

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Master Degree in Biomedical Engineering



POLITECNICO
MILANO 1863

**EFFETTO DELLE NANOPLASTICHE SULL' AGGREGAZIONE
DI β -AMILOIDI: STUDI PRELIMINARI IN SILICO ED IN
VITRO**

Relatore: Prof. Alfonso Gautieri

Correlatore: Dott. Luca Colnaghi

Tesi di laurea di:

Camboni Tiziana Matr. 905011

Pibiri Andrea Matr. 920799

Anno accademico 2019/20

INDICE

INDICE.....	3
INDICE DELLE FIGURE.....	6
INDICE DELLE TABELLE	9
<u>SOMMARIO.....</u>	10
OBIETTIVO DELLA TESI	10
MATERIALI E METODI.....	11
RISULTATI.....	12
CONCLUSIONI	13
<u>ABSTRACT</u>	15
<u>CAPITOLO 1.....</u>	19
INTRODUZIONE	19
1.1.1. INQUINAMENTO	19
1.1.2. NANOPLASTICHE.....	20
1.1.3. NANOPLASTICHE E SISTEMI BIOLOGICI	21
1.2 MORBO DI ALZHEIMER	24
1.2.1. EZIOPATOGENESI.....	24
1.3.1. INTERAZIONI E AGGREGAZIONE TRA PROTEINE E NANOPLASTICA.....	32
1.3.2. LEGAMI ED INTERAZIONI	35
<u>CAPITOLO 2</u>	39
MATERIALI E METODI.....	39
2.1 DINAMICA MOLECOLARE.....	39
2.1.1. MINIMIZZAZIONE ED EQUILIBRAZIONE	41
2.1.2. PROTOCOLLO COMPUTAZIONALE	43
2.1.3. DESIGN DI NANOPLASTICHE	45
2.1.4. DESIGN CATENE PEPTIDICHE E FIBRILLE	47
2.2 CARATTERIZZAZIONE <i>IN VITRO</i>	49
2.2.1. SINTESI DEI PEPTIDI	51

2.2.2. DICROISMO CIRCOLARE	52
2.2.3. SPETTROSCOPIA E SAGGIO TIOFLAVINAT (THT)	54
2.2.4. MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA	56

CAPITOLO 3.....59

RISULTATI E DISCUSSIONE	59
3.1 ANALISI IN SILICO	59
3.1.1. RMSD	62
3.1.2. PERCENTUALE β-SHEET	66
3.1.2. ANALISI DEI CONTATTI	68
3.2. ANALISI IN VITRO	75
3.2.1. SAGGIO TIOFLAVINAT (THT)	76
3.2.2. DICROISMO CIRCOLARE	78
3.2.3. AFM	80
DISCUSSIONE	83

BIBLIOGRAFIA.....88

APPENDICE.....96

A) CONFRONTO DELLE INTERAZIONI TRA IL PEPTIDE AB42 E LE NANOPLASTICHE	97
B) CONFRONTO DELLE INTERAZIONI TRA L'OLIGOMERO 5OQV E LE NANOPLASTICHE	98
C) CONFRONTO DELLE INTERAZIONI TRA IL PEPTIDE AB42-A2V E LE NANOPLASTICHE	99
D) CONFRONTO DELLE INTERAZIONI TRA L'OLIGOMERO 5OQV-A2V E LE NANOPLASTICHE	100
E) CONFRONTO DELLE VARIE NANOPLASTICHE SUL PEPTIDE KLVFF.....	101
F) CONFRONTO DELLE INTERAZIONI TRA IL PEPTIDE AB25-42 E LE NANOPLASTICHE	102
G) CONFRONTO DELLE INTERAZIONI TRA L'OLIGOMERO 5OQV 25-42 E LE NANOPLASTICHE	103
H) INFLUENZA DELLE NANOPLASTICHE NEL MANTENIMENTO DELLA STRUTTURA BETA-SHEET DELL'OLIGOMERO 5OQV E DEL 5OQV-A2V	104
I) INFLUENZA DELLE NANOPLASTICHE NEL MANTENIMENTO DELLA STRUTTURA BETA-SHEET DELL'OLIGOMERO 5OQV 25-42	106

J)	NUMERO DEI CONTATTI E RESIDUI DI CONTATTO TRA LE NANOPLASTICHE E AB42	107
K)	NUMERO DEI CONTATTI E RESIDUI DI CONTATTO TRA NANOPLASTICHE E 5OQV	108
L)	NUMERO DEI CONTATTI E RESIDUI DI CONTATTO TRA NANOPLASTICHE E AB42-A2V	109
M)	NUMERO CONTATTI E RESIDUI DI CONTATTO TRA NANOPLASTICHE E 5OQV-A2V	110
N)	NUMERO CONTATTI E RESIDUI DI CONTATTO TRA NANOPLASTICHE E PEPTIDE AB25-42	111
O)	NUMERO CONTATTI E RESIDUI DI CONTATTO TRA NANOPLASTICHE E L'OLIGOMERO 5OQV25-42	112
P)	NUMERO CONTATTI E RESIDUI DI CONTATTO TRA NANOPLASTICHE E PEPTIDE KVLFF	113
Q)	REPLICATEPS.SH	114
R)	REPLICATE_MONOMER.TCL	114
S)	RENAME_PS.TCL	115
T)	BUBBLEFAST.TCL:	115
U)	ANALYSIS_ONTACT	117

INDICE DELLE FIGURE

FIGURA 1 MASCHERINE RACCOLTE IN UNA SPIAGGIA DURANTE L'EMERGENZA DA COVID-19;.....	20
FIGURA 2 DIAGRAMMA SCHEMATICO CHE ILLUSTRRA I POTENZIALI (AL MOMENTO SPECULATIVI) MECCANISMI CELLULARI DI TOSSICITÀ MP / NP.	23
FIGURA 3 SCHEMA ESEMPLICATIVO DELLA VIA NON AMILOIDOGENICA (SINISTRA) E DELLA VIA AMILOIDOGENICA (DESTRA) DOVUTE ALLE DIVERSE INTERAZIONI TRA A-SECRETASI, B-SECRETASI E Γ -SECRETASI E LA PROTEINA APP.....	25
FIGURA 4 A SINISTRA I MICROTUBULI SONO STABILIZZATI DALLA PRESENZA DELLA PROTEINA TAU; A DESTRA, IN SEGUITO A FOSFORILAZIONE DELLA PROTEINA TAU, IL MICROTUBULO DEPOLIMERIZZA E SI HA LA FORMAZIONE DEI GROVIGLI NEUROFIBRILLARI.	28
FIGURA 5 NELL'IMMAGINE VIENE MOSTRATO COME L'ATTIVAZIONE DELLA MICROGLIA DETERMINA, INSIEME ALLE FIBRILLE DI AB E I GROVIGLI NEUROFIBRILLARI, L'APOPTOSI DEL NEURONE.	29
FIGURA 6 MODELLI DI FORMAZIONE DEI CORPI DI INCLUSIONE E DEGLI AGGRESOMI	33
FIGURA 7 RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELL'IPOTESI ATTUALE DELLA CORONA PROTEICA.	35
FIGURA 8 RAPPRESENTAZIONE DELLA SUPERFICIE DELL'ENERGIA POTENZIALE PES IN 3D A SINISTRA E IN 2D A DESTRA.	41
FIGURA 9 DISTRIBUZIONE DI MAXWELL-BOLTZMANN IN FUNZIONE DELLE DIVERSE TEMPERATURE.....	42
FIGURA 10 SCHEMA GENERALE DI UN ALGORITMO DI DINAMICA MOLECOLARE.....	43
FIGURA 11 NELL'IMMAGINE VENGONO MOSTRATE LE 5 CONFIGURAZIONI DI INTERFACCIA TRA IL POLIMERO E L'OLIGOMERO.....	44
FIGURA 12 MONOMERI UTILIZZATI PER LA CREAZIONE DELLE CATENE PLASTICHE. DA SINISTRA VERSO DESTRA SONO RAPPRESENTATI IL POLIETILENE, IL POLIPROPILENE, IL POLISTIRENE E POLIETILENE TEREFTALATO	45
FIGURA 13 POSIZIONE INIZIALE DELLE CATENE DI POLIMERO PER LA CREAZIONE DELLA NANOPARTICELLA PLASTICA	46
FIGURA 14 FORMAZIONE NANOPARTICELLA DI PET NELLA SUA CONFIGURAZIONE INIZIALE; B. CONFIGURAZIONE INTERMEDIA; C. CONFIGURAZIONE FINALE.	47
FIGURA 15 NELL'IMMAGINE SONO RAPPRESENTATI, COME ESEMPIO DEI PEPTIDI REALIZZATI CON PYMOL E AVOGRADRO: IL KVLFFIN ALTO E IL AB ₂₅₋₄₂ IN BASSO.	48
FIGURA 16 NELL'IMMAGINE VENGONO MOSTRATI GLI OLIGOMERI 5OQV WILD TYPE E IL MUTANTE A2V.....	49

FIGURA 17 STRUTTURA MOLECOLARE DEL FMOC	51
FIGURA 18 ESEMPIO DI PROTEZIONE DEL C-TER DELLA GLICINA (GLY).	52
FIGURA 19 SCHEMA DELLA LUCE POLARIZZATA CIRCOLARE.....	52
FIGURA 20 GRAFICO RAPPRESENTANTE LE CURVE DI STRUTTURE SECONDARIE STANDARD.	54
FIGURA 21 A SINISTRA È RAPPRESENTATO UN GRAFICO FREQUENZA VS. AMPIEZZA CON CURVE CHE HANNO UN PICCO NELLA LORO FREQUENZA DI RISONANZA. A DESTRA DALL'ALTO VERSO IL BASSO SI HA LO SPETTRO CONTINUO, LO SPETTRO DI EMISSIONE E LO SPETTRO DI ASSORBIMENTO DI UN DATO ELEMENTO.....	55
FIGURA 22 STRUTTURA TIOFLAVINA T (THT)	56
FIGURA 23 SCHEMA AFM (80)	57
FIGURA 24 NELL'IMMAGINE SI PUÒ OSSERVARE IL CONTATTO TRA DECAALANINA E POLIETILENE.	60
FIGURA 25 NELL'IMMAGINE VENGONO MOSTRATE I TIMELINE RELATIVE ALLA STRUTTURA SECONDARIA DEI FRAMMENTI PEPTIDICI, OTTENUTI CON IL TOOL DI VMD. NELLE FIGURE A E B VENGONO MOSTRATE LE STRUTTURE SECONDARIE RISPETTIVAMENTE DELLA DECALANINA E DEL TRIPTOPHAN ZIPPER IN AMBIENTE ACQUOSO SENZA PRESENZA DI NANOPLASTICA; NELLE FIGURE C E D LE STRUTTURE SECONDARIE RISPETTIVAMENTE DELLA DECALANINA E DEL TRIPTOPHAN ZIPPER IN AMBIENTE ACQUOSO CON PRESENZA DI NANOPLASTICA	61
FIGURA 26 GRAFICI DI RMSD DEL PEPTIDE AB42 (SINISTRA) E AB42-A2V (DESTRA). ...	63
FIGURA 27 GRAFICI RMSD IN CUI VIENE MOSTRATO IL CONFRONTO DELLE INTERAZIONI DELLE DIVERSE NANOPLASTICHE CON IL PEPTIDE AB42 A SINISTRA E CON IL PEPTIDE AB42A-2V A DESTRA.....	63
FIGURA 28 RMSD DI CONFRONTO DELLE VARIE NANOPLASTICHE CON IL PEPTIDE KLVFF.	65
FIGURA 29 GRAFICI RAPPRESENTATI LA STRUTTURA B-SHEET FORMATA E MANTENUTA NEL TEMPO DEL PEPTIDE AB42-A2V A CONTATTO CON LA NANOPLASTICA	66
FIGURA 30 DALL'ALTO VERSO IL BASSO VENGONO RIPORTATE LE PERCENTUALI DI STRUTTURA B-SHEET MANTENUTA NEL TEMPO DELLA FIBRILLA 5OQV A CONTATTO CON LE DIVERSE NANOPLASTICHE.....	67
FIGURA 31 CONFRONTO TRA I CONTATTI INSTAURATI TRA LE VARIE NANOPLASTICHE E IL PEPTIDE AB42-A2V. DA SINISTRA VERSO DESTRA PS E PE (IN ALTO), PET E PP (IN BASSO).	69
FIGURA 32 NEGLI ISTOGRAMMI È POSSIBILE INDIVIDUARE QUALI SIANO GLI AMMINOACIDI CHE DETERMINANO UN MAGGIOR NUMERO DI CONTATTI PER OGNI SISTEMA.	70

