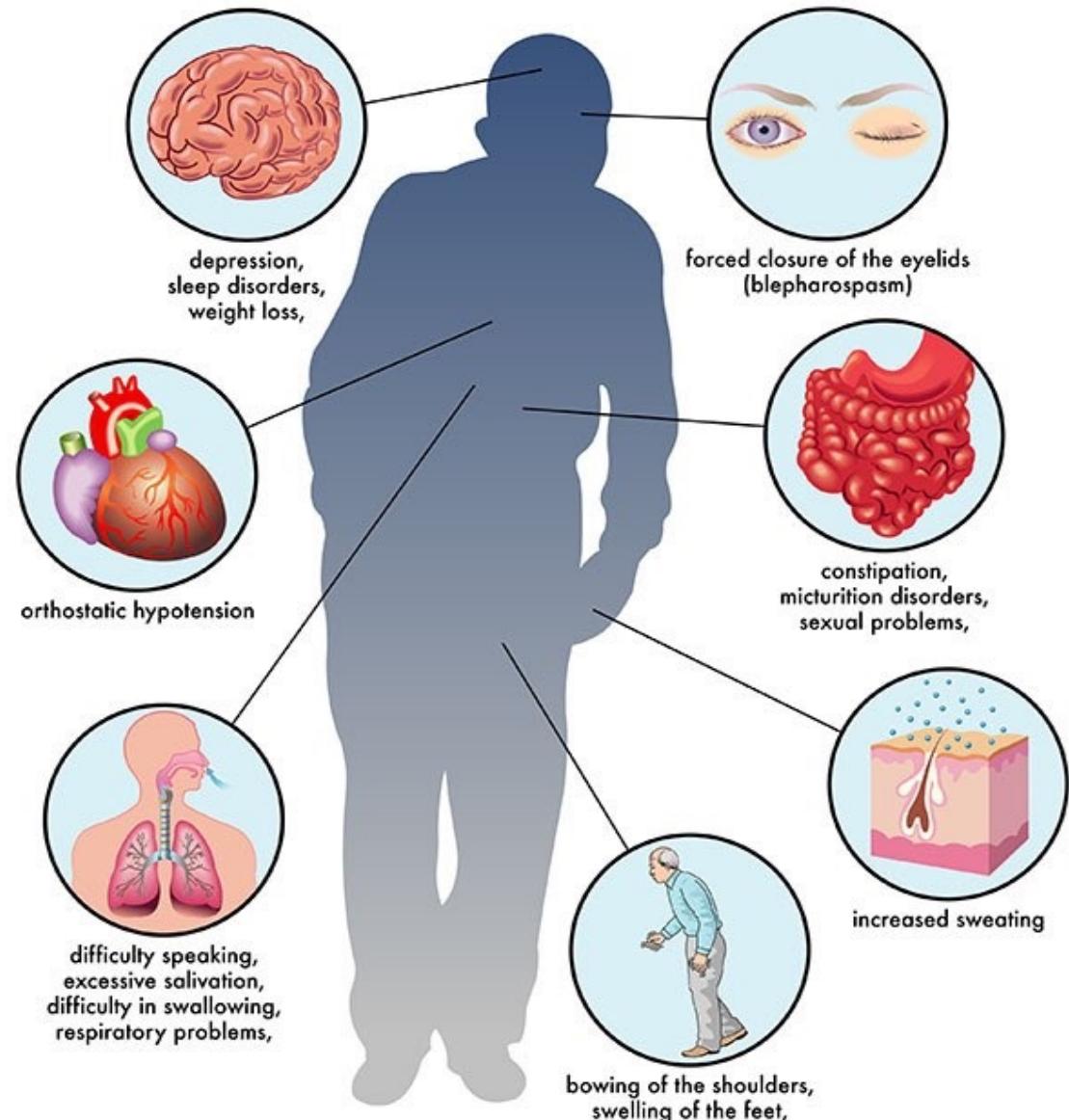
Ritrovamento corpi di Lewy: oligomeri di α -sinucleina β -SHEET RICH a formare FIBRILLE AMILOIDI. Strutture simili agli AGGREGATI PRIONICI



Morte dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra* mesencefalica

Tremore, rigidità, lentezza nei movimenti, difficoltà a camminare con marcia a piccoli passi e riduzione movimenti pendulari

Parkinson's disease non-motor disorders caused by Parkinson's disease



Alfa-sinucleina: meccanismi “prion-like”

La proteina malripietata deve mostrare una “seeding activity”

La velocità e la gravità con cui questo avviene dipende anche dalla natura dell' α -syn endogena. Topi transgenici per SNCA sviluppano **una forma più aggressiva di Parkinson rispetto a topi knock-out** (Sacino et al-J of Neurosci-2014)

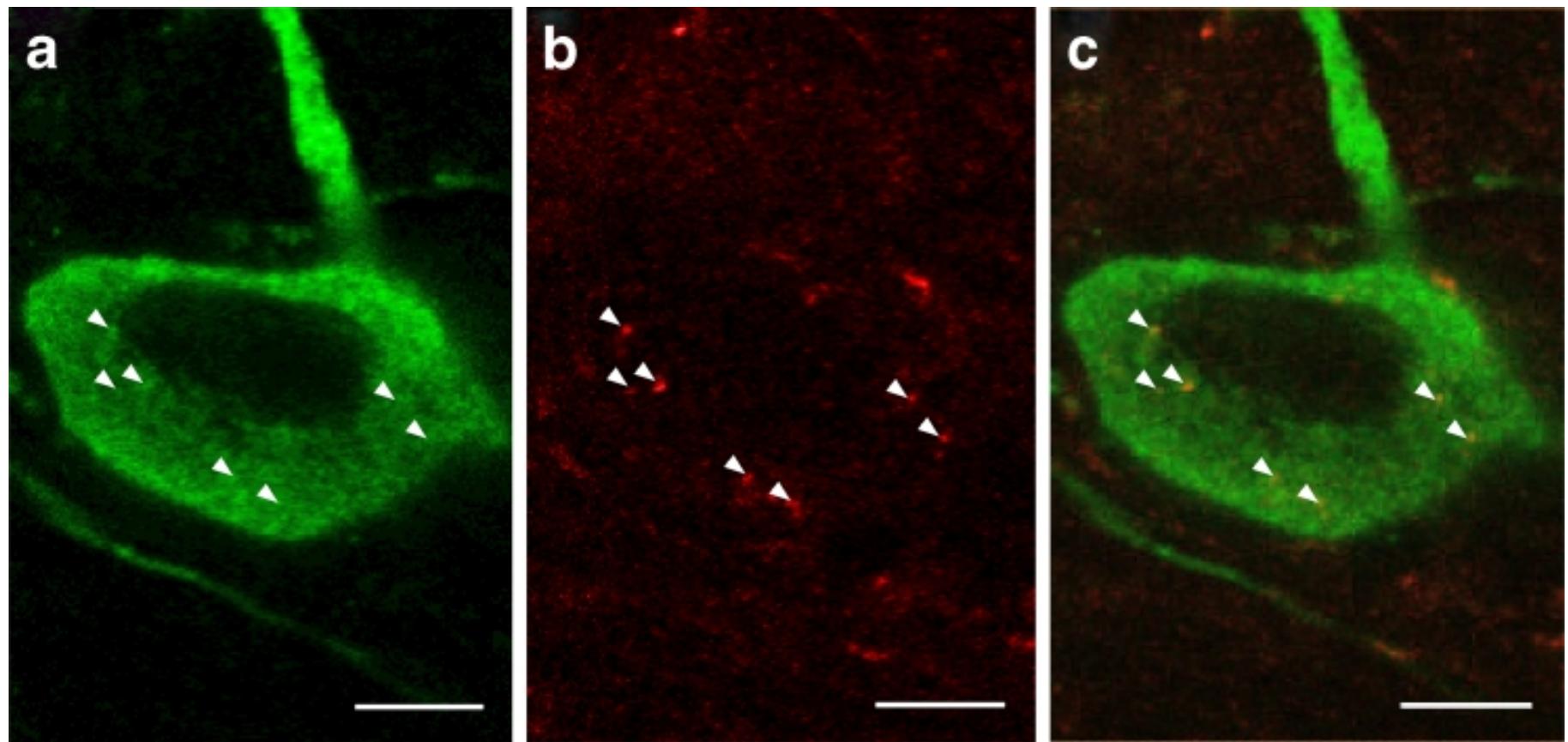


L'inoculazione di α -syn mutata può indurre la formazione di aggregati endogeni di α -syn in una cavia wild-type.
(Luk KC, Kehm V, Carroll J, et al-*Science*-2012)

Alfa-sinucleina: meccanismi “prion-like”

La proteina malripiegata deve mostrare una “seeding activity”

L' α -sinucleina
mutata si sposta tra
le cellule e al loro
interno provoca
misfolding e
aggregazione



Eziologia della malattia di Parkinson

L'infiammazione ha un ruolo?

