

"Le spezie della vita": derivati polifenolici della curcumina possono agire sull'aggregazione proteica legata alla malattia di Parkinson. Paolo Ruzza, ICB-CNR

La malattia di Parkinson (PD) appartiene al gruppo di patologie legate al non corretto folding proteico ed è caratterizzata dalla degenerazione progressiva dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra* del cervello. Tra i meccanismi biochimici proposti per la patogenesi del PD troviamo l'accumulo intracellulare di aggregati proteici di α -sinucleina, lo stress ossidativo causato dai metaboliti della dopamina, e alterazioni nei livelli di ferro e glutazione nella *substantia nigra*. Uno dei principali obiettivi nello sviluppare nuovi approcci terapeutici per PD è lo sviluppo di piccole molecole che possano agire contemporaneamente su almeno due di questi processi patologici. Recenti risultati sperimentali indicano che vari antiossidanti, tra cui polifenoli con strutture simili alla curcumina (la sostanza chimica che dà al curry il suo colore giallo brillante), hanno potenti effetti anti-fibrillogeni e destabilizzanti le fibrille di α -sinucleina in modelli *in vitro*.

La degradazione della curcumina in soluzione acquosa a pH fisiologico ha suggerito di studiare le proprietà di alcuni suoi prodotti di degradazione quali il deidrozingerone (1), l'analogo O-metil (2), il zingerone (3), e i loro dimeri simmetrici (bifenili 4-6) (Fig. 1), di interagire con l' α -sinucleina e di modularne l'aggregazione. Il deidrozingerone e lo zingerone, come i loro derivati difenilici, possiedono inoltre una potente attività antiossidante e anti-infiammatoria.

Lo studio delle interazioni di queste molecole con l' α -sinucleina è stato condotto mediante tecniche di dicroismo circolare a radiazioni di sincrotrone (SRCD) presso la Diamond Light Source, Ltd. (Didcot, UK). In questa tecnica, il fascio di luce intenso e luminoso della radiazione di sincrotrone sostituisce la tradizionale lampada allo xenon con evidenti vantaggi nella regione spettrale investigabile e nel rapporto segnale/rumore. Lo spettro SRCD nella regione del lontano UV dell' α -sinucleina presenta una banda negativa a circa 195 nm, caratteristica della natura essenzialmente non strutturata della proteina in soluzione acquosa. L'aggiunta dei leganti (1-6) induce solo piccole variazioni nell'intensità di questa banda a indicare l'assenza di qualsiasi struttura ordinata indotta dal binding di queste molecole.

La capacità dei ligandi di interferire con l'aggregazione proteica è stata valutata utilizzando il test al Congo red e gli spettri SRCD. Il Congo red interagisce con le fibrille variando in modo caratteristico il suo spettro di assorbimento. I dati ottenuti

evidenziano come i composti 4 e 5 siano in grado di inibire in modo significativo la produzione di fibrille proteiche. A confermare di questo risultato, la struttura secondaria di della sola α -sinucleina o in presenza di composti 4 e 5 è stata valutata al termine dell'esperimento aggregazione. Mentre l' α -sinucleina incubata in assenza di ligandi mostra un caratteristico spettro CD riconducibile ad una struttura a β -sheet, in presenza dei composti 4 o 5 questa non è osservabile, ad indicare la presenza preponderante di α -sinucleina nella conformazione nativa (Fig. 2).

Il presente studio ha confermato l'idoneità della spettroscopia SRCD per analizzare le interazioni ligando-proteina in piccoli campioni e confermato l'interazione tra i derivati curcumina e l' α -sinucleina con l'inibizione della sua aggregazione, fornendo preziose indicazioni su future molecole volte a inibire l'aggregazione proteica.

Ringraziamenti

Ringraziamo la Diamond Light Source per l'accesso alla beamline B23 (SM7153-1) che ha permesso di ottenere i risultati qui illustrati. Il presente lavoro di ricerca è stato parzialmente finanziato dalla Comunità Europea, Settimo Programma Quadro (FP7/2007-2013, grant n° 226716).