FIGURA 33 IDENTIFICAZIONE DELLE TRE PRINCIPALI REGIONI IDENTIFICATE: A SINISTRA LA REGIONE 1 CON GLY9, TYR10, AL CENTRO LA REGIONE 2 CON VAL18, PHE19, PHE20 E A DESTRA LA REGIONE 3 CON GLY38, VAL39, VAL40,.....	73
FIGURA 34 NELLE IMMAGINI VENGONO MOSTRATE LE NANOPLASTICHE CHE INTERAGISCONO CON LE DIVERSE REGIONI INDIVIDUATE. IN ALTO A SINISTRA È RAPPRESENTATO IL PP, IN ALTO A DESTRA IL PE, IN BASSO A SINISTRA IL PET E IN BASSO A DESTRA IL PS.	74
FIGURA 35 SPETTRI DEL SAGGIO CON THT	76
FIGURA 36 SPETTRI NORMALIZZATI DEL SAGGIO CON THT	77
FIGURA 37 SPETTRI OTTENUTI MEDIANTE ANALISI DI DICROISMO CIRCOLARE.	79
FIGURA 38 ACQUISIZIONI DI AFM AL TEMPO T=0 DEI CAMPIONI:	80
FIGURA 39 ACQUISIZIONI DI AFM AL TEMPO T=48 H DEI CAMPIONI:	82
FIGURA 40 NELL'IMMAGINE VIENE MOSTRATO IL CONTATTO TRA PHE4 ARG5 HIS6 E IL POLIETILENE; IN PARTICOLARE SI VUOLE FAR NOTARE COME L'ANELLO DELLA FENILALANINA SI INTERCALA TRA LE CATENE DEL POLIMERO.	83
FIGURA 41 LE PROTEINE IN SOLUZIONE VENGONO ATTRATTE DALLA NANOPLASTICA RIMANENDO ADESE ALLA SUPERFICIE PER TUTTA LA DURATA DELLA SIMULAZIONE.....	84
FIGURA 42 SISTEMA INIZIALE DEL POLISTIRENE IN PRESENZA DELLA FIBRILLA COSTRUITA SU BASE DELL'OLIGOMERO 5OQV	85

INDICE DELLE TABELLE

TABELLA 1 NELLA TABELLA SONO PRESENTI LE DIVERSE COMPOSIZIONI DELLE SOLUZIONI USATE PER LA CARATTERIZZAZIONE <i>IN VITRO</i>	50
TABELLA 2 ELEMENTI DELLE DIVERSE SIMULAZIONI ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.	
TABELLA 3 VALORI MINIMI E MASSIMI DI RMSD OSSERVATI NEI DIVERSI SISTEMI	64
TABELLA 4 MEDIA DEI CONTATTI PER CIASCUNA NANOPLASTICA.....	71
TABELLA 5 REGIONI E RELATIVI RESIDUI CHE HANNO DETERMINATO IL MAGGIOR NUMERO DI CONTATTI.	72

Sommario

Microplastiche (MP) e nanoplastiche (NP), termini ormai comuni nei mezzi di comunicazione, indicano particelle derivanti da oggetti di uso quotidiano prodotti con materiali plastici, come bottiglie e capi d'abbigliamento sintetici (es. pile), i quali, degradandosi, rilasciano nell'ambiente frammenti di diverse dimensioni. Precisamente, si fa riferimento alle microplastiche per indicare i frammenti di dimensione compresa tra 0,1 e 5000 μm e alle nanoplastiche quando i frammenti rientrano nel range da 1 a 100 nm.

Una volta disperse nell'ambiente, le particelle plastiche vengono ingerite dagli animali e assorbite dai vegetali entrando nella catena alimentare. Risulta importante quindi, indagare quali possano essere i meccanismi di interazione tra micro e nanoplastiche all'interno degli organismi biologici.

Obiettivo della tesi

Molti studi in letteratura hanno analizzato le interazioni tra micro e nanoparticelle di plastica e le macromolecole quali lipidi e proteine. Per quanto riguarda le prime, in vari casi si è osservato come possano interagire con le membrane plasmatiche variandone la permeabilità e quindi selettività. Nel caso invece delle interazioni plastica-proteine, i vari studi hanno analizzato la formazione delle corone proteiche, osservando come le proteine avessero una predisposizione maggiore per l'aggregazione in presenza della plastica stessa.

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo lo studio, sia con approccio computazionale che sperimentale *in vitro*, delle interazioni che si instaurano tra diverse nanoparticelle di plastica e le proteine responsabili dell'Alzheimer. L'analisi è finalizzata alla comprensione del ruolo delle nanoplastiche nei processi di aggregazione dei peptidi amiloidi. Quest'ultimo rappresenta lo step iniziale nella formazione degli oligomeri, fisiologicamente tossici, che successivamente costituiscono le fibrille amiloidi.

Le analisi *in silico* sono state effettuate su sistemi costituiti da una particella di nanoplastica delle dimensioni di circa 5 nm in presenza di peptidi amiloidogenici.

Per quanto riguarda i tipi di nanoplastiche si è considerato il polietilene (PE), il polistirene (PS), il polietilene tereftalato (PET) ed il polipropilene (PP). Per quanto riguarda le proteine amiloidogeniche si è considerato il singolo peptide A β 1-42, sia nella sua interezza, sia come frammenti di diversa lunghezza (A β 16-20, e A β 25-42). In aggiunta ai singoli peptidi, sono state studiate forme pre-aggregate in oligomeri composti da 5 peptidi. Infine, le diverse forme del peptide A β 1-42 state analizzate nel fenotipo wild type e nella forma mutata A2V.

Materiali e Metodi

Le interazioni molecolari e macromolecolari ed i processi biofisici sono studiati con diverse tecniche in funzione del livello di dettaglio desiderato.

Tutte le simulazioni presentate in questo studio sono state eseguite con il software di modellazione molecolare NAMD e visualizzate con VMD.

Le plastiche sono state create attraverso repliche dello stesso monomero, realizzato con l'editor Avogadro, e tramite simulazioni in vuoto sono state compresse sino ad ottenere una sfera da 5 nm di diametro. Per le proteine con strutture già note in letteratura, si è utilizzato il Protein Data Bank (PDB), dal quale si è potuto scaricare il relativo file in formato .pdb, mentre gli oligomeri sono stati costruiti con il software Pymol. Per le diverse nanoparticelle, si è scelto di partire da numero diverso di catene a seconda della plastica scelta per ottenere polimeri di circa 7000 atomi. In particolare, il polietilene (PE) è stato realizzato a partire da 16 catene C₇₂H₁₄₆, per il polipropilene (PP) 36 catene C₈₈H₁₇₈, per il polistirene (PS) 16 catene C₂₁₆H₁₆₅, e per il polietilene tereftalato (PET) 25 catene C₁₀H₈O₄.

Le simulazioni sono state fatte in condizioni al contorno periodiche e mantenendo costanti temperatura e pressione, precisamente ad una temperatura di 300 K e una pressione di 1 bar. Una volta prodotta la nanoplastica si verificata la sua stabilità in vuoto con una simulazione da 100 ps. Da questa è stato selezionato l'ultimo frame e usato come punto di partenza di ogni altra simulazione. I peptidi A β 1-42, A β 16-20, A β 25-42 e la versione modificata A2V,

sono stati implementati con Pymol. Infine, la fibrilla 5OQV è stata selezionata e scaricata dal PDB, dopo aver fatto una ricerca che prendeva in considerazione tutte le fibrille amiloidi presenti in letteratura. È stata selezionata la 5OQV in virtù del fatto che presenta una struttura maggiormente caratterizzata. Anche della fibrilla è stata studiata la versione che presentava la modifica A2V.

La durata delle simulazioni è variabile, con un tempo che va da pochi ns per le simulazioni più brevi a centinaia di ns per quelle più lunghe. Ogni nanoplastica è stata fatta interagire con tutte le diverse proteine e, per avere una migliore attendibilità, ogni sistema è stato ripetuto 5 volte. Per poter osservare un'eventuale differenza nel comportamento della proteina, sono state effettuate prove della sola proteina e della proteina in presenza della nanoplastica, in entrambi i casi in ambiente solvatato e ionizzato.

Per la caratterizzazione *in vitro*, svolta in parallelo a quella *in silico*, sono stati realizzati i peptidi A β 25-42 tramite il protocollo di sintesi peptidica standard. Successivamente sono state svolte analisi con il dicroismo circolare, con lo spettrofotometro e con l'AFM per studiare l'evoluzione della struttura secondaria della proteina in presenza di nanoparticelle di PS con dimensioni e carica diversa.

Risultati

Nel presente lavoro di ricerca, sono stati ottenuti interessanti risultati sull'interazione delle proteine β amiloidi con diversi tipi di nanoplastiche.

Dall'analisi *in silico* è stato possibile stabilire che tra polistirene, polietilene tereftalato, polipropilene e polietilene, quest'ultima sia la nanoplastica che, instaurando il più alto numero di contatti/ns, determina una maggiore interazione con le componenti proteiche. Per il polistirene il discorso è analogo seppur presentando valori di Root-Mean-Square Deviation (RMSD) e numero di contatti leggermente inferiori. Per il polietilene tereftalato e il polipropilene si può affermare che entrambe hanno avuto un numero ancora inferiore di contatti, garantendo una maggiore stabilità nelle proteine durante l'analisi.

Inoltre, la struttura secondaria di tutte le proteine in versione oligomerica si è mantenuta costante per tutta la durata della simulazione ed è stato possibile identificare tre zone di contatto, costituite circa da 4/5 aminoacidi ciascuna.

Individuando gli amminoacidi di adesione tra nanoplastica e proteina è stato possibile definire il legame instaurato tra queste come interazione idrofobica.

Per quanto concerne le analisi *in vitro*, si può affermare che il polistirene interagisce in maniera diversa con il peptide A β 25-42 in funzione di carica e dimensione. Si è visto infatti che a dimensioni inferiori, le nanoplastiche hanno dato dei valori più bassi in fluorescenza, indicando così una minore componente di aggregati proteici in forma amiloidogena, se paragonati con quelli ottenuti con stesse in versione più grande. Inoltre, a parità di dimensione, le nanoplastiche neutre hanno dato dei segnali maggiori rispetto a quelle cariche. Infine, le nanoparticelle cariche positivamente generano dei valori più intensi rispetto a quelle negative di uguale grandezza.

Un ultimo risultato di rilievo è stato ottenuto grazie all'utilizzo della microscopia a forza atomica. Infatti, si è riscontrata una differenza tra i campioni che avevano in soluzione nanoplastiche e quelli dove invece non erano presenti. In particolare, si è notato come le nanoparticelle con il passare delle ore, fossero in grado in tutti i casi di rimuovere dalla superficie del substrato, il tappeto di fibre che al tempo zero era presente. Questo ha fatto sorgere due ipotesi relative al fatto che le nanoplastiche potessero essere in grado di adsorbire nella loro superficie le fibrille rimuovendole dalla soluzione, oppure, fossero capaci di sfaldarle riportandole quindi allo stadio precedente: quello oligomerico tossico.

Conclusioni

In conclusione, si può affermare che le nanoplastiche presenti nell'ecosistema sono in grado, entrando all'interno degli organismi viventi, di interagire e modificare l'ambiente cellulare.

Come si è osservato in questo lavoro di tesi, tutte le nanoplastiche, anche se in maniera differente, sono in grado di influenzare le proteine studiate alterandone

quindi la conformazione tridimensionale. Essendo le nanoplastiche non selettive, è ancora difficile prevedere e comprendere quali possano essere i peggiori danni che sono in grado di provocare. Il nostro studio si è concentrato sulla proteina principale responsabile dell'Alzheimer riscontrando che sicuramente è influenzabile dalle nanoparticelle.

Attualmente stiamo portando avanti delle simulazioni che hanno l'obiettivo di comprendere se le nanoplastiche sono in grado di influenzare le fibrille amiloidi già formate, e nel caso, di sfaldarle riportandole allo stadio oligomero.

Studi futuri possono focalizzarsi sulle interazioni prima tra nanoplastiche e neuroni, per poi passare a modelli animali della malattia di Alzheimer, e verificare come queste possano effettivamente essere correlate a malattie amiloidi, quali Alzheimer.

Abstract

Microplastics (MP) and nanoplastics (NP) are terms that now we can find in any media, which indicate small particles coming from daily plastic object such as, bottles and cloths made with synthetic fabrics (e.g. pile), that due to degradation, release into the environment fragments of different sizes. In particular, microplastic indicate bits between 0.1 and 5000mm, and nanoplastics when the fragments fall within the range of 1 to 100 nm.