Pesticidi, metalli pesanti, eventi traumatici cronici, Agente Arancio

IDIOPATICA

ESPRESSIONE DI MARKERS SPECIFICI DELL'INFIAMMAZIONE (Iba-1, CD11b e MHC classe II, GFAP) E ATTIVAZIONE MICROGLIA E ASTROCITI (analisi immunoistochimica)

PD

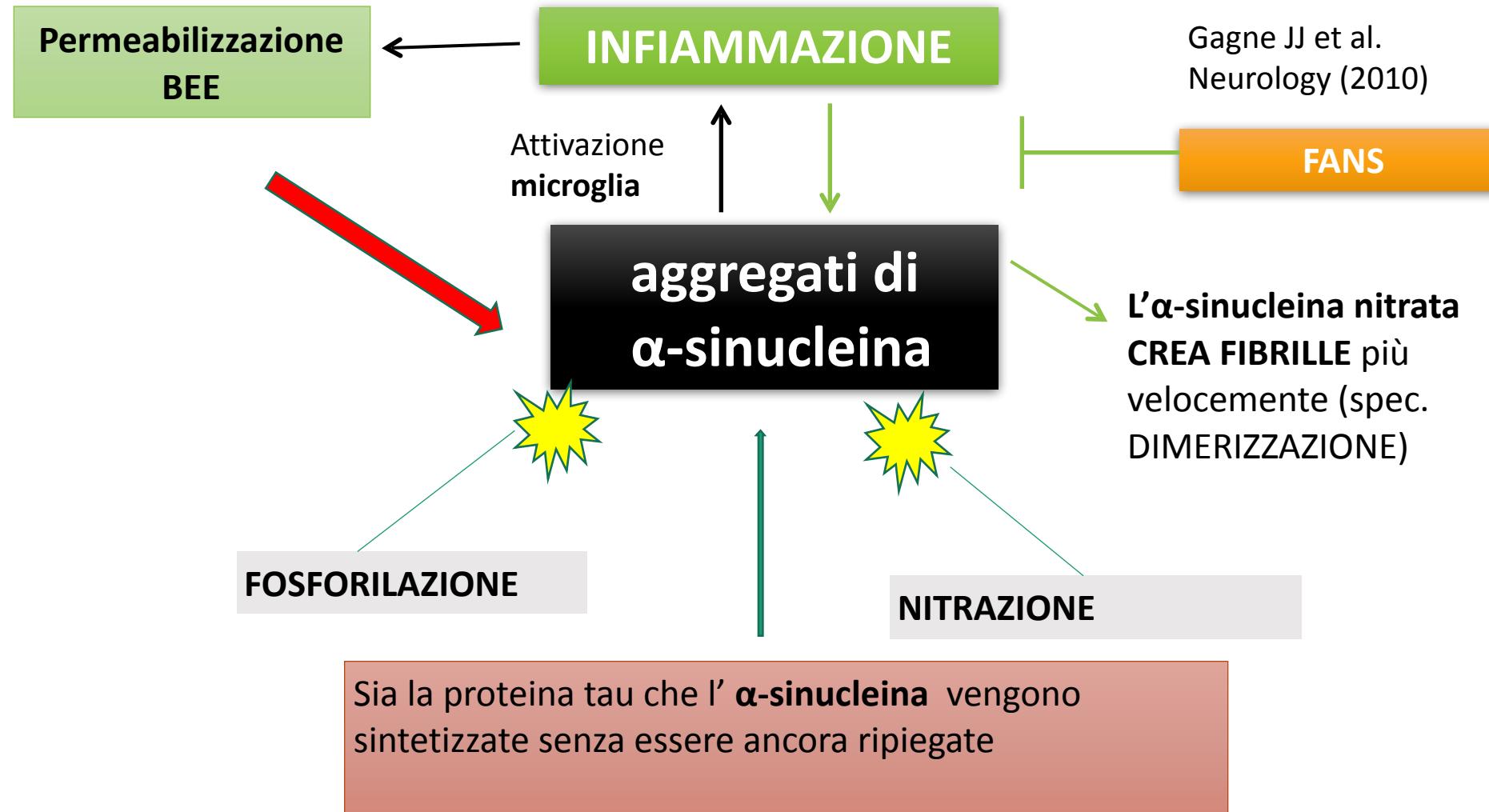
Abbondante INFILTRATO LINFOCITARIO (analisi istologica)

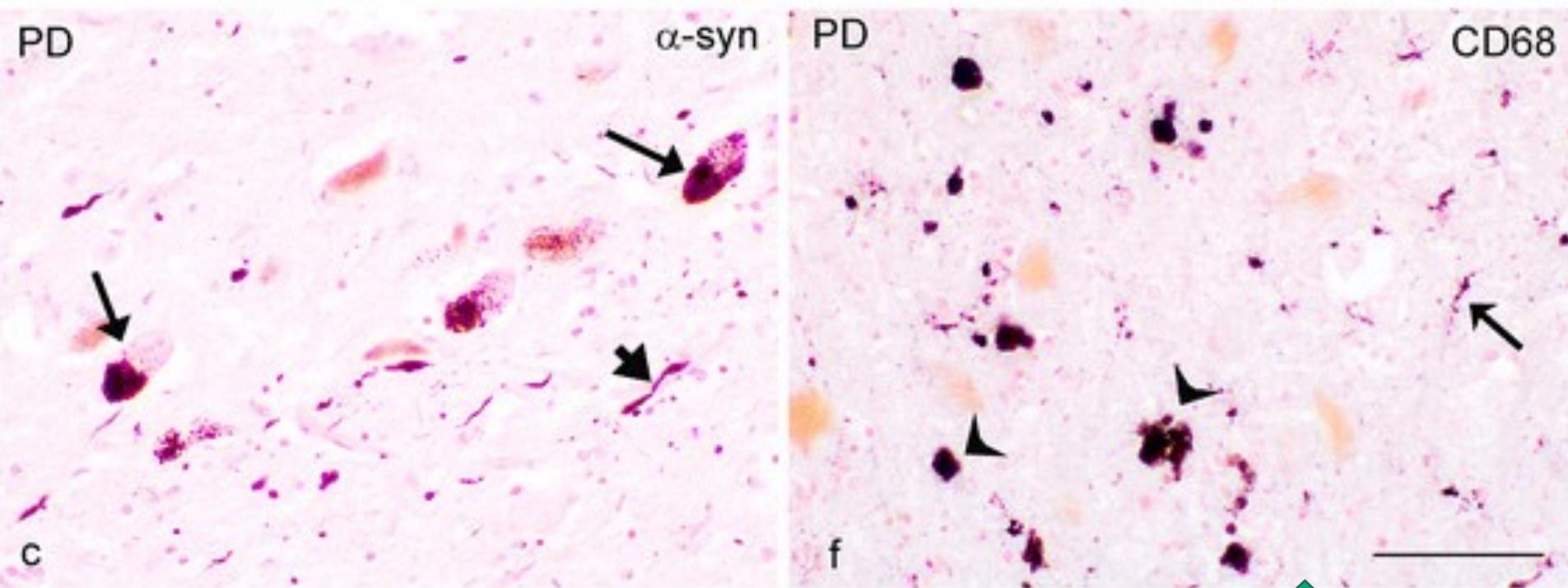
LRRK2 (dardarina)
SNCA (α -sinucleina)-A30P
PARK2 (parkin)
GBA1 (Glucocerebrosidasi)

GENETICA

Anatomia Patologica
tessuto cerebrale post-mortem in pazienti con PD dimostra ALTI LIVELLI TNF, IL-1, IL-6