Pubblicazione di riferimento: Marchiani, A.; Mammi, S.; Siligardi, G.; Hussain, R.; Tessari, I.; Bubacco, L.; Delogu, G.; Fabbri, D.; Dettori, A.M.; Sanna, D.; Dedola, S.; Serra, P.A.; Ruzza, P. Small molecules interacting with alpha-synuclein: antiaggregating and cytoprotective properties. *Amino Acids* **2013**, *45*, 327-338.

Ruzza, P. 'Spice of life': Indian spice turmeric polyphenol by-products may act on Parkinson's related α -synuclein aggregation. *Diamond Light Source Annual Review 2013/14*. **2014**, 34-35.

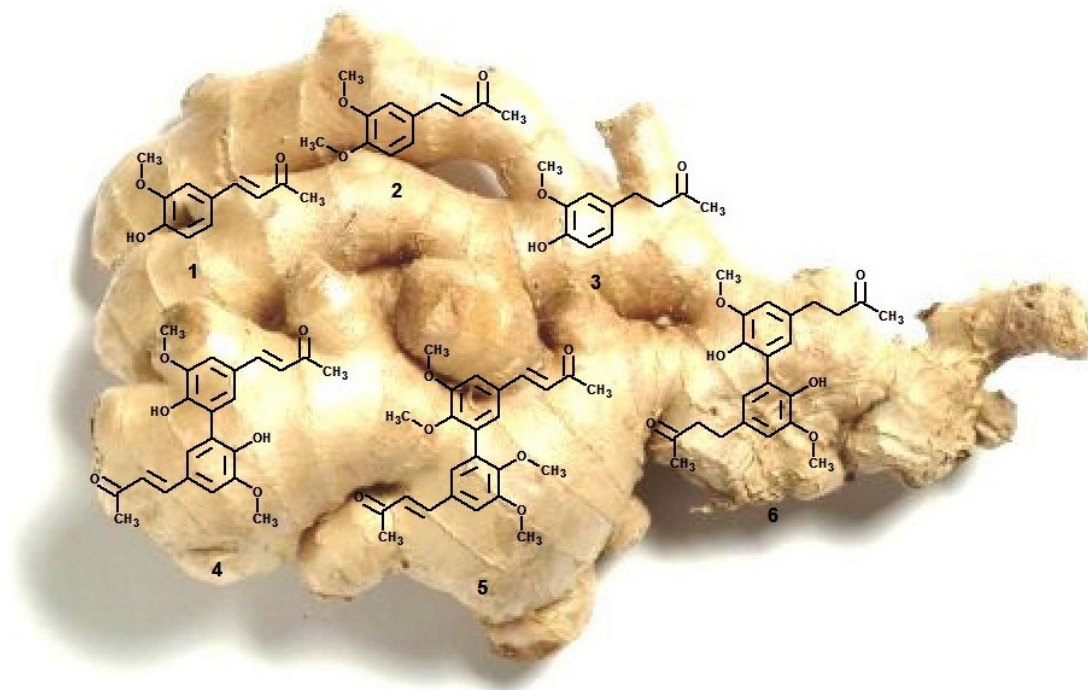


Figura 1. Struttura chimica del deidrozingerone (**1**), dell'analogo O-metil (**2**), del zingerone (**3**), e dei loro derivati bifenilici **4-6**.