Once dispersed in the environment, plastic particles are ingested by animals and absorbed by plants entering the food chain. It is therefore important to investigate the mechanisms of interaction between micro and nanoplastics within biological organisms.

Aim of the work

Many studies in the literature have analyzed the interactions between micro and nanoparticles of plastic and macromolecules such as lipids and proteins. As regards the first, in several cases it has been observed how they can interact with plasma membranes varying the permeability and therefore selectivity. In the case of plastic-protein interactions, the various studies analyzed the formation of protein corona, observing how proteins had a greater predisposition for aggregation when the plastic particles were present.

Silico analyses were carried out in systems consisting 5 nm nanoplastic particles in the presence of amyloidogenic peptides. Polyethylene (PE), polystyrene (PS), polyethylene terephthalate (PET) and polypropylene (PP) were the types of nanoplastics considered. For amyloidogenic proteins, the single peptide A β 1-42 was studied, both in its full length and as fragments of different dimensions (A β 16-20, and A β 25-42). In addition to individual peptides, pre-aggregate forms have been studied in oligomers composed of 5 peptides. Finally, the different forms of the peptide A β 1-42 were analyzed in the wild type phenotype and in the mutated form A2V.

Materials and Methods

Molecular and macromolecular interactions and biophysical processes are studied with different techniques according to the desired detail's level.

All simulations presented in this study were performed with the molecular modeling software NAMD and displayed with VMD.

The plastics were created through repetitions of the same monomer, made with the editor Avogadro, and through simulations in vacuum were compressed to obtain the desired a sphere of 5 nm in diameter. Protein Data Bank (PDB) was used for the search for beta amyloid proteins whose structures are known in the literature, from which it was possible to download the relevant file in .pdb format, while oligomers were built with Pymol software. For the different nanoparticles, it was chosen to start from a different number of chains depending on the plastic selected, but always getting a system composed of about 7000 atoms. In particular, the polyethylene (PE) was made from 16 C₇₂H₁₄₆ chains, for the polypropylene (PP) 36 C₈₈H₁₇₈ chains, for the polystyrene (PS) 16 C₂₁₆H₁₆₅ chains, and for the polypropylene terephthalate (PET) 25 C₁₀H₈O₄ chains.

The duration of the simulations is variable, with a length ranging from a few ns for the shorter simulations to hundreds of ns for the longer ones. Each nanoplastic has been made to interact with all the different proteins, and to get a better reliability, each system has been replicated 5 times. In order to observe possible difference in protein behavior, tests were carried out both in presence and absence of nanoplastics, and in a solvated and ionized environment.

For the *in vitro* characterization, carried out in parallel with the *in silico* one, A β 25-42 peptides have been realized through the standard protocol of peptide synthesis. Subsequently, analyses were carried out with circular dichroism, spectrophotometer and AFM to study the evolution of the secondary structure of the protein in the presence of nanoparticles of PS with different size and charge.

Results

In this work, interesting results have been obtained on the interaction of β amyloid proteins with different types of nanoplastics.

From the *in silico* analysis it has been possible to establish that, between polystyrene, polyethylene terephthalate, polypropylene and polyethylene, the last nanoplastic is the one that establishing the highest number of contacts/ns, determining the greatest interaction with the protein components. Polystyrene has a similar behavior, even though it has slightly lower number of contacts and RMSD values. For polyethylene terephthalate and polypropylene, both had an even lower number of contacts, ensuring greater stability in proteins during the analysis.

In addition, the secondary structure of all the proteins in the oligomeric version, remained constant throughout the simulation and it has been possible to identify three contact zones, consisting of about 4/5 amino acids each.

By identifying the amino acids of adhesion between nanoplastic and protein it has been possible to define the bond established between these as hydrophobic interactions.

As regards *in vitro* analyses, it has been observed that polystyrene interacts differently with the peptide A β 25-42 as a function of charge and size. In fact, it has been seen that at smaller sizes, nanoplastics have given lower values in fluorescence, when compared with those obtained with the same in the larger version. In addition, neutral nanoplastics have given higher signals than charged nanoplastics with same size. Finally, positively charged nanoparticles generate more intense values than negative ones of equal size.

A final important result was obtained thanks to the use of the Atomic Force Microscopy. In fact, there was a difference between the samples that had nanoplastic in solution and those where there were not. It was noted that nanoparticles, as the hours passed, were able in all cases to remove from the surface of the substrate, the layer of fibers that at zero time was present.

This gave rise to two hypotheses about the fact that nanoplastics could be able to adsorb fibrils in their surface by removing them from the solution or were able to flake them back then to the previous stage: the toxic oligomeric one.

Conclusion

In conclusion, it can be said that the nanoplastics present in the ecosystem are able, entering within living organisms, to interact and modify the cellular environment.

As has been observed in this thesis work that all the nanoplastics analyzed, even if in a different way, are able to influence the proteins, thus altering their function. As nanoplastics are non-selective, it is still difficult to predict and understand what is the worst damage they can cause. Our study focused on the main protein responsible for Alzheimer and found that it is susceptible to nanoparticles

Currently we are carrying out simulations that have the aim to understand if the nanoplastics can influence the amyloid fibrils already formed, and in the case, to bring them back to the oligomeric stage.

Further studies may first focus on the interactions between nanoplastics and neurons, then move on to animal models, and finally verify how nanoplastics can be related to amyloid diseases, such as Alzheimer's and tauopathies.

Capitolo 1

Introduzione

1.1.1. Inquinamento

Oggi giorno, la notevole quantità di micro e nano plastiche disperse nell'ambiente sta diventando un problema sempre più allarmante agli occhi degli esperti. Con una stima della produzione globale di plastica, aumentata di oltre 500 volte negli ultimi 60 anni (1), si riscontrano concentrazioni sempre maggiori di frammenti plastici nei mari ma anche nell'aria, nei cibi e bevande (2). Si calcola che, nei prossimi trent'anni, più di 30 miliardi di tonnellate di plastica verranno prodotte e non del tutto smaltite sul nostro pianeta (3). Questi rifiuti sono in grado di viaggiare per lunghissime distanze, andando a raggiungere anche gli angoli più remoti del globo. Come infatti analizza lo studio diretto dal gruppo di ricerca del Dottor Eriksen, le quantità di plastica presente negli oceanici è paragonabile tra l'emisfero nord e quello sud, nonostante ci siano notevoli differenze in termini di produzione (4).

Anche l'attuale condizione di crisi causata dal virus SARS-CoV-2, sta influenzando negativamente la situazione relativa all'inquinamento da plastica. Si stima che il consumo di oggetti monouso di plastica sia aumentato vertiginosamente in tutto il mondo. In Catalonia e in Cina per esempio, i rifiuti plastici nel settore medico sono cresciuti rispettivamente del 350% e del 370% (5). Numerose mascherine realizzate in svariate plastiche come il PP, il PS e il PE, sono state trovate nelle spiagge, nei boschi e nelle strade di tutto il mondo, diventando così un possibile punto di inizio di un "focolaio di micro e nanoplastiche", come è mostrato in Figura 1.



Figura 1 Mascherine raccolte in una spiaggia durante l'emergenza da Covid-19;

I rischi rappresentati da micro e nanoplastiche per gli organismi viventi sollevano ancora controversie, ed essendo disperse nell'ambiente con dimensioni eterogenee è difficile avere un monitoraggio standard con risultati altamente precisi (6). L'elevata varietà in termini di forma e dimensione delle particelle plastiche, aumenta fortemente la difficoltà nella comprensione e analisi della loro effettiva tossicità. In aggiunta, essendo le micro e nanoplastiche presenti in tutti i diversi ecosistemi, esse possano interagire con un altissimo numero di organismi appartenenti a diverse specie, e causare così spesso problemi differenti (7).

Nonostante questa grande varietà, risulta esserci assenso in una maggiore preoccupazione per particelle alla scala nanometrica, che essendo circa due ordini di grandezza inferiori delle cellule eucariote, potrebbero intaccare i sistemi biologici a livello subcellulare, o anche a livello molecolare. Ad oggi, però, si riscontra una mancanza, determinata dalla difficoltà tecniche d'indagine, dai numerosi parametri che entrano in gioco e dalla non totale accuratezza dei dati.

1.1.2. Nanoplastiche

Indagando su quali siano i polimeri i cui frammenti sono maggiormente rinvenuti nelle acque oceaniche si riscontra che questi siano il polietilene (PE), polipropilene (PP) e polistirene (PS), i quali, essendo meno densi dell'acqua di

mare, risultano essere galleggianti e disponibili per le specie planctoniche. In questo modo, le nanoparticelle plastiche vengono introdotte nella catena alimentare (8). Oltre alle specie planctoniche, numerosi studi hanno verificato che anche altri organismi entrano in contatto con queste particelle come alghe e pesci (9), e tanti altri avevano come obiettivo lo studio dei loro effetti (10).

Un altro aspetto critico è il fatto che le nanoplastiche sono dei vettori, in quanto possono adsorbire sulla loro superficie molecole organiche, inorganiche, virus e altri microorganismi. Questo causa un'accelerazione della loro diffusione nell'ambiente circostante (11). Inoltre, la presenza di particelle di plastica nell'ambiente può anche portare ad un aumento di scambi genici tra organismi diversi con la conseguente possibilità di sviluppare una maggiore antibiotico-resistenza da parte dei batteri. Un recente studio del 2018 di Arias-Andres et al. ha dimostrato proprio che in stesse condizioni ambientali, e considerando lo stesso batterio (*E. coli*), quando quest'ultimo si trova in un habitat contenente microplastica, ha una maggiore frequenza di trasferimento del proprio plasmide all'interno della sua colonia, rispetto ad un altro che vive in un ambiente plastic-free (12).

Un'ulteriore problematica relativa alla superficie delle nanoplastiche è data dalla carica. Infatti, a seconda della carica superficiale, sia essa positiva o negativa, la potenziale tossicità della particella cambia generando effetti diversi. Anche se non ci sono ancora abbondanti studi specifici, e tutti analizzano solo il PS, quelle che sembrano causare più problemi sono le nanoplastiche positive (13). Banerjee et al. nel loro studio hanno concluso che le nanoplastiche più piccole di dimensioni e aventi una carica positiva sono le più tossiche in quanto sono in grado di generare specie reattive dell'ossigeno (ROS), e interagire più intensamente con i fosfolipidi della membrana plasmatica, modificando la tensione superficiale (14).

1.1.3. Nanoplastiche e sistemi biologici

Come precedentemente è stato introdotto, le nanoplastiche sono in grado di raggiungere tutti i diversi ambienti, entrando così in contatto con un vastissimo

numero di organismi viventi, i quali sono in grado di interagire in maniera differente con le nanoplastiche.

Un esempio interessante è dato dallo studio di alimentazione di Amanda L. Dawson et al., nel quale viene osservato che il krill antartico (*Euphausia superba*, componente primaria dell'ecosistema antartico) è in grado di frammentare microparticelle di polietilene riducendone quindi l'ordine di grandezza. Quello che è stato osservato è che i frammenti triturati aventi minori dimensioni erano più persistenti e trattenuti più a lungo nel corpo del krill (15).

Un altro animale, questa volta facente parte anche della dieta umana, su cui è stata prestata particolare attenzione, sono le cozze, bivalvi con capacità di filtrare l'acqua marina, al cui interno sono stati trovati frammenti di plastiche; cozze processate (congelate/cotte) in alcuni casi si sono rivelate perfino più contaminate di quelle non processate. Pertanto, non si può escludere che anche i metodi di trasformazione degli alimenti possano contribuire alla contaminazione dei cibi. (16)

Una delle ipotesi preoccupanti è data dalla possibile interazione che micro e nanoplastiche possano instaurare con la membrana plasmatica compromettendo le barriere fisiologiche degli organismi (17). Il risultato a valle di tale fenomeno consiste in una perturbazione del meccanismo tra recettori di membrana e segnale chimico con, infine, un'alterazione dell'espressione genica nel nucleo.

Questa ipotesi viene in parte confermata da Zhiquan Liu et al. che affermano, in seguito ad esperimenti su tre generazioni di *Daphnia pulex*, che l'espressione genica di determinati geni di interesse, era stata significativamente ridotta da un'alta concentrazione (1 e 2 mg / L) di nanoparticelle di polistirene da 75 nm. Il risultato è comunque da ritenersi relativo ad una concentrazione artificiale che non rispecchia la condizione reale dei mari (18). Come mostrato in Figura 2.