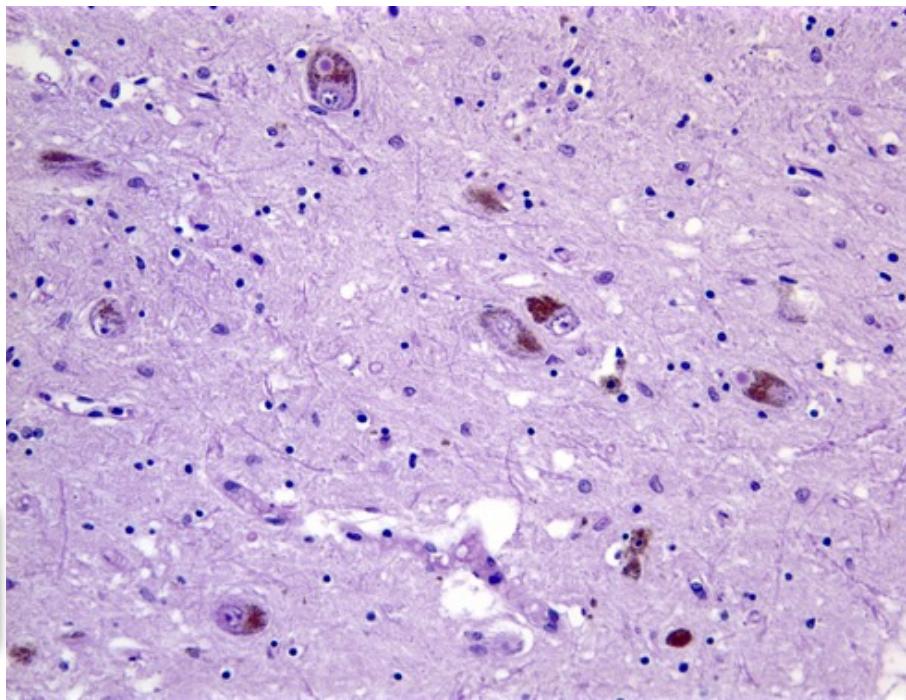
L'infiammazione è il probabile punto di partenza *spaziale* e *causale* del comportamento dell' α -syn





α-sinucleina
patologica
(eosinofila) e
microglia CD68
immunopositiva
nella corteccia
ippocampale CA2

Corpi di Lewy
(LB's)

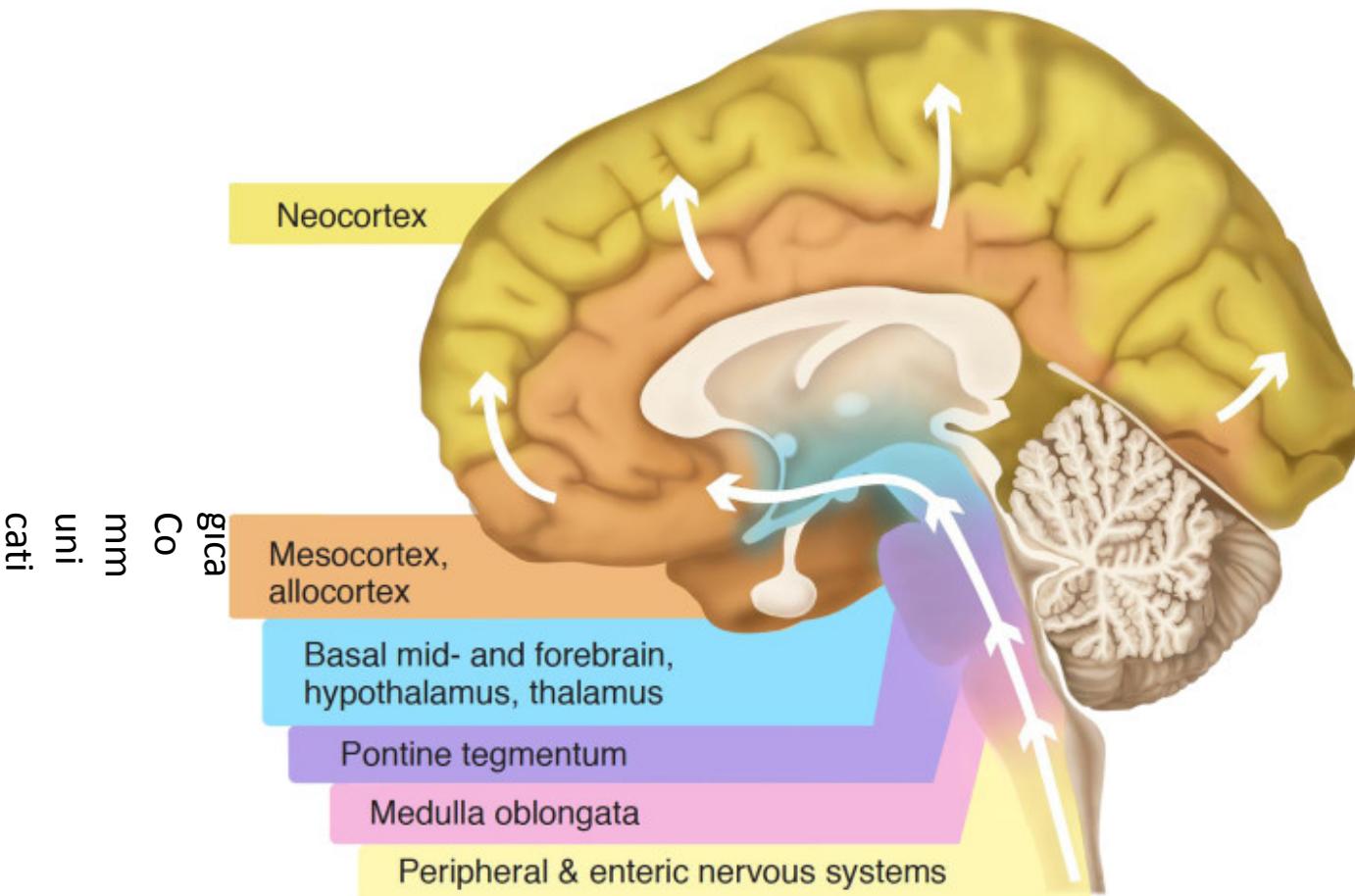


Cellule della **microglia**
dalla conformazione
“ameboide” nel
contesto della
neuroinfiammazione
parkinsoniana

Doorn et al. Acta Neuropathologica
Communications (2014), 2-90

Alfa-sinucleina: meccanismi “prion-like”

La proteina malripietata deve diffondere e propagarsi



INFIAMMAZIONE

IPOTESI DI BRAAK

La **formazione di aggregati** e soprattutto la concomitante **NEUROINFIAMMAZIONE** seguono un **percorso preciso che ricalca la sintomatologia**

DUAL-HIT HYPOTHESIS DI HAWKS et al.

L'inizio di questo percorso può essere duplice: **bulbo olfattorio o sistema nervoso enterico**; entrambi distretti soggetti ad infezioni e dunque **condizioni INFIAMMATORIE**

AUMENTO DELLA α -sinucleina
FOSFORILATA (pSer129) INTRACELLULARE
NEL BULBO OLFACTORIO, LOCUS
COREULEUS, IPPOCAMPO E TRONCO
ENCEFALICO



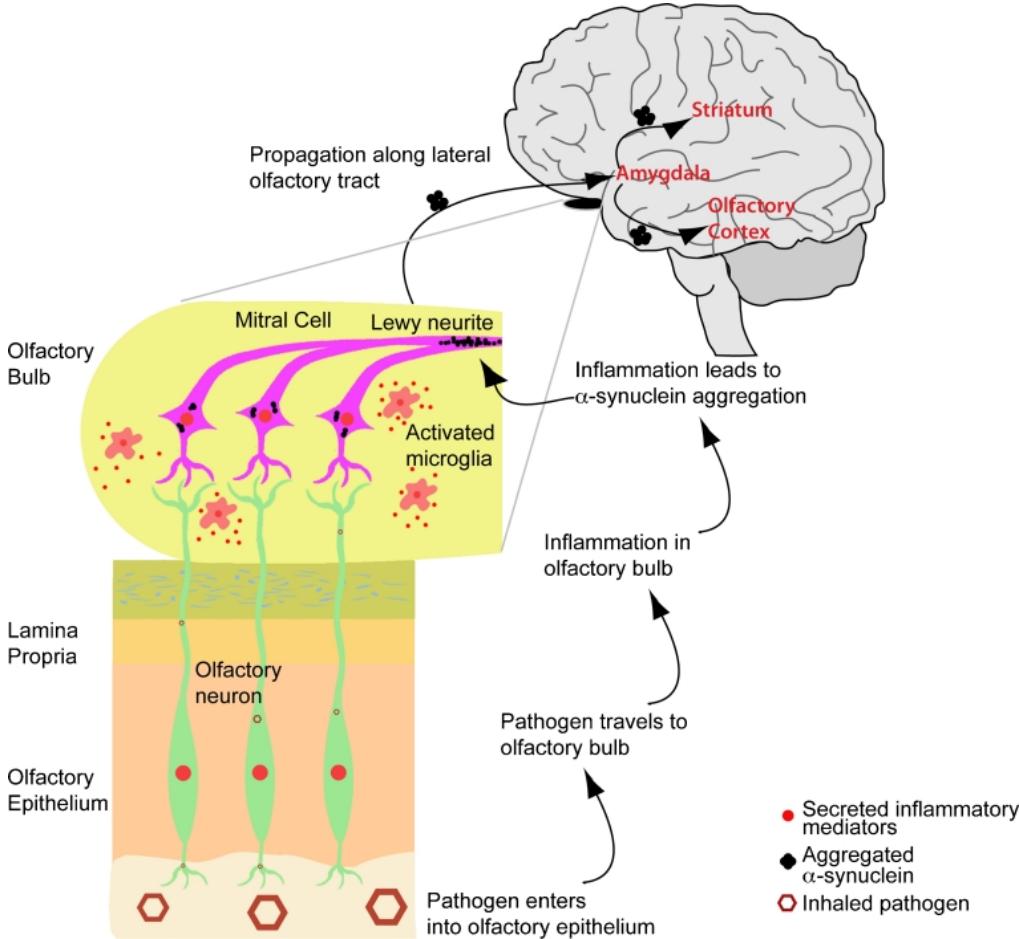
NEUROINFIAMMAZIONE E
RISPOSTA IMMUNE RISCONTRABILE
DOPO 2 MESI



DIFFUSIONE DALLA
PERIFERIA (bulbo
olfattorio) AL SNC
ATTRaverso i NERVI
CRANICI



VIRUS H5N1 INOCULATO IN
CAVIE PER VIA INTRANASALE
(Jang et al. Proc Natl Acad Sci-
2009)