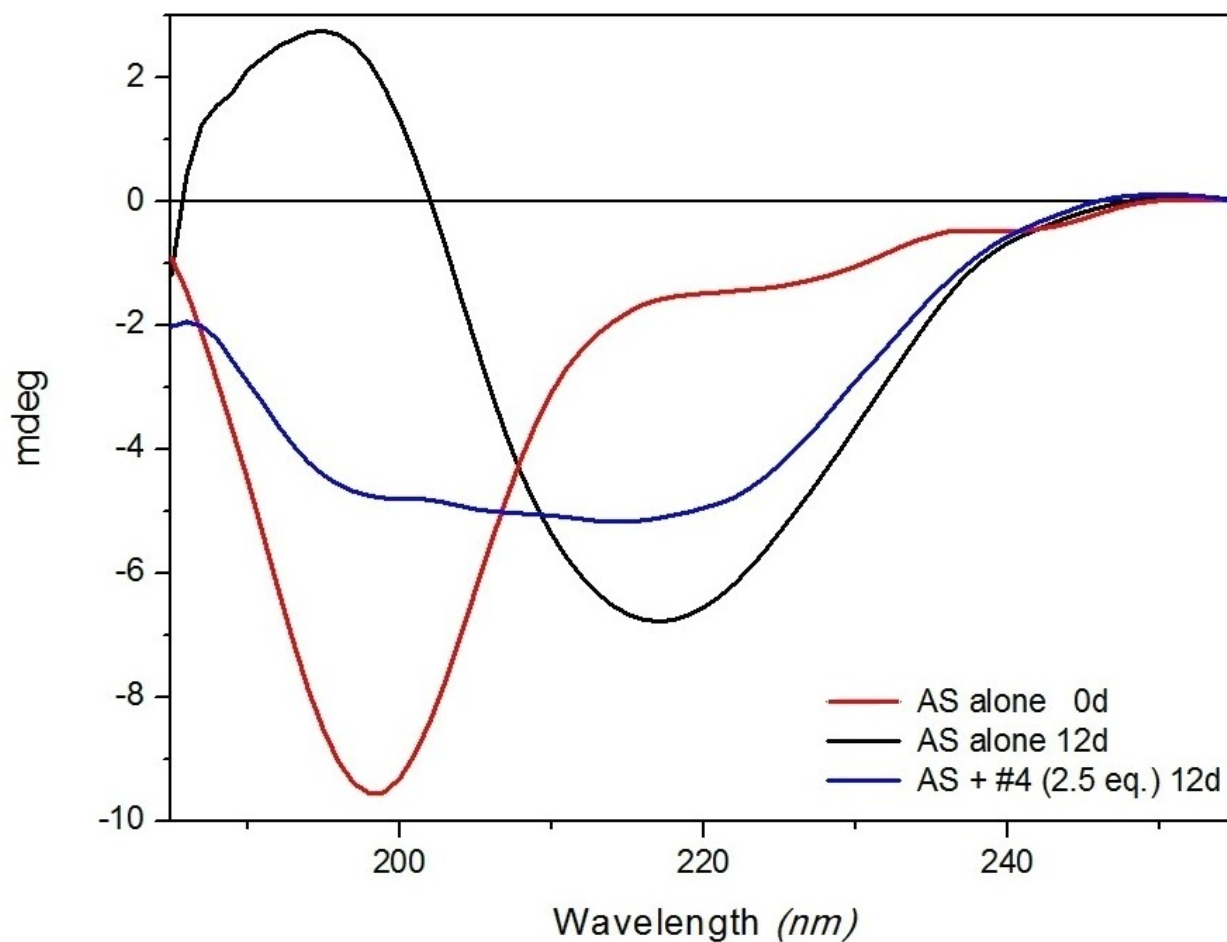


Figura 2. Far-UV Spettri SRCD nel lontano-UV della sola α -sinucleina o in presenza di 2.5 equiv. del composto **4** a 0 e 12 giorni di incubazione a 37 ° C. Lo spettro SRCD dell' α -sinucleina in presenza di 2,5 equiv. del composto **4** al tempo zero è sovrapponibile a quello della sola α -sinucleina. La soluzione di α -sinucleina è 100 μ M in tampone fosfato 20 mM, pH 6,8. I campioni sono stati diluiti con tampone per ottenere una concentrazione teorica proteine di 4 μ M.