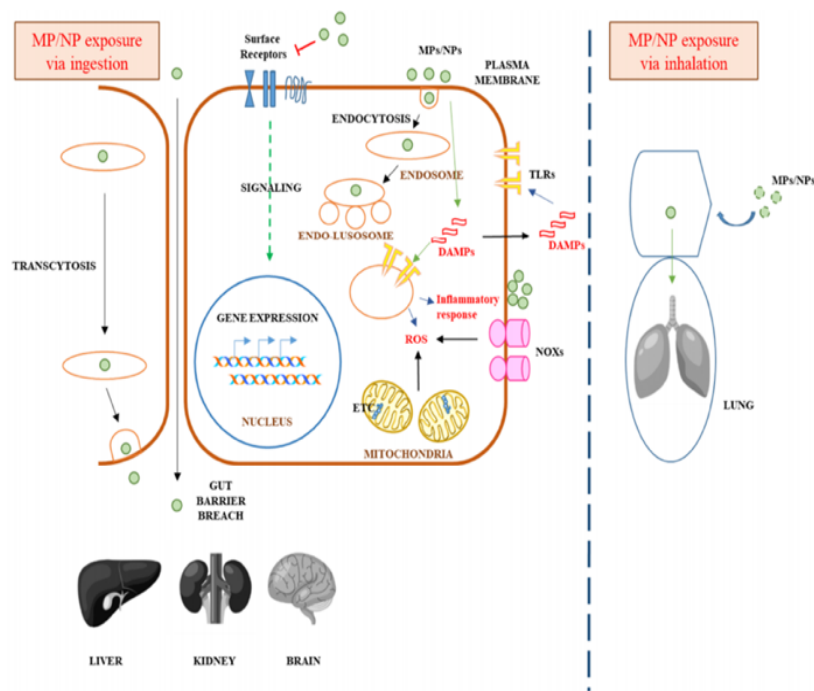


Figura 2 Diagramma schematico che illustra i potenziali (al momento speculativi) meccanismi cellulari di tossicità MP / NP.

A supporto di questa ipotesi, il lavoro di dinamica computazionale condotta dal Dr. Oldamur Hollóczy vede una nanoparticella di polietilene globulare con un diametro di 5nm, situata all'interno di un doppio strato POPC¹ come oggetto transmembrana (19). La nanoplastica esaminata ha un effetto significativo sulla membrana: i cambiamenti nello spessore e della fluidità indicano che la diffusione di molecole attraverso la superficie potrebbe essere significativamente alterata dalla presenza del polietilene. In particolare, viene riportato che per piccole concentrazioni della macromolecola in questione, si può prevedere la disintegrazione del polimero nelle singole catene polimeriche in modo tale che la plastica possa essere completamente decomposta; diversamente, in

¹ POPC indica una fosfatidilcolina, un importante fosfolipide utilizzato in esperimenti biofisici per studiare varie materie come le zattere lipidiche. Inoltre, POPC è anche usato in sistemi che imitano la membrana cellulare.

concentrazioni più elevate le alterazioni nelle funzioni della membrana possono determinare la morte cellulare.

1.2 Morbo di Alzheimer

Dalla metà del XIX secolo ad oggi, nei paesi industrializzati si osserva che l'aspettativa di vita media umana è circa raddoppiata (20). Questo fenomeno sta portando ad un continuo incremento della popolazione anziana e, necessariamente, delle patologie ad essa annesse, in particolare quelle relative al sistema nervoso. Tra queste, maggiore attenzione si è posta alle demenze, ed in particolare, alla Malattia di Alzheimer (AD) la quale rappresenta da sola il 50-60% di tutte le forme diagnosticate (21). L'Alzheimer è stata descritta per la prima volta nel 1906 dallo psichiatra e neuropatologo tedesco Alois Alzheimer, a seguito dell'autopsia di una sua paziente che seguiva già da 5 anni, la quale presentava un encefalo uniformemente atrofico e con alterazioni delle fibrille nervose. Ancora oggi, dopo più di 100 anni di storia, la maggior parte degli scienziati ritiene che le cause siano numerose: mentre il 5% circa dei casi pare sia di origine genetica, il restante 95% è di natura sporadica.

1.2.1. Eziopatogenesi

A livello clinico essa si presenta con una progressiva degenerazione dei neuroni, che porta in tempi diversi, ad una ridotta autonomia nella vita quotidiana. È noto inoltre, che porta ad un accumulo di placche e fibrille a livello nervoso, e attualmente molti studi stanno investigando sui meccanismi che causano la formazione di queste ultime (22). La degenerazione neuronale che si riscontra nella demenza di Alzheimer avviene anche fisiologicamente senza sfociare nello stato patologico, ma nel primo caso l'atrofia risulta più marcata e si diffonde più rapidamente (23). I ricercatori hanno prospettato che alcune persone possono avere maggiori probabilità di contrarre la malattia, tuttavia non si può far risalire l'insorgenza della patologia ad un'unica causa ma ad un insieme di fattori.

1) Ruolo delle fibrille amiloidi

Uno dei meccanismi più accreditati è relativo all'aggregazione fibrillare di β -amiloidi, supportata dall'osservazione in sede autoptica di placche contenenti tale molecola a livello cerebrale di pazienti con AD. La maggior componente di queste placche è derivante dalla produzione e dal successivo accumulo della proteina β -amiloide $A\beta$ (24). La $A\beta$, che oltre nel cervello può anche essere trovata nel plasma, ha origine dalla proteina Amyloid Precursor Protein (APP), una proteina neuronale transmembrana presente in numerose isoforme. L'APP è espressa nel sistema nervoso centrale (SNC) e trova ruolo in meccanismi recettoriali, di adesione alla matrice extracellulare e di modulazione dell'espressione genica. Inoltre, le molecole di APP secrete partecipano alla formazione delle sinapsi e probabilmente intervengono nel processo mnemonico.

L'Amyloid Precursor Protein è caratterizzata da una porzione N-terminale che si affaccia nello spazio extra-cellulare e una porzione C-terminale che costituisce il dominio intracitoplasmatico della proteina. In quest'ultimo presenta una sequenza amminoacidica denominata $A\beta$, a livello della quale agiscono i tre principali enzimi coinvolti nel metabolismo dell'APP: α -secretasi, β -secretasi e γ -secretasi. È proprio in relazione all'attività di questi enzimi che l'APP può seguire diversi meccanismi di processazione, come mostrato in Figura 3.

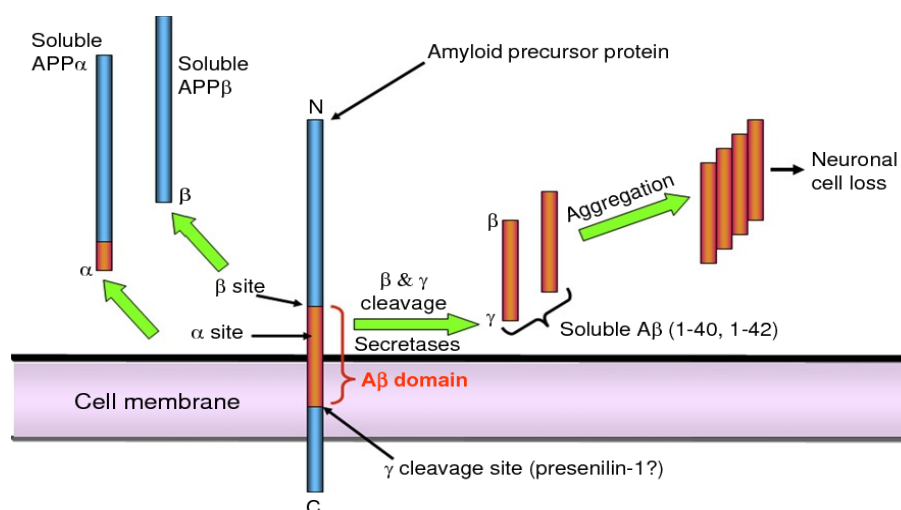


Figura 3 Schema esemplificativo della via non amiloidogena (sinistra) e della via amiloidogena (destra) dovute alle diverse interazioni tra α -secretasi, β -secretasi e γ -secretasi e la proteina APP.

La via non amiloidogenica prevede la processazione da parte dell' α -secretasi, che effettua un taglio proteolitico all'altezza del residuo 16 della sequenza $A\beta$. Viene data così origine a un frammento solubile N-terminale di 83 amminoacidi, chiamato Soluble APP α (sAPP α), che viene rilasciato in circolo, e ad un altro frammento di 83 amminoacidi, a livello dell'estremità C-terminale. Quest'ultimo invece, rimane attaccato alla membrana cellulare dove, in seguito, andrà incontro ad un ulteriore taglio da parte della γ -secretasi. La β -secretasi effettua il clivaggio a livello dell'estremità N-terminale della sequenza $A\beta$, rilasciando nello spazio extracellulare un frammento solubile, detto soluble APP β (sAPP β).

È proprio in seguito a quest'ultimo tipo di processo proteolitico che si apre la via amiloidogenica, determinata dall'azione della β -secretasi e successivamente della γ -secretasi, con rilascio del peptide $A\beta$. In seguito all'azione della β -secretasi rimane un frammento C-terminale di 99 residui attaccato alla membrana cellulare che viene tagliato dalla γ -secretasi a livello del residuo 40 o 42 determinando il rilascio di frammenti amiloidogenici, rispettivamente chiamati $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$, nello spazio extracellulare. L' $A\beta_{40}$ rappresenta la forma maggiormente prodotta, mentre l' $A\beta_{42}$ è la principale componente delle placche senili ed è caratterizzata da un elevato potenziale fibrillogenico e neurotossico (25). I frammenti di $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$ si aggregano spontaneamente a formare una struttura a foglietti β tossica per i neuroni e per le sinapsi, sia nella sua forma precoce, monomeric, dimerica o oligomeric, sia come deposito in aggregati, le placche senili. Nell'individuo con morbo di Alzheimer si instaura una condizione di disequilibrio tra la via non amiloidogenica e amiloidogenica, con prevalenza di quest'ultima che determina una maggior produzione di $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$ e un conseguente accumulo che l'organismo non riesce a metabolizzare.

Tre considerazioni non supporterebbero l'esclusività dell'ipotesi amiloidea:

1. L' $A\beta$ è normalmente presente a livello cerebrale e la concentrazione di $A\beta$ solubile è maggiore nel cervello dei giovani che degli anziani non dementi (26);
2. Il 20-30% dei soggetti sani dal punto di vista cognitivo presentano un significativo numero di placche di amiloide riscontrate pre o post-mortem facendo supporre che la deposizione delle placche sia in realtà

un fenomeno parafisiologico e che i fattori decisivi possano essere la sede di deposizione, e l'interazione con altri cofattori (27) (28).

3. Gli individui con mutazioni completamente penetranti sia di APP che della γ -secretasi non sviluppano la demenza fino a 30-40 anni di età, suggerendo quindi che l'effetto tossico sia da ricondurre all'accumulo e deposizione dell'amiloide a livello cerebrale, accompagnato da altri fattori [22]. Gli individui con mutazioni completamente penetranti sia di APP che della γ -secretasi non sviluppano la demenza fino a 30-40 anni di età, suggerendo quindi che l'effetto tossico sia da ricondurre all'accumulo e deposizione dell'amiloide a livello cerebrale, accompagnato da altri fattori (29)

Sempre più evidenze indicano che il peptide $A\beta$ agisce da iniziatore nelle fasi iniziali della malattia e sembra essere necessario ma non sufficiente nella fase tardiva della AD (30);

2) Ruolo della proteina tau

Considerando ancora una volta l'osservazione in sede autoptica di placche nei pazienti con Morbo di Alzheimer si riscontra il contenuto di proteina Tau, costituendo un probabile coinvolgimento di questa proteina nell'eziopatogenesi della malattia. La Tau è una proteina maggiormente espressa nei neuroni la cui funzione è associata alla stabilità dei microtubuli, struttura portante del citoscheletro. È espressa in 6 diverse isoforme generate da meccanismi di splicing alternativo del mRNA e la disfunzione, dovuta all'iperfosforilazione e mediata dall'attivazione di proteinchinasi, è determinante nell'AD (31). Questa alterazione della proteina Tau non garantisce più l'assemblaggio dei microtubuli causandone la depolimerizzazione (Figura 4), quindi alterazioni nel trasporto assonale e della plasticità neuronale; inoltre, la fosforilazione determina una propensione per la formazione dei grovigli neurofibrillari compromettendo il neurone e la sua funzione (32). I grovigli neurofibrillari non sono, però, specifici per l'AD, essendo identificati in altre patologie neurodegenerative, definite con il termine generico di "Taupatie".