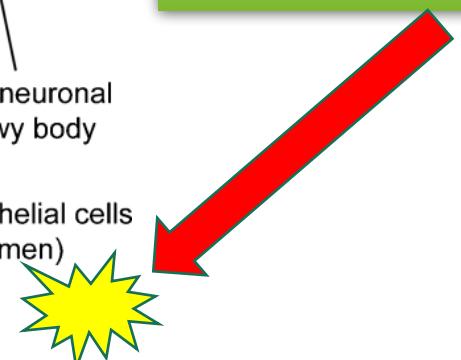
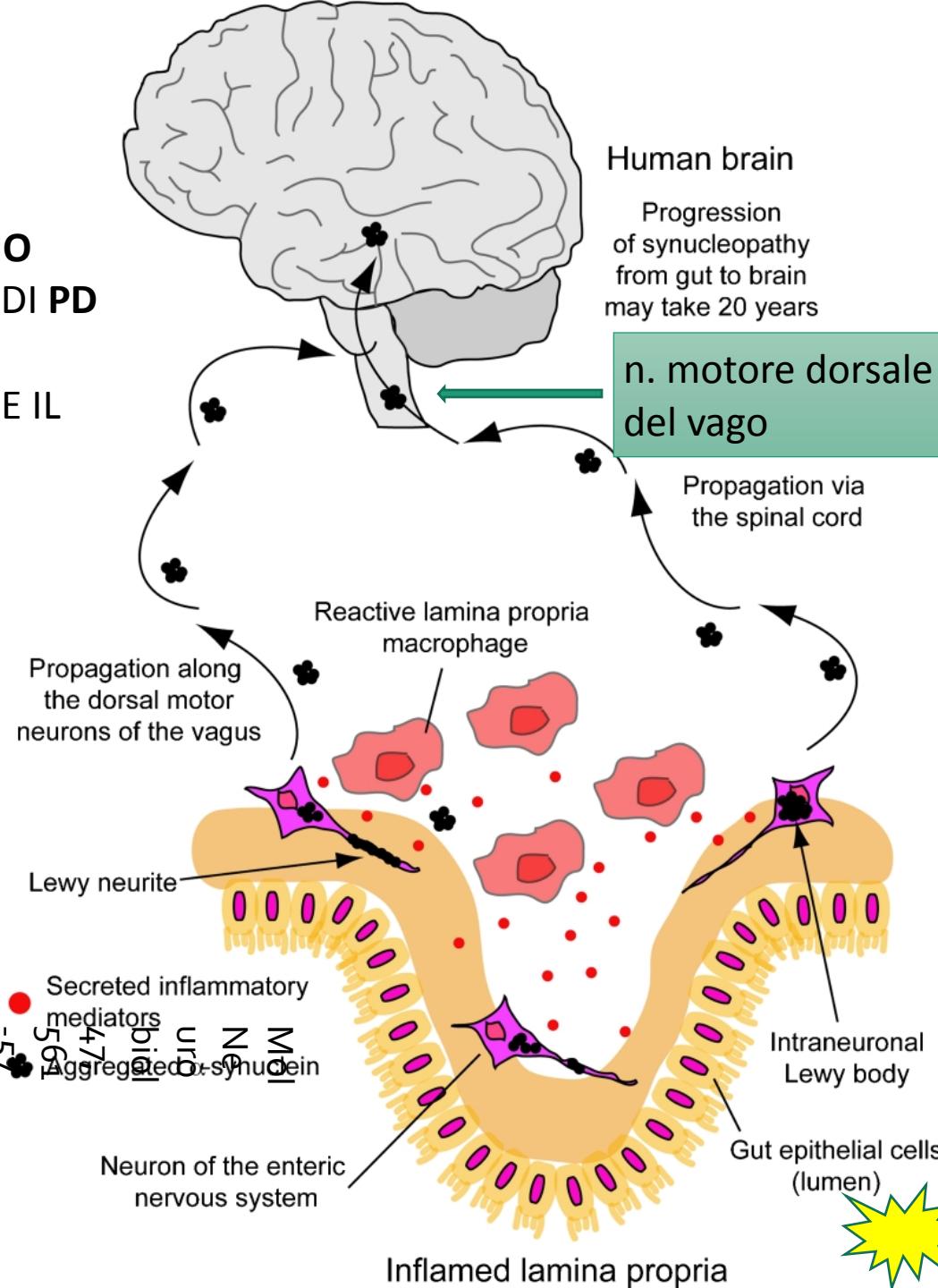
Lema TCM, Mol Neurobiol 47,
561-574 (2013)

**UN SINTOMO
D'ESORDIO DI PD
POTREBBE
RIGUARDARE IL
TRATTO G.I.**

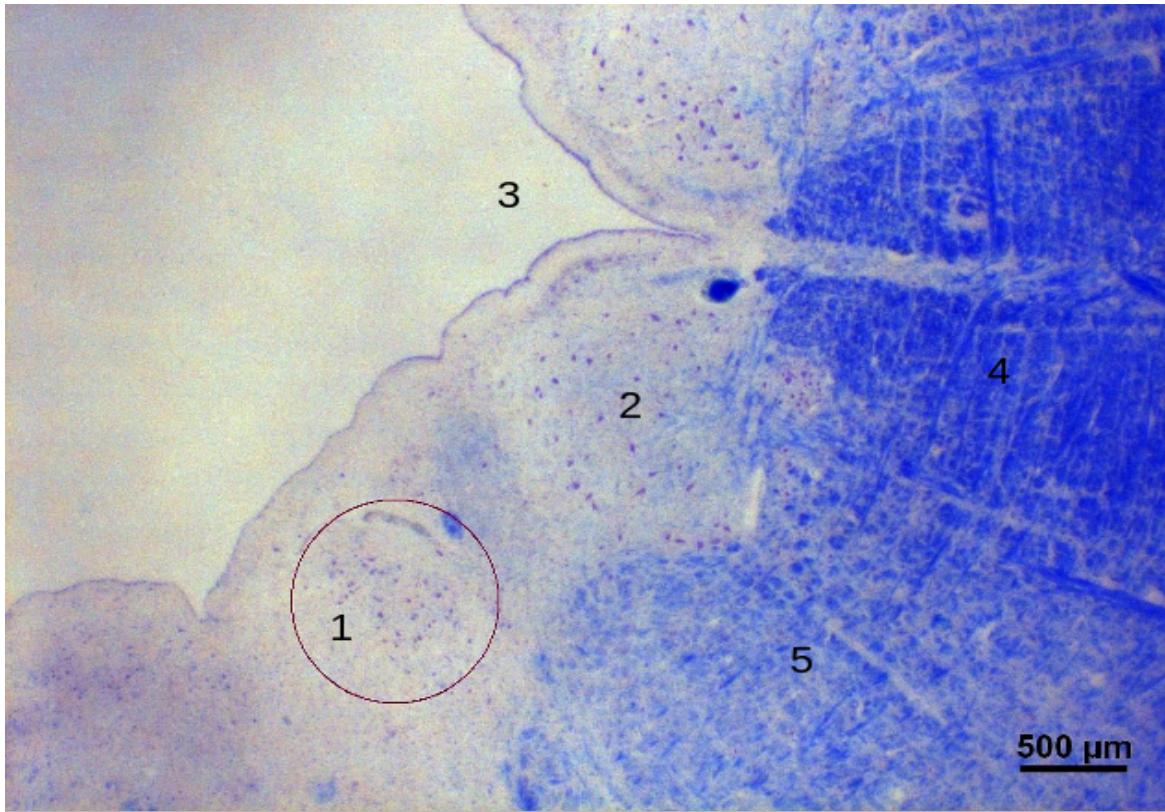
13)

(20)