“Spice of life”: polyphenol curcumin by-products may act on Parkinson's relates protein aggregation. Paolo Ruzza, ICB-CNR

Parkinson's disease (PD) belongs to the group of protein misfolding diseases and it is characterized by the progressive degeneration of the dopaminergic neurons from the *substantia nigra* of the brain. Among the biochemical mechanisms proposed for the pathogenesis of PD, our attention has been focused on the intracellular accumulation and aggregation of misfolded proteins, in particular of α -synuclein; the oxidative stress caused by dopamine metabolites; and the alterations in the iron and glutathione levels in the *substantia nigra*. A main goal in the development of new therapeutic approaches for PD is the design of molecules able to target simultaneously different processes. Recent experimental findings indicate that various antioxidants, including polyphenols belonging to the curcumin family, have potent anti-fibrillogenic effects and destabilize α -synuclein fibrils in *in vitro* models. The rapid degradation of curcumin in aqueous solution at physiological pH, suggested us to evaluate the ability of its by-products dehydrozingerone (**1**), its *O*-methyl derivative (**2**), zingerone (**3**), and their C-2 symmetric dimers (biphenyl **4-6**, respectively) (Fig. 1) to interact with α -synuclein and to modulate its aggregation. Dehydrozingerone and zingerone, as well as their dimers, show also potent antioxidant and anti-inflammatory activities in various models.

To investigate the interaction of these molecules with α -synuclein, we used the Synchrotron Radiation Circular Dichroism (SRCD) spectroscopy at the Diamond Light Source (UK) B23 beamline. In the SRCD spectroscopy, the traditional xenon arc lamp source is replaced with the more intense and bright light beam produced by the synchrotron, this permits to measure lower wavelength data containing more structural information, while the higher signal-to-noise requires smaller samples and enables measurements in absorbing buffers.

The far-UV SRCD spectrum of native α -synuclein displayed a negative band at about 195 nm, characteristic of the essentially unstructured nature of α -synuclein in aqueous environment. The addition of ligands (**1-6**) induced only small changes in the intensity of the negative band at 195 nm, indicating the absence of any folded α -synuclein conformation in presence of ligands.

The effects of ligand binding on α -synuclein aggregation were evaluated using both Congo red assay and SRCD spectra. Congo red strongly interacts with amyloid aggregates, showing characteristic changes in its absorption band. Experimental data

showed that compounds **4** and **5** are able to inhibit significantly the aggregation of α -synuclein. To confirm this result, the secondary structures of α -synuclein alone and in the presence of compounds **4** and **5**, at the end of the aggregation experiment, were evaluated by SRCD. The far-UV SRCD spectrum of α -synuclein alone displayed the presence of a β -sheet structure characteristic of aggregated protein, while in the presence of compound **4** or **5**, the far-UV SRCD spectra of α -synuclein showed a broad negative band indicating the presence of a large amount of unstructured native α -synuclein conformation (Fig. 2).

This study confirms the suitability of SRCD spectroscopy for analyzing tiny samples quantitating ligand-protein interactions, and confirms the interaction between curcumin derivatives and α -synuclein with inhibition of its aggregation, providing insights on future molecules designed to inhibit α -synuclein aggregation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Diamond Light Source for access to beamline B23 (SM7153-1) that contributed to the results presented here. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n^o 226716.

Publications: Marchiani, A.; Mammi, S.; Siligardi, G.; Hussain, R.; Tessari, I.; Bubacco, L.; Delogu, G.; Fabbri, D.; Dettori, A.M.; Sanna, D.; Dedola, S.; Serra, P.A.; Ruzza, P. Small molecules interacting with alpha-synuclein: antiaggregating and cytoprotective properties. *Amino Acids* **2013**, *45*, 327-338.

Ruzza, P. 'Spice of life': Indian spice turmeric polyphenol by-products may act on Parkinson's related α -synuclein aggregation. *Diamond Light Source Annual Review 2013/14*. **2014**, 34-35.

Figure 1: Chemical structure of curcumin by-products tested. Dehydrozingerone (**1**), O-methyldehydrozingerone (**2**), zingerone (**3**), and their biphenyl dimers (**4-6**).

Figure 2: Far-UV SRCD spectra of α -synuclein alone or in the presence of 2.5 equiv. of compound **4** at 0 and 12 days of incubation at 37°C. The far-UV SRCD spectrum of α -

synuclein in the presence of 2.5 equiv. of compound **4** at time zero is superimposable to that of α -synuclein at the same time. α -Synuclein solution was 100 μ M in 20 mM phosphate buffer, pH 6.8. Samples were diluted with buffer to obtain a theoretical protein concentration of 4 μ M.