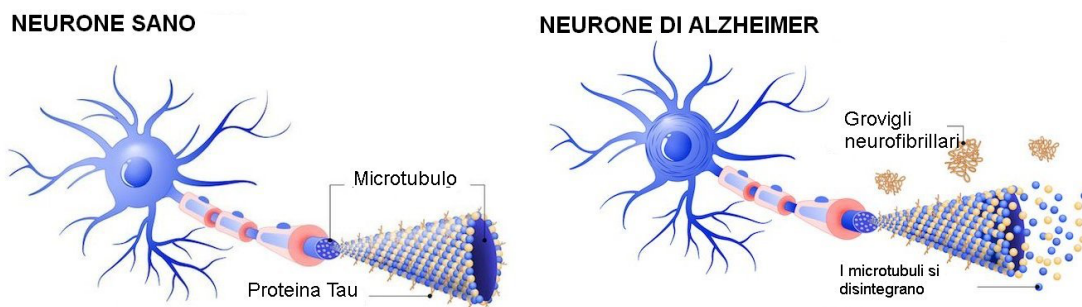


Figura 4 A sinistra i microtubuli sono stabilizzati dalla presenza della proteina Tau; A destra, in seguito a fosforilazione della proteina Tau, il microtubulo depolimerizza e si ha la formazione dei grovigli neurofibrillari.

3) Ruolo dell'infiammazione

La reazione infiammatoria che caratterizza la maggior parte dei disordini neurodegenerativi viene chiamata neuroinfiammazione. La microglia attivata e gli astrociti sono principali cellule che prendono parte a questa risposta nell'AD. La risposta infiammatoria cronicizzata dalla presenza delle placche di A β è individuabile attraverso metodiche di diagnostica per immagini e svolge un ruolo dannoso contribuendo alla progressione della malattia. Numerose evidenze hanno dimostrato che la microglia gioca un ruolo centrale fin dai primi stadi della patologia (33). Inoltre, nei pazienti affetti da AD e nei pazienti nelle fasi precliniche della patologia è stata dimostrata un'alterazione, sia a livello centrale che periferico, dell'espressione del TREM2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2), che ha un ruolo peculiare nell'attivazione della microglia (34). La dimostrazione di un'attivazione di processi infiammatori negli stadi precoci di malattia supporterebbe l'ipotesi dell'infiammazione come "primum movens".

Come mostrato in figura 5, si crea un processo in cui le placche di A β inducono la proliferazione degli astrociti e cellule gliali, i quali parteciperebbero alla degradazione di A β formando una barriera protettiva tra i depositi di A β e i neuroni. Ma, i neuroni stessi, reagendo agli stimoli tossici, contribuiscono al mantenimento della risposta infiammatoria.

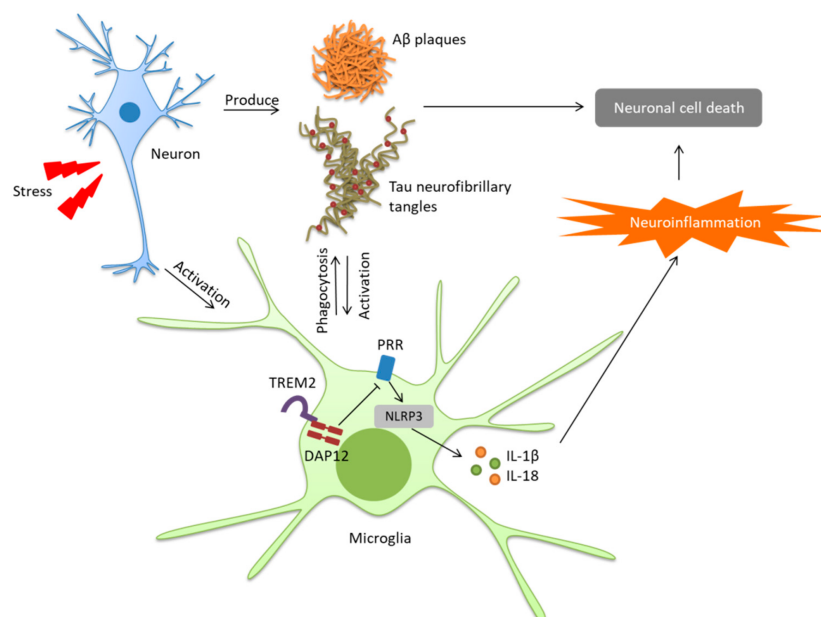


Figura 5 nell'immagine viene mostrato come l'attivazione della microglia determina, insieme alle fibrille di $\alpha\beta$ e i grovigli neurofibrillari, l'apoptosi del neurone.

4) Ruolo dello stress ossidativo

In condizioni fisiologiche, i mitocondri sono in grado di produrre antiossidanti che neutralizzano gli effetti nocivi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). La mancata regolazione tra la quantità di radicali liberi e non liberi prodotti, causata dalla sovrapproduzione mitocondriale di ossidanti rispetto alla produzione di antiossidanti, determina lo stato di stress ossidativo (35)

Lo sviluppo di stress ossidativo nell'AD è stato correlato ad una disfunzione mitocondriale, che porta alla sovrapproduzione di ROS e specie reattive dell'azoto (RNS) e che comporta un danno sinaptico.

Anche se il ruolo dello stress ossidativo nelle malattie neurodegenerative non è del tutto chiaro, diversi studi hanno dimostrato alterazioni nei marcatori ossidativi nell'ippocampo e nella corteccia parietale inferiore, le regioni principalmente compromesse nell'AD (36)

5) Ruolo del microbiota intestinale

Nonostante la malattia di Alzheimer è convenzionalmente considerata un disturbo del Sistema Nervoso Centrale, crescenti evidenze sperimentali, epidemiologiche e cliniche suggeriscono che alcuni segnali si possano estendere oltre il cervello. Negli ultimi anni si è fatta attenzione al fatto che il microbiota intestinale ha un profondo impatto sulla formazione della barriera emato-encefalica, sulla mielinizzazione, sulla neurogenesi e sulla maturazione della microglia (37). Test su animali esposti a infezioni microbiche patogene, antibiotici, probiotici o trapianto di microbiota fecale hanno mostrato che il microbiota intestinale modula molti aspetti comportamentali degli animali, suggerendo un suo ruolo nella cognizione e nella patogenesi dell'AD (38).

6) Il potenziale ruolo delle nanoplastiche?

Dopo aver analizzato i fattori più accreditati che contribuiscono allo sviluppo della malattia di Alzheimer, l'attenzione adesso viene rivolta a quale possa essere il ruolo delle nanoplastiche in relazione a ciascun fattore, in quanto, recenti studi hanno mostrato come particelle di plastica possano produrre cambiamenti a livello fisiologico (39), generando immunotossicità e apoptosi (40). Attraverso la microscopia iperspettrale è stato possibile rilevare il polistirene nel tessuto cerebrale dei pesci dimostrando quindi, che le nanoparticelle di plastica possono essere trasportate attraverso la barriera emato-encefalica. (41).

Nel 2020 il gruppo di ricerca danese condotto da Brosbøl et al. ha osservato, in campione di oltre 70000 operai, che l'esposizione prolungata allo stirene, determina una maggiore propensione di sviluppare demenza, in particolare Alzheimer e Parkinson, rispetto alla media (42).

In relazione al ruolo dello stress ossidativo precedentemente introdotto, nel recente studio di Liu et al. del 2020, si è rivelato come l'esposizione prolungata di polistirene a basse concentrazioni possa indurre un l'aumento della produzione di ROS, mentre ad alte concentrazioni possono portare alla

fosforilazione di proteine, quali la ERK² e NFkBp65³ (43), e che la fosforilazione delle suddette proteine è sempre presente in maniera amplificata in presenza di AD (44).

Anche il gruppo di Lei et al. si è concentrato sulle interazioni di particelle di polistirene sia alla nano che alla microscala, investigando su diametri tra i 100 e i 500 nm e 1, 2 e 5 mm rispettivamente. Lo studio ha evidenziato come tutte le plastiche, nonostante la diversa dimensione, abbiano influenzato negativamente l'apparato locomotore e il sistema nervoso del nematode *Caenorhabditis elegans*, determinando una riduzione dell'aspettativa di vita. Esse infatti, hanno danneggiato i recettori colinergici e i neuroni GABAergici (45). Proprio questi neuroni pare siano correlati direttamente con l'Alzheimer (46), e nel lavoro di Guzmán et al. del 2018, viene evidenziato come una corretta interazione con il sistema GABAergico possa aumentare le percezioni influenzando l'apprendimento e la memoria, proponendo così nuovi trattamenti per l'AD (47).

In accordo con il paragrafo precedente, nella ricerca di Karin Mattsson et al. si dimostra la tossicità delle nanoparticelle plastiche per organismi viventi: particelle di polistirene con dimensione 52 nm modificate con carica positiva, sono risultate tossiche per la *Daphnia* e i pesci che si alimentano di questa. Questi ultimi hanno mostrato un cambiamento a livello comportamentale in termini di attività, tempo di alimentazione e in termini di distanza in cui nuotare per consumare il cibo fornito; inoltre, il cambiamento comportamentale risulta essere in funzione della dimensione delle particelle.

² Extracellular signal-regulated kinases (ERK) sono molecole di segnalazione intracellulare coinvolte in funzioni tra cui la regolazione della meiosi, della mitosi e delle funzioni post-mitotiche nelle cellule differenziate.

³ NFkBp65 è una subunità del complesso di trascrizione NF-kappa-B (NFkB); svolge un ruolo cruciale nei processi biologici come infiammazione, immunità, differenziazione, crescita cellulare, tumorigenesi e apoptosi.

Un contributo alla ricerca delle interazioni tra le nano- e microplastiche e l'Alzheimer lo potrebbe dare l'analisi *in silico*, che permetterebbe un minor utilizzo di risorse e un'indagine più rapida. Nonostante non ci siano ancora tanti studi che esaminano il problema con questo approccio, Hollóczki et al., nelle loro simulazioni di dinamica molecolare, hanno riscontrato che la trasformazione delle strutture secondarie di vari peptidi in presenza di diverse particelle plastiche, è comparabile a quella che avviene alle proteine elicoidali dei pazienti affetti da AD (48). Nel suddetto studio le nanoparticelle presentano un diametro pari a 5 nm, presentano cariche sia positive che negative, e interagiscono sia con a eliche che b foglietto.

In questo lavoro di tesi l'attenzione viene focalizzata su quale possa essere il ruolo delle nanoplastiche nel fattore attualmente più accreditato: l'amiloidogenesi.

1.3.1. Interazioni e aggregazione tra proteine e nanoplastica

Le proteine, sia fisiologicamente che in circostanze non fisiologiche tendono ad aggregare. Ordinariamente, le cellule cercano di rallentare la formazione di questi aggregati tossici tramite i *chaperoni molecolari* e i *proteasomi* (49): i primi sono un gruppo di proteine caratterizzate da similarità funzionale assistendo nel folding proteico e capaci di impedire l'aggregazione non specifica; i secondi sono complessi multiproteici che idrolizzano le proteine non foldate correttamente o aggregate.

Sebbene esista un meccanismo di difesa fisiologico, questo potrebbe non essere sufficiente: se gli ammassi proteici sono in concentrazioni elevate, risultano essere refrattari alla proteolisi e vengono accumulati nei cosiddetti *corpi d'inclusione (inclusion bodies)*. In particolare, quando un aggregato proteico viene trasportato dalle dineine sui microtubuli in posizione juxtannucleare e

pericentriolare, prende il nome di aggresoma (50). La Figura 6 mostra i due modelli di accumulo.

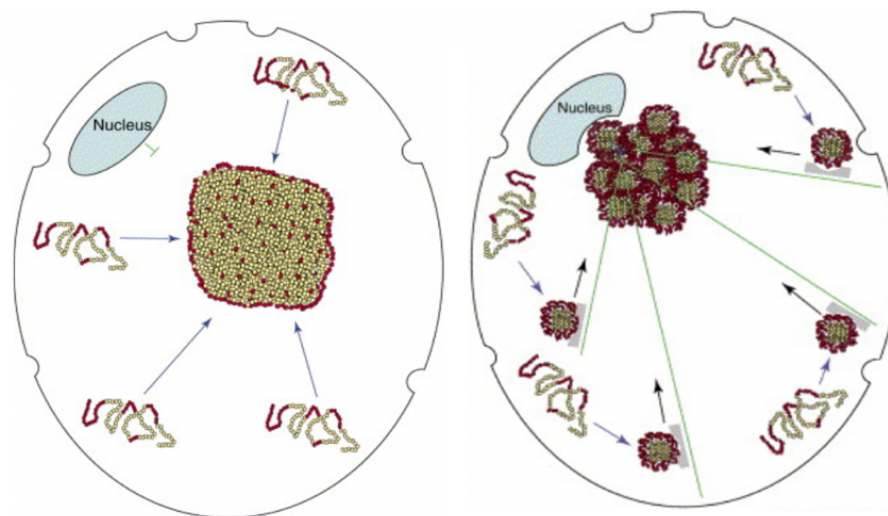


Figura 6 Modelli di formazione dei corpi di inclusione e degli aggresomi

Ad esempio, le proteine tau che portano alla generazione dei grovigli neurofibrillari, caratteristici nella malattia di Alzheimer, vengono accumulati nella forma di aggresoma. (51).