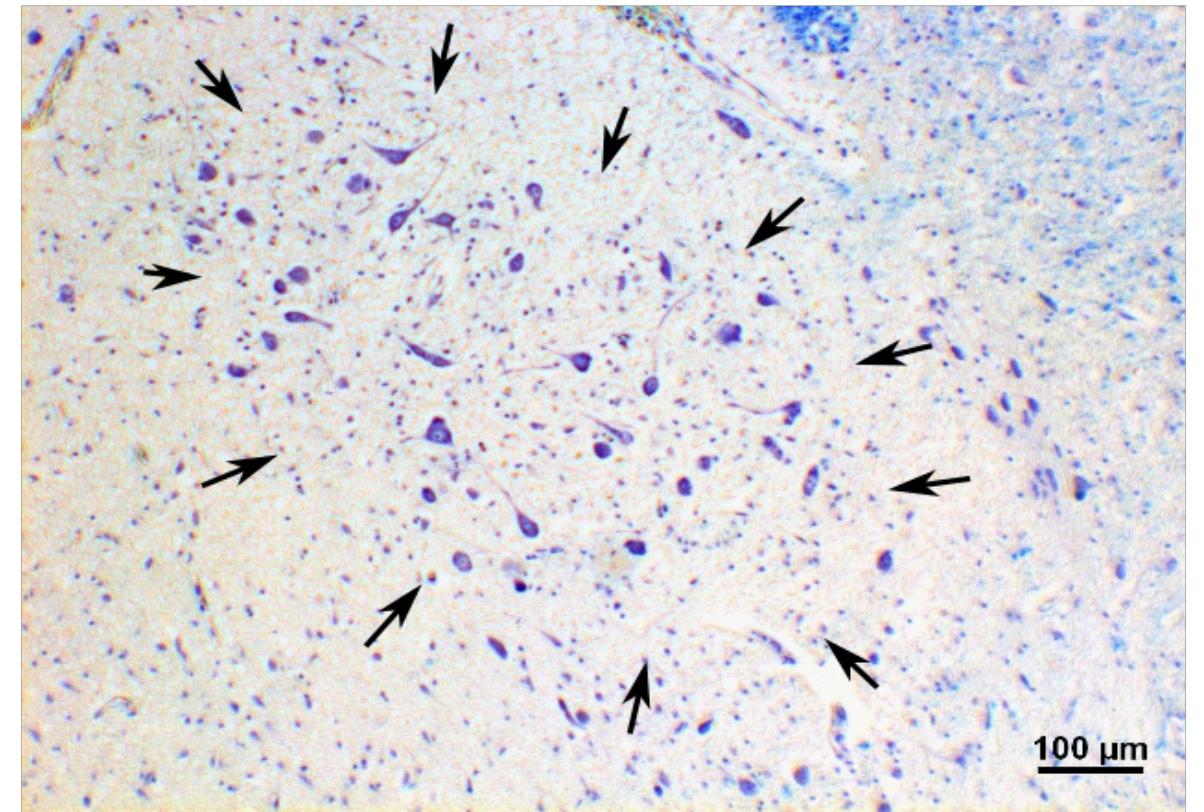
-57
4
56
Aggregated alpha-synuclein
Secreted inflammatory
mediators



LRRK2 è UN GENE DI
INTERESSE SIA PER LE
CAUSE GENETICHE DEL
PARKINSON SIA PERCHE'
LOCALIZZATO NELLA
REGIONE DI RISCHIO
DEL MORBO DI CROHN



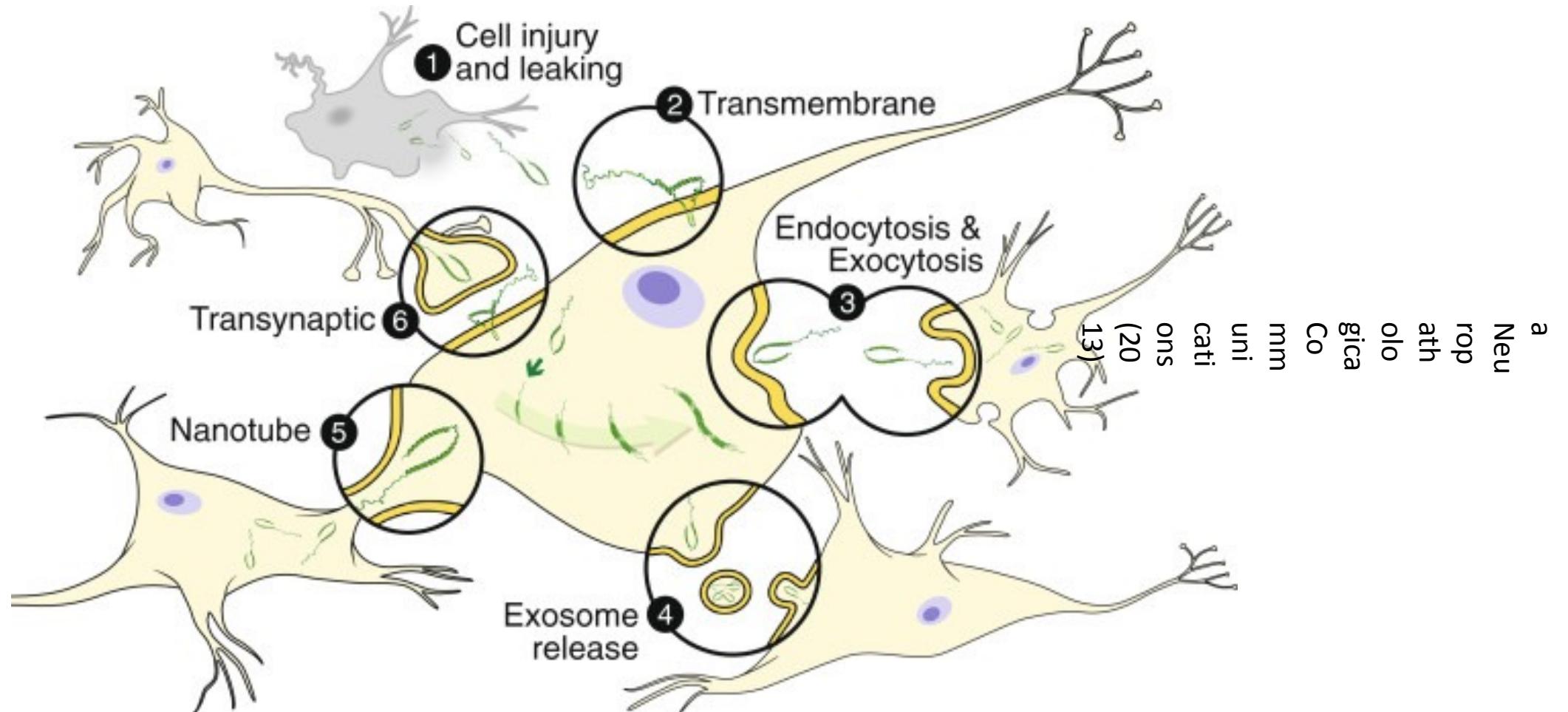
Nucleo motore dorsale del vago
(DmX) con corpi di Lewy



Braak et al, Neurobiol Aging. 24 (2003)

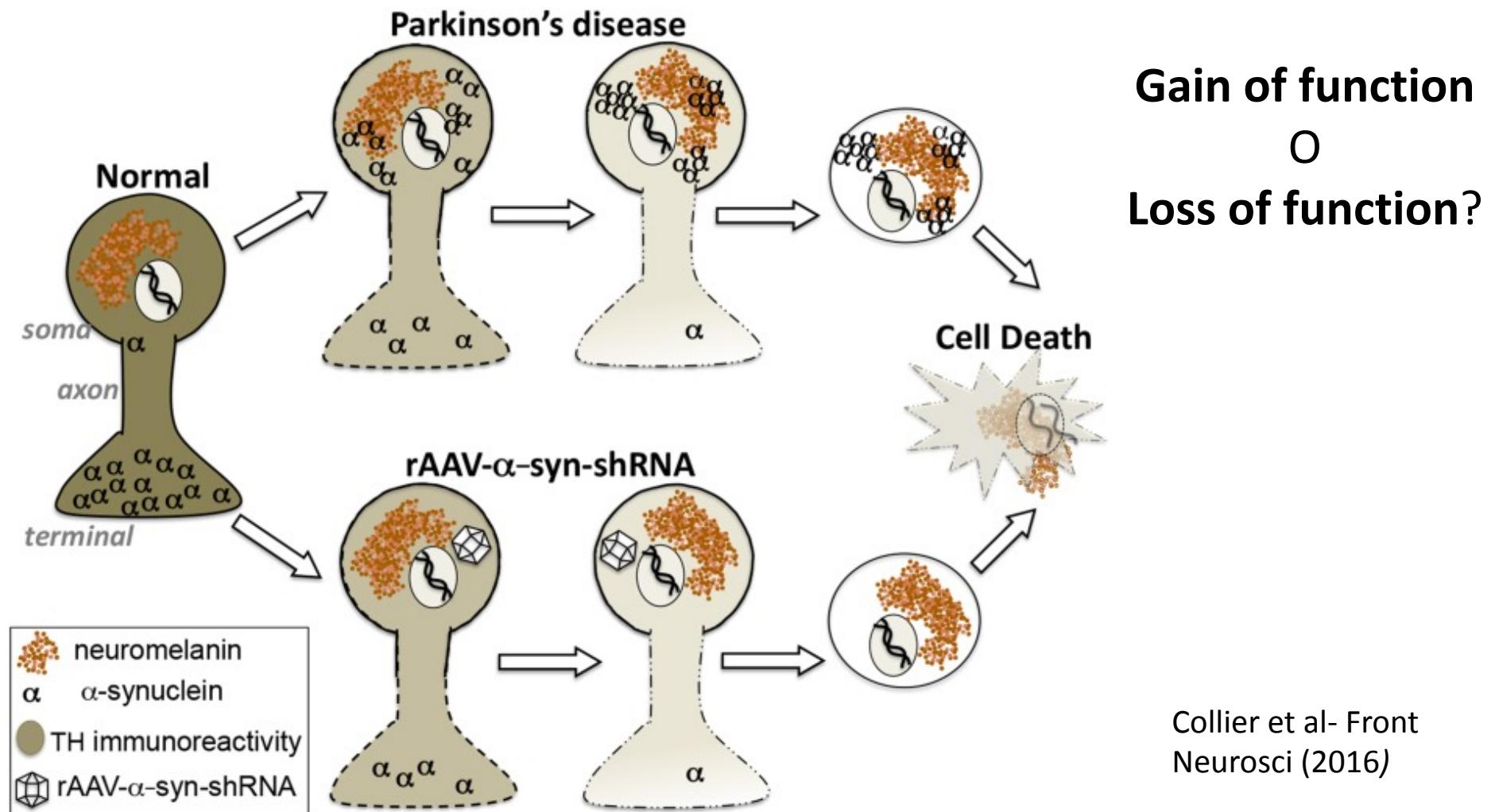
Alfa-sinucleina: meccanismi “prion-like”

La proteina malripietata deve diffondere e propagarsi



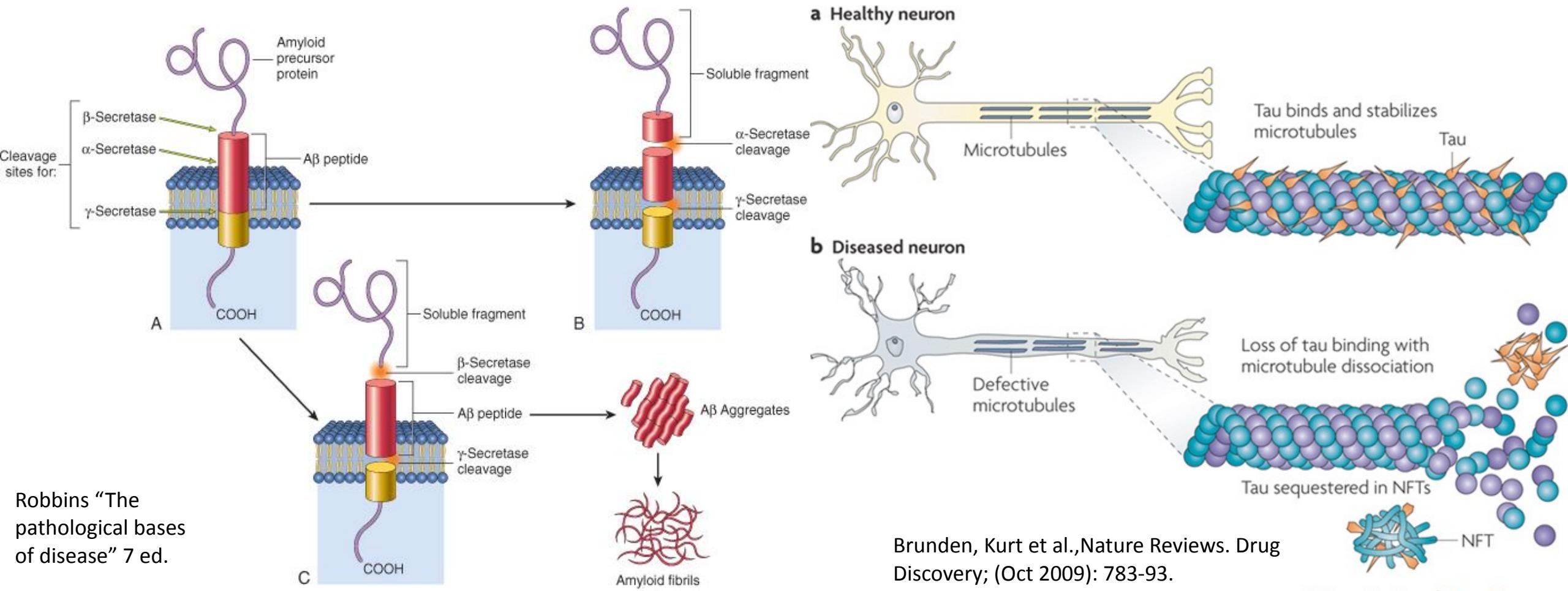
Alfa-sinucleina: meccanismi “prion-like”