Le proteine, oltre all'aggregazione fisiologica e patologica tendono ad aggregare anche in presenza di micro e nanoparticelle non organiche, di materiali plastici o metallici. Questa forma di assemblamento fornisce una possibile strada per l'assorbimento cellulare delle nanoparticelle: le proteine presenti nei liquidi biologici formano una "corona" biomolecolare sulla superficie del corpo estraneo, determinando la formazione della cosiddetta *corona proteica* (*protein corona*). L'adesione delle proteine sulla superficie della nanoparticella è determinata da diverse forze dipendenti dall'affinità.

Le corone sono divise in "dure" e "morbide", rispettivamente *hard* e *soft corona*: le prime sono caratterizzate da forti interazioni in cui le proteine sono adsorbite saldamente sulla superficie della nanoparticella e si ritiene che abbiano un impatto più significativo sulle proprietà superficiali della stessa. Invece, i complessi di nanoparticelle/proteine legati in modo più blando, formando legami proteina-proteina più deboli, e quindi sono chiamate corone "soft" (52).

La caratterizzazione dei complessi protein corona-nanoparticelle ha attirato l'attenzione della ricerca a causa degli effetti cruciali e delle proprietà delle interazioni con i sistemi viventi, in quanto questi complessi costituiscono una nuova "identità biologica". Una distinzione tra le due tipologie di protein corona può essere svolta mediante spettroscopia a dicroismo circolare, osservando la conservazione della struttura secondaria della proteina dopo l'introduzione di nanoparticelle: se la struttura secondaria è preservata si considera soft, se si perde, definiamo la corona come hard (53) (54).

L'adsorbimento delle proteine sulla superficie di una nanoparticella può anche far sì che le proteine subiscano cambiamenti conformazionali, che possono ulteriormente modificare i meccanismi di comunicazione molecolare, compreso il riconoscimento cellulare e la conduttività del segnale. Il fenomeno di adsorbimento dipende dalle concentrazioni e dalla costante di legame di equilibrio di ciascuna proteina rispetto al substrato, funzione delle dimensioni, della forma, della carica superficiale e dalla composizione della superficie.

Per le hard corona, caratterizzate da un'alta affinità substrato-proteina, si ha un tasso di ricambio delle proteine lento, mentre per le soft il processo è più dinamico. Il tasso di ricambio è più rapido in quanto le proteine, essendo nello strato esterno, si scambiano facilmente nell'ambiente biologico, grazie all'abbondanza di proteine nei fluidi biologici e al loro contatto diretto.

La cinetica, come mostrato in Figura 7, può essere descritta da costanti di associazione k_{on} e di dissociazione k_{off} e i relativi valori sono correlati rispettivamente alla frequenza di contatto e all'energia di legame delle proteine e delle nanoparticelle.

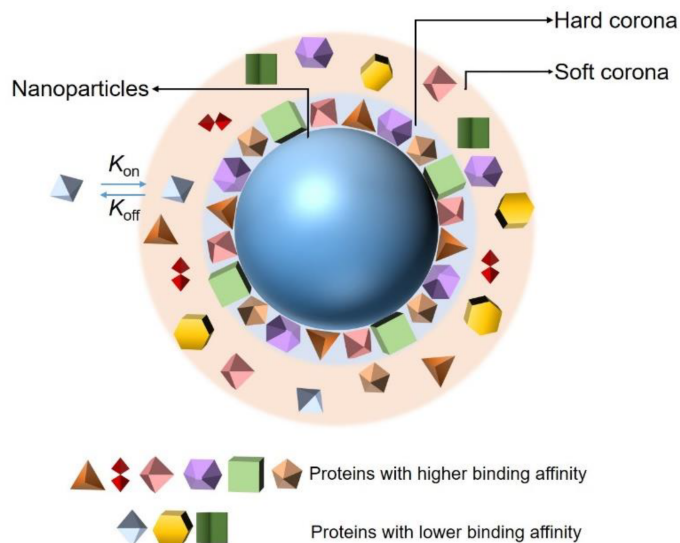


Figura 7 Rappresentazione schematica dell'ipotesi attuale della corona

L'equilibrio tra questi due fattori gioca un ruolo importante nel determinare l'affinità di una proteina a una nanoparticella ed è generalmente definito come costante di dissociazione all'equilibrio K_d . (55)

$$\frac{k_{off}}{k_{on}} = k_d \quad \text{Eq. (1)}$$

Le proteine, essendo caratterizzate da diverse grandezze e affinità determinano diverse corone proteiche in termini di morfologia, carica e dimensioni, esercitando la funzione di identificatore in un ambiente fisiologico.

Dunque, un'attenta analisi delle interazioni tra proteine e nanoplastiche aiuterà ad estendere la comprensione degli effetti nel lungo termine delle nanoparticelle plastiche e dei potenziali usi di queste in applicazioni biomediche.

1.3.2. Legami ed interazioni

Per comprendere meglio quali siano le interazioni che possono instaurarsi tra una proteina e una nanoplastica con maggiore probabilità, è necessario capire quali sono le forze che caratterizzano le proteine.

La sequenza amminoacidica, definita da legami peptidici covalenti, determina la struttura primaria, ovvero lo scheletro di residui definito dal DNA. Le interazioni deboli tra gli atomi del backbone della proteina, determinano la struttura secondaria, ovvero un'organizzazione stabile di motivi strutturali ricorrenti, mentre le strutture terziarie e quaternarie sono il risultato di più interazioni deboli delle catene laterali (-R) che determinano rispettivamente una struttura tridimensionale e la relazione tra diverse subunità. Il ripiegamento della catena amminoacidica definisce la funzionalità del dominio della proteina e non è un processo casuale: fra tutti i possibili ripiegamenti che può assumere, adotta quello in cui le interazioni fra le catene -R dei suoi residui sono ottimali e consentono di raggiungere una conformazione con la maggiore stabilità, quindi uno stato di energia minima, detta conformazione nativa. La stabilità di una proteina è la tendenza a mantenere la struttura nativa e in termini termodinamici si valuta in energia libera di Gibbs ΔG che si attesta nell'ordine di 20-65 kJ/mole. Più questa energia è bassa, maggiore sarà la sua stabilità.

Non sempre, anche a livello fisiologico, questo minimo di energia viene raggiunto, e per ovviare questo problema, tutta una serie di strutture proteiche, quali chaperoni molecolari e chaperonine, collaborano per ristabilire la conformazione nativa. Qualora questo non dovesse essere fatto, possono avvenire aberrazioni prima a livello proteico e poi a livello cellulare e tissutale.

Le interazioni deboli principali dunque sono:

- Legami idrogeno

Il legame idrogeno è una forza intermolecolare molto frequente in natura e nell'ambiente fisiologico. Ha luogo quando in un sistema sono presenti molecole in cui un atomo di idrogeno (H) è legato covalentemente ad un elemento molto elettronegativo come fluoro (F), ossigeno (O) e azoto (N).

Quando un atomo di idrogeno è legato ad un atomo per cui si genera un'elevata differenza di elettronegatività tra i due elementi, gli elettroni di legame risultano attratti dall'elemento più elettronegativo. Ciò comporta che il legame sia polare ovvero il baricentro delle cariche positive non coincide con il baricentro delle

cariche negative. L'idrogeno assume quindi una parziale carica positiva δ^+ e l'elemento più elettronegativo una parziale carica negativa δ^- . In queste condizioni, il δ^+ di una molecola interagisce con il δ^- di un'altra, instaurando il legame idrogeno.

Il legame H nelle proteine si verifica tra due catene laterali diverse quando si ha un atomo in grado di accettare un elettrone (ad esempio il gruppo idrossile della tirosina, treonina e serina) e l'atomo di un altro residuo in grado di rilasciare elettroni (ad es. gruppo amminico: glutammina e asparagina).

- Forze di Van der Waals

Le interazioni di Van der Waals sono collegate agli amminoacidi (AA) polari presenti nella catena laterale; si verifica quando c'è almeno un gruppo polare, quindi può accadere tra diversi dipoli permanenti (effetto di orientamento), tra dipoli permanenti e temporanei (effetto di induzione), tra dipoli indotti o temporanei (effetto di dispersione o forza di London).

Queste forze, per quanto deboli, risultano essere fondamentali come i legami idrogeno nel mantenimento della struttura terziaria della proteina. Dal punto di vista quantitativo, nei modelli di geometria molecolare, è difficile calcolarle per via della complessità strutturale delle proteine, che spesso vengono approssimate come sfere. Bisogna tenere però in considerazione che il modulo di queste forze è sicuramente minore nel caso in cui si utilizzassero le strutture reali (56).

Conoscere l'effettiva entità di queste forze può essere altamente utile nella comprensione dei comportamenti che persistono tra proteine-proteine e proteine-nanoparticelle a livello colloidale.

- Interazione idrofobica

L'interazione idrofobica è generalmente una forza intramolecolare instaurata dalle catene laterali idrofobiche quando sono inserite in soluzioni acquose. Nel caso specifico delle proteine, queste avvengono tra amminoacidi che presentano un gruppo laterale alifatico. Quando i residui non polari della proteina entrano a contatto con l'acqua avviene la rottura dei legami idrogeno presenti e viene

determinata una modifica strutturale: si viene a creare un core idrofobico mentre la parte più esterna, che rimane in contatto con la soluzione, è idrofilica.

Nelle proteine la quantità di residui polari è circa uguale a quella di quelli non polari, e tra questi annoveriamo l'alanina, la valina, la fenilalanina, la prolina, la leucina, l'isoleucina e la tirosina.

Queste interazioni in passato sono risultate essere molto interessanti in quanto hanno una proprietà termodinamica molto inusuale: sono governate da delle forze di origine entropica piuttosto che entalpica. Questo fa sì che le stabilizzazioni di tipo idrofobico avvengano ad alte temperature (57).

In questo lavoro queste interazioni risulteranno fondamentali in quanto le nanoparticelle di plastica sono di natura idrofobica, e sarà quindi interessante analizzare come queste andranno ad interagire tendenzialmente proprio con i residui più idrofobici.

- **Ponti disolfuro**

I ponti disolfuro sono dei veri e propri legami che si instaurano quando sono presenti due gruppi tiolici tramite una reazione di condensazione. Nelle proteine possono avvenire solo tra due cisteine, gli unici AA che presentano il suddetto gruppo funzionale. Questo tipo di legami, essendo molto forti, possono essere scissi in condizioni estreme come l'alta temperatura, il pH acido e presenza di riducenti.

Questi legami sono molto importanti per il mantenimento della struttura terziaria delle proteine per via della loro elevata resistenza. Essendo però possibili solo in presenza di cisteina, risultano essere molto meno frequenti degli altri tipi, e quindi la rottura anche solo di uno di questi legami, risulta essere grave per la struttura della proteina stessa.

Capitolo 2

Materiali e Metodi

2.1 Dinamica molecolare

Nel presente lavoro di tesi, lo strumento maggiormente utilizzato è stata la dinamica molecolare computazionale (MD) che permette, attraverso le simulazioni, di caratterizzare computazionalmente un sistema. Per caratterizzazione computazionale si intende l'insieme dei metodi di analisi mediante procedure di calcolo, basate sulla meccanica quantistica e classica, per lo studio dell'evoluzione di un complesso molecolare. Le simulazioni inoltre sono state svolte in parallelo agli esperimenti in laboratorio per la validazione *in vitro*.

La dinamica molecolare include tutte le tecniche computazionali che sono in grado, mediante l'utilizzo di equazioni fisiche, di predire l'evoluzione di un sistema, analizzando il movimento e le interazioni di atomi e molecole. L'obiettivo è determinare il comportamento dinamico di molecole attraverso la risoluzione delle equazioni dei moti di Newton, in particolare della seconda legge, permettendo il calcolo della traiettoria che descrive la configurazione a livello atomico del sistema in ogni punto durante l'intervallo di tempo simulato.