La proteina malripiegata deve indurre tossicità neuronale



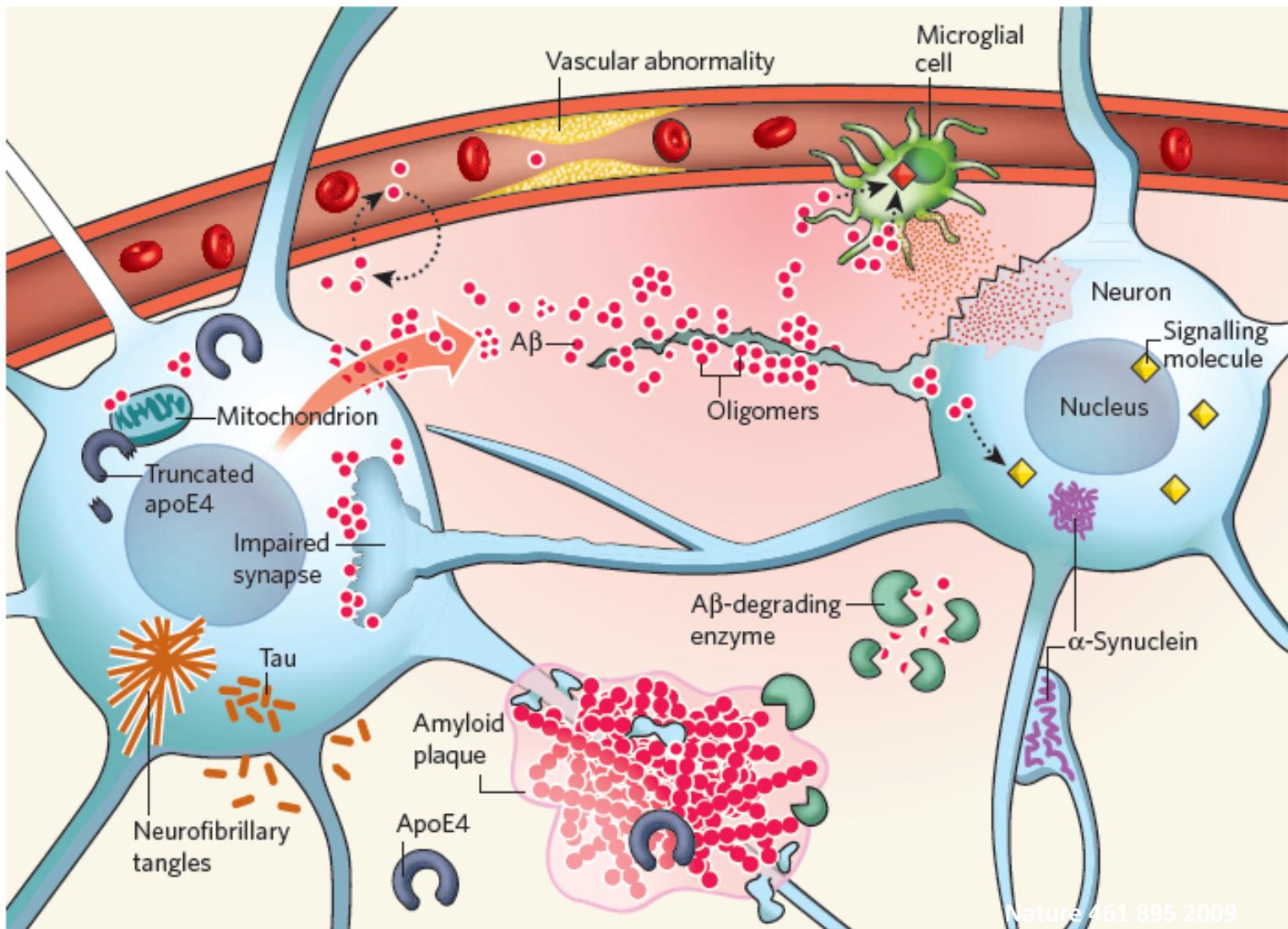
Malattia di Alzheimer

Basi molecolari della patogenesi



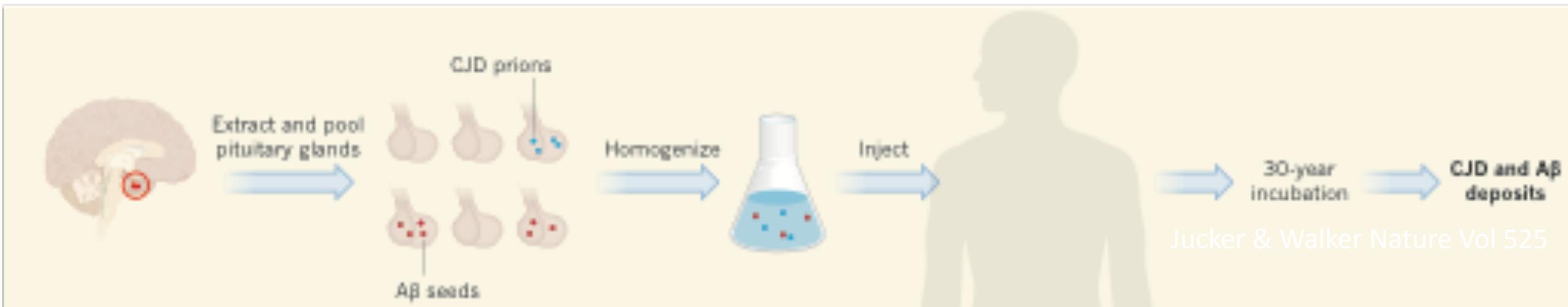
Danni da accumulo e infiammazione

- Microglia e infiammazione
- Microtubuli
- Interferenza con la trasmissione sinaptica
- Compromissione scambi



A β e Tau: meccanismi “prion-like”

La proteina malripiegata deve mostrare una “seeding activity”



A-Beta

- Inoculazione di tessuto cerebrale AD in topi transgenici per il gene bAPP
 - 4 sett: nessun riscontro
 - 5 mesi: Placche Senili omolateralmente , CAA

Kanet et al., 2000

P-Tau

- Inoculazione in topi transgenici ALZ17 di estratti da topi P301S
 - Sviluppo di accumuli in aree inoculate, e sinapticamente connesse
 - Pattern tipico di Taupatìe

Nature Cell Biology 2009

A β e Tau: meccanismi “prion-like”

La proteina malripiegata deve diffondere e propagarsi

A-Beta

La diffusione avviene:

- Per via assonale (aree sinapticamente connesse)
- Per via vascolare (accumuli perivascolari)

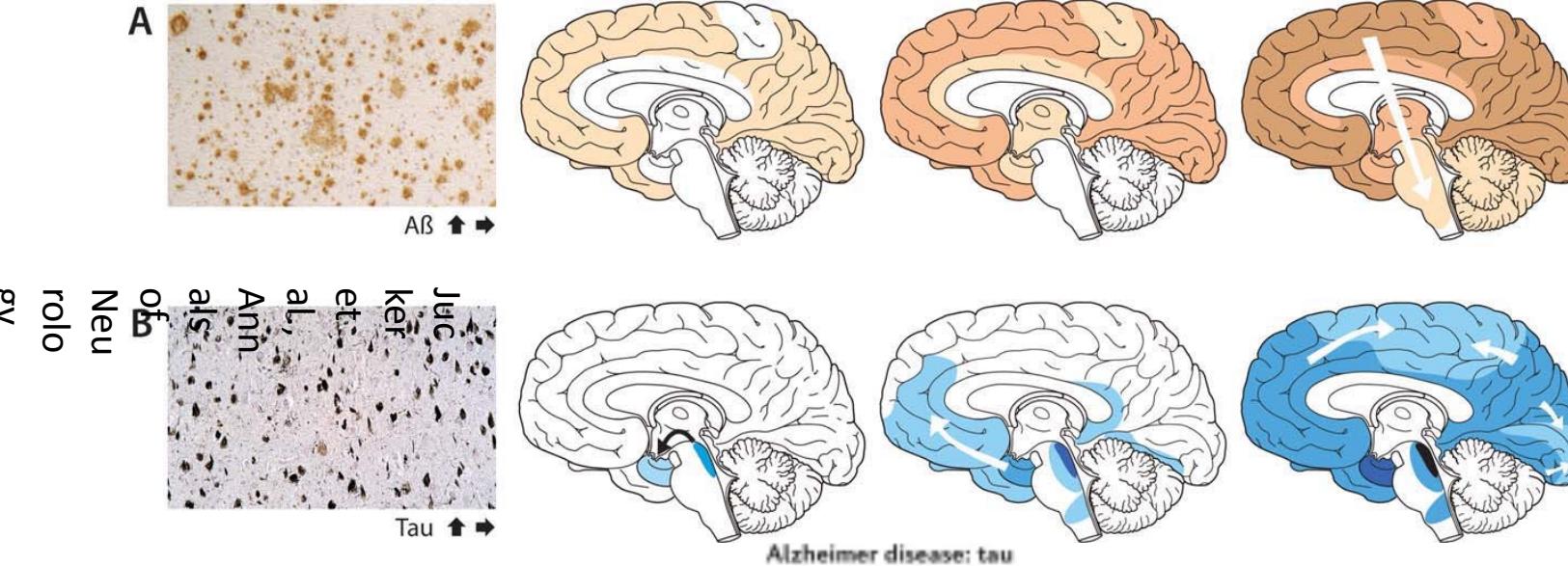
P-Tau

Cell-to-Cell Transmission:

- Esocitosi -> Endocitosi
- Trasporto assonale retrogrado o anterogrado
- Secreto sotto forma di fibrille



A β e Tau: meccanismi “prion-like”

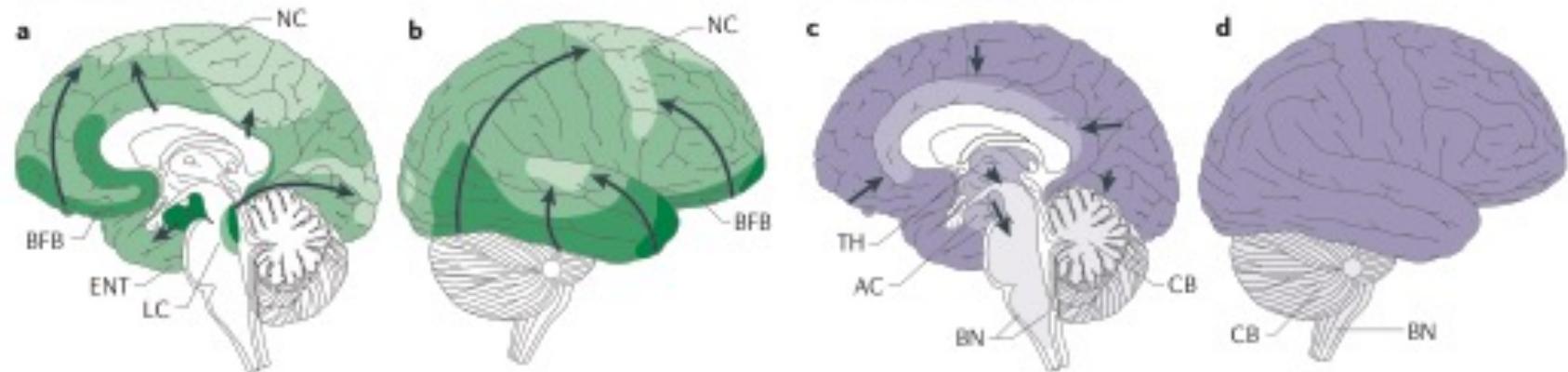


Diffusione di P-Tau

- Locus coeruleus
- Corteccia entorinale
- Ippocampo
- Neocorteccia.

Diffusione di A-Beta

- Neocorteccia orbitofrontale
- Ippocampo e diencefalo
- Nuclei della base
- Tronco encefalico
- Cervelletto (occasionalmente)



NB! Il paziente diventa sintomatico quando si formano abbondanti accumuli di Ab e Tau nella neocorteccia

Immunoterapia

Pro

- Riduzione formazione di placche
- Riduzione formazione di Ammassi Neurofibrillari
- Neutralizzaz. altamente discriminante di Oligomeri A-Beta
- Miglioramento del quadro neuropatologico
- Rallentamento del decadimento cognitivo

Contro

- Meningoencefalite (AN1792)
- Spesso passando da modelli murini a pazienti non si riscontra alcun miglioramento clinico
- Diminuzione effetto terapeutico col progredire della patologia

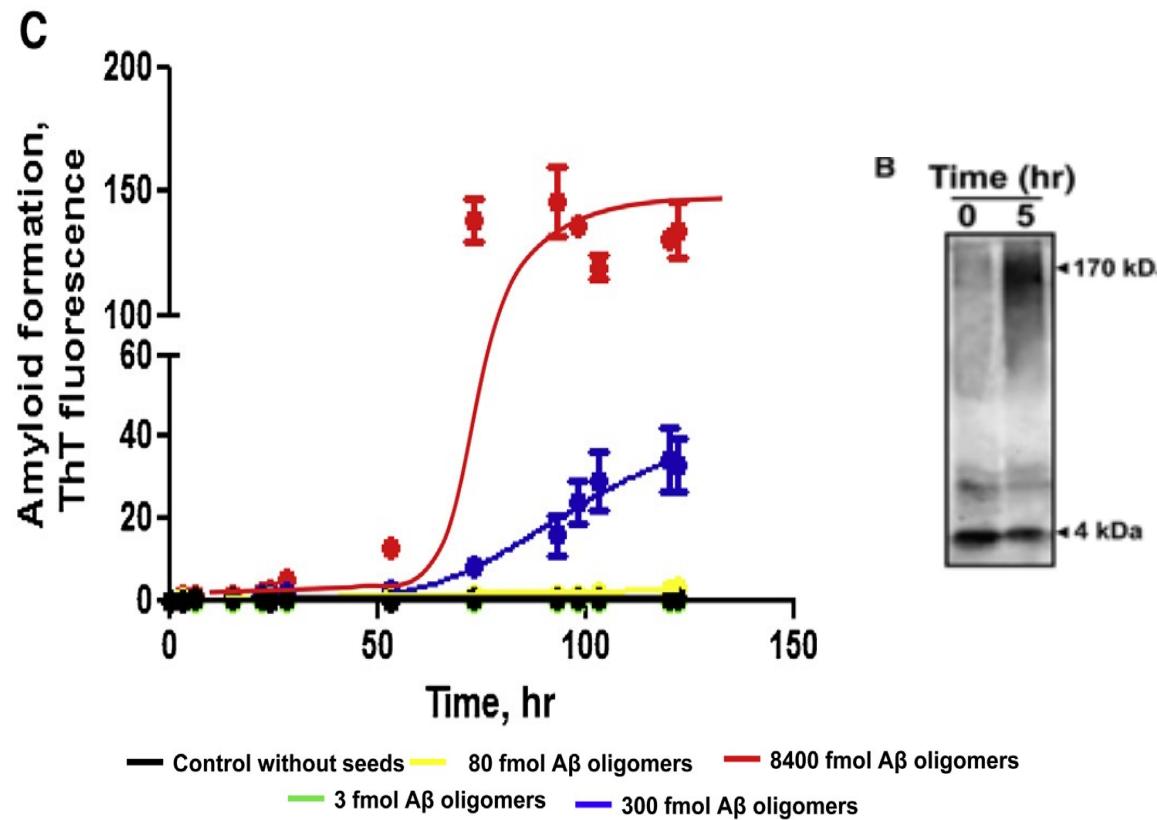
Intenti:

- Bloccare *Cell-to-Cell* Transmission
- Ostacolare deposizione

Requisiti:

- DSEs
- Attraversare BEE
- Non alterare TH2/TH1

A-Beta-PMCA



- Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) è una tecnica di laboratorio che sfrutta il potere di “seeding”
- Pool di proteine omologhe a contatto con un campione biologico
- Rilevazione tramite SDS-PAGE

Bibliografia

- Jucker M, Walker LC. **Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases.** *Nature* 2013; 501: 45-51
- Collinge J. **Mammalian prions and their wider relevance in neurodegenerative diseases.** *Nature* 2016; 539: 217-26
- Prusiner SB. **A unifying role for prions in neurodegenerative diseases.** *Science* 2012; 336: 1511-13
- Smethurst P, Sidle KCL, Hardy J. **Prion-like mechanisms of transactive response DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS).** *Neuropathol Appl Neurobiol* 2015; 41: 578-597
- Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DMA, Akiyama H, Hasegawa M. **Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains.** *Cell Rep* 2013; 4: 124-34
- Shimonaka S, Nonaka T, Suzuki G, Hisanaga S, Hasegawa M. **Templated aggregation of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) by seeding with TDP-43 peptide fibrils.** *J Biol Chem* 2016; 291: 8896-907.

Bibliografia

- Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, Lee VM, Trojanowsky JQ, Del Tredici K. **Amyotrophic lateral sclerosis – a model of corticofugal axonal spread.** *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 708-14
- Udan-Johns M, Bengoechea R, Bell S, Shao J, Diamond MI. **Prion-like aggregation of TDP-43 during heat shock is regulated by HSP40/70 chaperones.** *Hum Mol Genet* 2013; 23: 157-70
- Fallini C, Bassel GJ, Rossol W, Biology C. **The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth.** *Hum Mol Genet* 2012; 404: 1-45
- Hasegawa M, Nonaka T, Masuda-Suzukake M. **Prion-like mechanisms and potential therapeutic targets in neurodegenerative disorders.** *Pharmacology and Therapeutics* 2016
- Magdalini P, Cleveland DW. **The seeds of neurogeneration – Prion-like spreading in ALS.** *Cell* 2011; 147: 498-508
- Guo JL, Lee VMY. **Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases.** *Nature Medicine* 2014; 20: 130-138.

Bibliografia

- Lema TCM, Tyson T, Rey N, Grathwohl S, Britschgi M, Brundin P. **Inflammation and alpha-synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease – is there a link?**. *Mol Neurobiol* 2013; 47: 561-74
- Doorn KJ, Moors T, Drukarch B, van de Berg WDJ, Lucaen PJ, van Dam AM. **Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients.** *Acta Neuropathologica Communications* 2014; 2: 90
- Chu Y, Kordower JH. **The prion hypothesis of Parkinson's disease.** *Curr Neurol Neurosci Rep* 2015; 15: 28
- Collier TJ, Redmond DE Jr., Steele-Collier K, Lipton JW, Manfredsson FP. **Is alpha-synuclein Loss-of-function a contributor to Parkinsonian Pathology? Evidence from Non-human Primates.** *Front Neurosci* 2016; 10: 12
- Vella LJ, Hill AF, Cheng L. **Focus on Extracellular vesicles: exosomes and their role in Protein Trafficking and Biomarker Potential in Alzheimer's and Parkinson's Disease.** *Int J Mol Sci* 2016; 17: 173
- George S, Rey NL, Reichenbach N, Steiner JA, Brundin P. **Alpha-synuclein: the long distance runner.** *Brain Pathol* 2013; 23: 350-7.

Bibliografia

- Kordower JH, Dodiya HB, Kordower AM, Terpstra B, Paumier K, Medhavan L, Sortwell C, Steele-Collier K, Collier TJ. **Transfer of host-derived alpha-synuclein to grafted dopaminergic neurons in rat.** *Neurobiol Dis* 2011; 43: 552-7
- Mulak A, Bonaz B. **Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease.** *World J Gastroenterology* 2015; 21: 10609-20
- Gagne JJ, Power MC. **Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis.** *Neurology* 2010; 74: 995-1002
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. **Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain.** *Nat Cell Biol* 2009; 11: 909-14
- Kane MD, Lipinski WJ, Callahan MJ et al. **Evidence for seeding of β-amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer beta extracts in β-amyloid precursor transgenic mice.** *Journal of Neuroscience* 2000; 20: 3606-11
- Salvadores N, Shahnawaz M, Scarpini E, Tagliavini F, Soto C. **Detection of Misfolded Aβ Oligomers for sensitive biochemical diagnosis of Alzheimer's disease.** *Cell Reports* 2014; 7 261-8

Bibliografia

- Marciniuk K, Taschuk R, Napper S. **Evidence for prion-like mechanisms in several neurodegenerative diseases: potential implications for immunotherapy.** *Clin Dev Immunol* 2013
- Jucker M, Walker LC. **Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders.** *Ann Neurol* 2011; 70: 532-40
- Brettschneider J, Tredici KD, Lee VM, Trojanowski JQ. **Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies.** *Neuroscience* 2015; 16: 109-20
- Scholz T, Mandelkow E. **Transport and diffusion of Tau protein in neurons.** *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 3139-50