Le modellizzazioni computazionali possono essere di tipo *atomistico*, in cui le traiettorie vengono elaborate sui singoli atomi con le relative specifiche proprietà, oppure può essere *coarse-grained*, in cui gruppi di atomi vengono approssimati ad una sfera. Nel primo metodo si ha una maggiore precisione nell'elaborazione delle interazioni ma nel secondo si hanno calcoli più semplici e le simulazioni risultano impiegare meno tempo.

Un altro fattore che determina il tempo richiesto per determinare l'evoluzione di un sistema è l'ambiente predisposto; una simulazione può essere condotta in vuoto o in una condizione di solvatazione. L'ambiente solvatato può essere esplicito, ovvero vengono rappresentati gli atomi e le molecole del solvente, aumentando massivamente gli elementi richiesti nel calcolo e permettendo una rappresentazione più simile a quella reale. In alternativa, si può scegliere il

solvente implicito con l'inclusione di una costante dielettrica efficiente nel termine dell'energia potenziale.

Oltre alla caratterizzazione dell'ambiente, vengono definite le condizioni termodinamiche del sistema e principalmente si parla di tre tipologie di ensemble:

1. NVE ensemble o insieme microcanonico: il sistema è isolato, per cui il numero di particelle, velocità ed energia totale vengono conservati. Tale condizione simula un processo adiabatico in cui non c'è scambio di calore.
2. NVT ensemble o insieme canonico: il sistema lavora a temperatura costante: in questo modo l'energia cinetica è costante ma l'energia potenziale può variare, con la conseguenza che l'energia totale cambia. Questo è l'approccio più fisiologico in quanto non è un sistema isolato.
3. NPT ensemble o insieme isothermico e isobarico: il sistema viene considerato con pressione e temperatura costanti.

Una volta che le condizioni vengono definite è possibile iniziare la simulazione di dinamica molecolare per la quale sono necessari, oltre ad un software di modellazione, tre tipi di file:

1. Il file della struttura in formato *.psf*, in cui sono contenute le informazioni specifiche delle molecole necessarie per applicare un particolare campo di forza;
2. Il file di coordinate in formato *.pdb*, nel quale oltre alla posizione degli atomi, sono riportate informazioni sulla sequenza, il nome degli atomi e delle molecole a cui appartengono;
3. Il file parametrico *par_all36_prot.inp* in cui sono riportate le costanti numeriche necessarie per valutare forze ed energie. Il file dei parametri è strettamente legato al file della topologia utilizzato per generare il *.psf*: i due vengono generalmente distribuiti insieme e vengono assegnati nomi corrispondenti agli atomi.

2.1.1. Minimizzazione ed Equilibratura

La simulazione, una volta avviata, procede con una prima fase di minimizzazione energetica in cui il sistema viene portato alla temperatura desiderata.

Considerando un sistema composto da un insieme di atomi, si può definire superficie di energia potenziale (PES) una funzione a più variabili che descrive l'energia del sistema in funzione della sua geometria. La PES è definita dalla posizione di un insieme di atomi, in cui esistono dei punti stazionari, per cui la funzione non cresce e non decresce. Questi punti indicano i minimi e i massimi locali dell'energia potenziale. Matematicamente, i punti stazionari vengono identificati con i valori per i quali la derivata prima della funzione è nulla. Per capire se si tratta di un massimo o un minimo si considera la derivata seconda: quando è maggiore di zero si tratta di un minimo locale, mentre se è minore di zero è un massimo locale.

Nella fase di minimizzazione si vuole trovare la conformazione degli atomi in cui si raggiunge un minimo globale, ovvero il valore in assoluto più basso di energia. Il minimo globale identifica una geometria che dovrebbe essere il più simile alla struttura naturale (Figura 8).

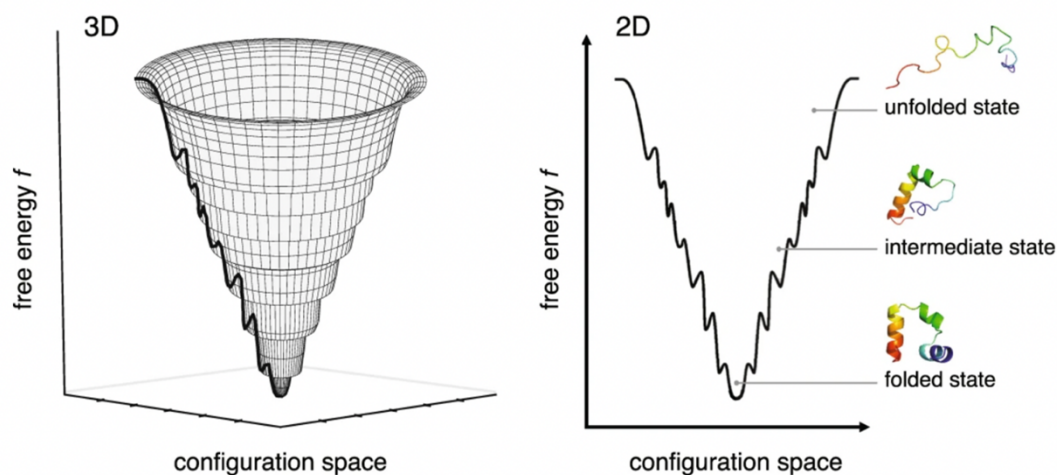


Figura 8 Rappresentazione della superficie dell'energia potenziale PES in 3D a sinistra e in 2D a destra.

Per eseguire questa ricerca vengono utilizzati degli algoritmi matematici sofisticati, come il metodo *steepest descent* (in italiano, discesa del gradiente) e

metodo del gradiente coniugato, tecniche che consentono di determinare i punti di massimo e minimo di una funzione di più variabili.

Una volta definito un insieme delle posizioni degli atomi di partenza, viene assegnata a ciascun atomo una velocità. Generalmente, queste vengono assegnate in modo casuale affinché si ottenga come partenza la corretta distribuzione Maxwell-Boltzmann alla temperatura desiderata (Figura 9).

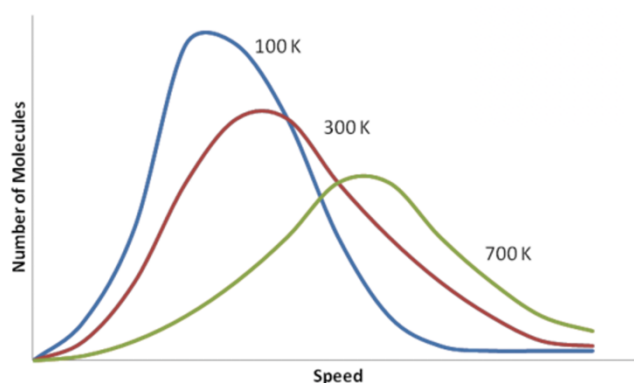


Figura 9 Distribuzione di Maxwell-Boltzmann in funzione delle diverse temperature.

In seguito alla minimizzazione, avviene l'equilibratura. Le due fasi differiscono l'una dall'altra per il fine per cui viene calcolato il campo di forza: la minimizzazione dell'energia implica la ricerca nel panorama energetico della molecola per un minimo locale, variando sistematicamente le posizioni degli atomi e il calcolo dell'energia. L'equilibratura coinvolge la dinamica molecolare, in base alla quale viene risolta la seconda legge di Newton, per ogni atomo nel sistema per determinarne la traiettoria. Il raggiungimento dell'equilibrio viene giudicato in base a come sono distribuite, nel sistema in un dato periodo di tempo, le velocità e la pressione. In questa fase la temperatura viene costantemente monitorata e se avvengono variazioni, oltre una soglia, rispetto alla T preimpostata, le velocità vengono scalate per consentire il raggiungimento della temperatura desiderata.

Eseguendo le simulazioni di dinamica molecolare, si ha la produzione di file output di diverso tipo, in cui si raccolgono i dati e sui quali è possibile svolgere analisi specifiche che verranno affrontate con maggior dettaglio nel prossimo capitolo.

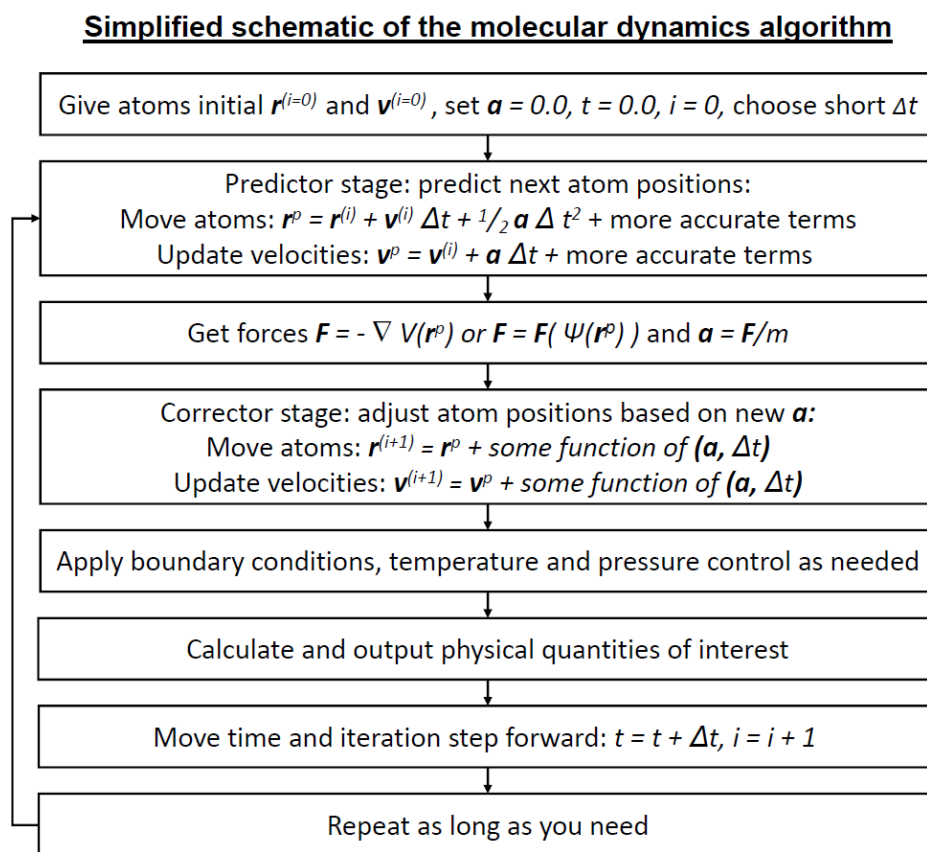


Figura 10 Schema generale di un algoritmo di dinamica molecolare

2.1.2. Protocollo computazionale

Per la descrizione dei sistemi analizzati attraverso la dinamica molecolare verranno considerate due tipologie:

- Sistemi di tipo 0: finalizzati alla preparazione delle nanoplastiche;
- Sistemi di tipo 1: finalizzati alle simulazioni di dinamica molecolare su cui vengono eseguiti gli approfondimenti.

I sistemi di tipo 0 comprendono circa 7000 atomi e le relative simulazioni sono state svolte in condizioni di vuoto per circa 5 ns.

I sistemi di tipo 1 sono stati solvatati con molecole d'acqua TIP3P e neutralizzati con l'aggiunta di ioni Na⁺ e Cl⁻. Nelle configurazioni con nanoplastica e singola catena peptidica sono presenti circa 30000 atomi, circa 80000 per nanoplastica e oligomero, fino a raggiungere 130000 atomi per la nanoplastica circondata da più peptidi. Tutti i sistemi sono stati generati e simulati 5 volte e la posizione iniziale degli oligomeri è stata scelta in modo da rivolgere alla nanoplastica ogni faccia a circa 10Å di distanza (figura 11).

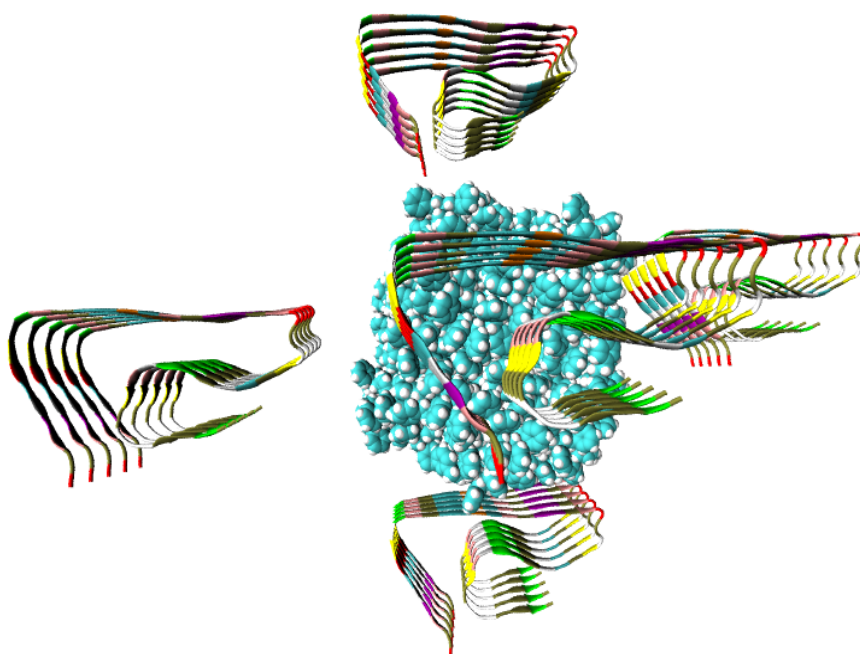


Figura 11 Nell'immagine vengono mostrate le 5 configurazioni di interfaccia tra il polimero e l'oligomero

Tutte le simulazioni di minimizzazione dell'energia ed equilibratura, dalla durata di 100 ns, sono state definite da condizioni di pressione e temperatura costanti (NPT). La temperatura è stata impostata a 300K utilizzando il controllo di temperatura dinamico Langevin e la pressione è stata controllata a 1 bar utilizzando il barostato Nose – Hoover – Langevin.

Le simulazioni MD sono state eseguite utilizzando un time step di 2 fs, il cut off delle forze di non legame di 1Å, legami rigidi e forze elettrostatiche a lungo raggio Particle mesh Ewald (PME) attivati.

2.1.3. Design di nanoplastiche

La scelta di concentrarsi sulle nanoplastiche deriva dal fatto che, come anche già anticipato nel precedente capitolo, sembrerebbero essere più pericolose delle microplastiche. Inoltre, a livello computazionale si è vincolati all'analisi di sistemi ridotti, per cui le nanoparticelle realizzate in questo lavoro hanno un diametro di circa 5 nm. Questo valore deriva dalle indagini di tossicologia relative alle plastiche, sia in ambiente marino che terrestre, le quali non presentano mai una dimensione inferiore rispetto a quella studiata (48).

Le nanoplastiche selezionate sono state il PP, il PE, il PS e il PET poiché rientrano ai primi posti della classifica delle plastiche più utilizzate a livello industriale (4).

Per la realizzazione computazionale della nanoparticella si è partiti dalla costruzione del singolo monomero relativo ad ogni plastica (Figura 12), il quale è stato costruito attraverso l'utilizzo dell'editor molecolare Avogadro.

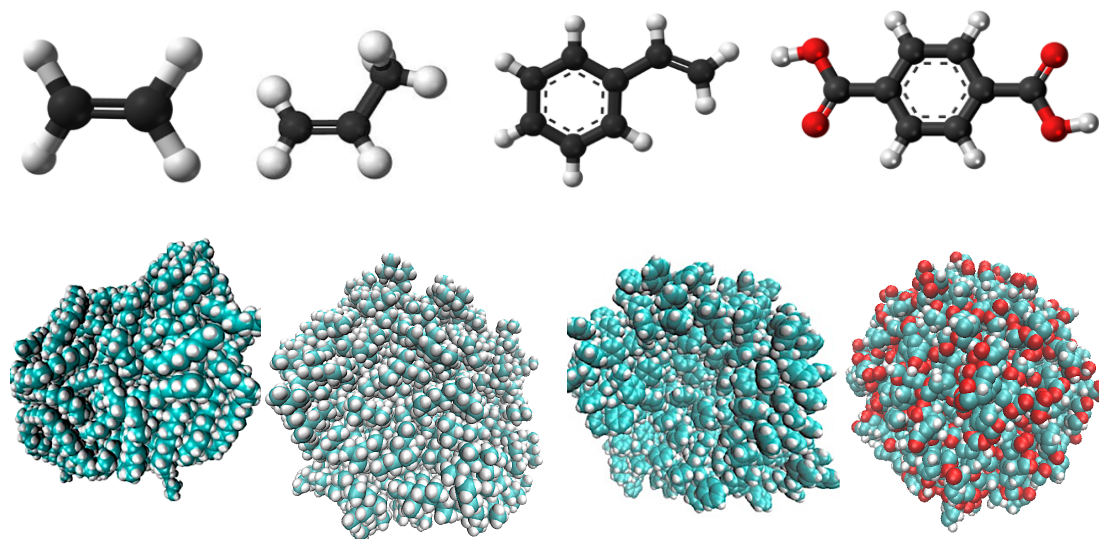


Figura 12 Monomeri utilizzati per la creazione delle catene plastiche. Da sinistra verso destra sono rappresentati il polietilene, il polipropilene, il polistirene e polietilene tereftalato

Tramite gli script `ReplicatePS.sh`, `Replicate_monomer.tcl` e `Rename_PS.tcl` (Appendice q, r, s) il monomero è stato replicato il numero di volte desiderato per realizzare una catena polimerica. A seconda della plastica scelta, le catene hanno assunto lunghezze diverse venendo poi posizionate in modo tale da assumere una struttura cubica ordinata.

Come si può vedere dalla Figura 14, a seconda della lunghezza iniziale della catena, il cubo è stato organizzato da un numero differente di polimeri lineari, che hanno determinato comunque per tutti e 4 i sistemi un totale di circa 7000 atomi.

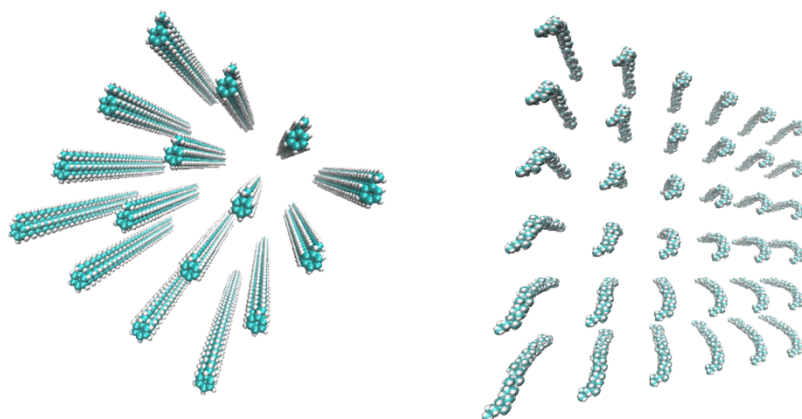


Figura 13 Posizione iniziale delle catene di polimero per la creazione della nanoparticella plastica

Il passaggio da cubo a sfera è stato realizzato in sistema di tipo o che presentava nel file di configurazione anche lo script `BubbleFast.tcl`. (Appendice t). Nella Figura 14 vengono mostrati frame sequenziali della simulazione che ha portato alla formazione della nanoplastica.

Per verificare l'effettiva stabilità della molecola appena creata, sono state svolte brevi simulazioni in vuoto della stessa. In tutti e quattro i casi le catene sono rimaste adese, mantenendo la forma sferica precedentemente ricavata e determinato la struttura che verrà poi utilizzata per studiare le interazioni con le proteine.

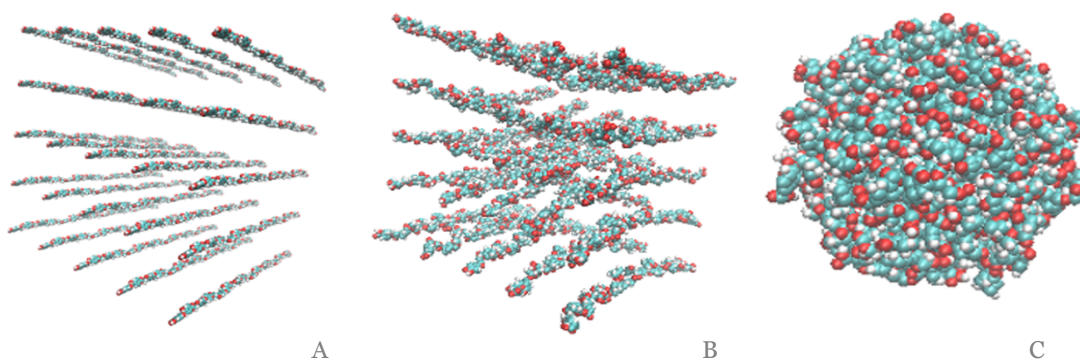


Figura 14 Formazione nanoparticella di PET nella sua configurazione iniziale; b. configurazione intermedia; c. configurazione finale.

2.1.4. Design catene peptidiche e fibrille

Per la componente proteica sono state utilizzate catene peptidiche e oligomeri diversi.

In particolare, stati analizzati i peptidi $A\beta_{1-42}$, $A_{2V} A\beta_{1-42}$, $A\beta_{16-20}$ e $A\beta_{25-42}$; il primo rappresenta la componente principale delle placche amiloidi, il secondo un mutante della prima con maggiori capacità fibrillogeniche (58), il terzo è il peptide core-sequence KLVFF fondamentale per l'assemblaggio di $A\beta$ e considerato un inibitore dell'aggregazione di $A\beta$ (59), e l'ultimo un peptide facilmente sintetizzabile per gli esperimenti svolti parallelamente *in vitro*.

Per la creazione dei peptidi sono stati utilizzati PyMol e Avogadro, rispettivamente un software di grafica 3D utilizzato per la rappresentazione di biomolecole in biochimica e bioinformatica ed un editor di visualizzazione molecolare utilizzato in vari settori che vanno dalla chimica computazionale alla scienza dei materiali.

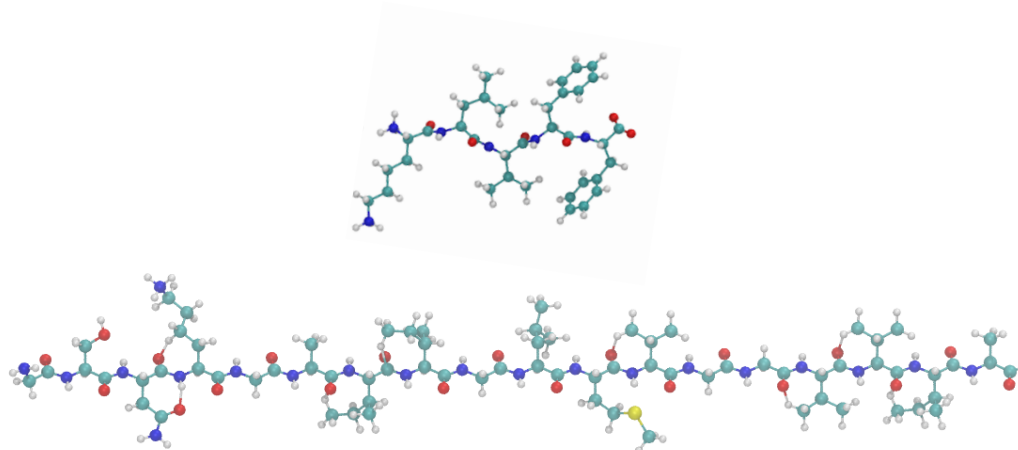


Figura 15 Nell'immagine sono rappresentati, come esempio dei peptidi realizzati con PyMol e Avogadro: il KVLFFin alto e il A β 25-42 in basso.

Per approssimare la forma fibrillare è stato scelto di utilizzare la struttura della beta-amiloide completa (1-42) identificata con codice 5OQV nel Protein Data Bank.

La configurazione è rappresentata in origine come dimero assemblato in modo da determinare un nucleo fibrillare idrofobico che racchiude i C terminali. Infatti, sono presenti tre cluster idrofobici che stabilizzano la conformazione della subunità: 1) Ala2, Val36, Phe4, Leu34, 2) Leu17, Ile31, Phe19 e 3) Ala30, Ile32, Met35, Val40. Alla luce di quanto appena esposto, l'effetto della mutazione A2V nell'N-terminale può essere razionalizzato sulla base che la valina è maggiormente idrofobica dell'alanina e rafforzerebbe l'interazione idrofobica portando ad una maggiore stabilità della fibrilla.

Inoltre, le altre maggiori interazioni stabilizzanti sono il ponte salino tra Lys28 e A42 e le interazioni polari tra His6, Glu11 e His13.

Della conformazione completa è stata presa la sola sub-unità con 5 peptidi per motivi di semplicità computazionale, per cui nelle simulazioni risulta libera anche la cavità idrofobica. L'oligomero è stato considerato nella versione originale wild type (Figura 16), nella condizione mutante A2V e nella conformazione parziale con i peptidi A β 25-42.

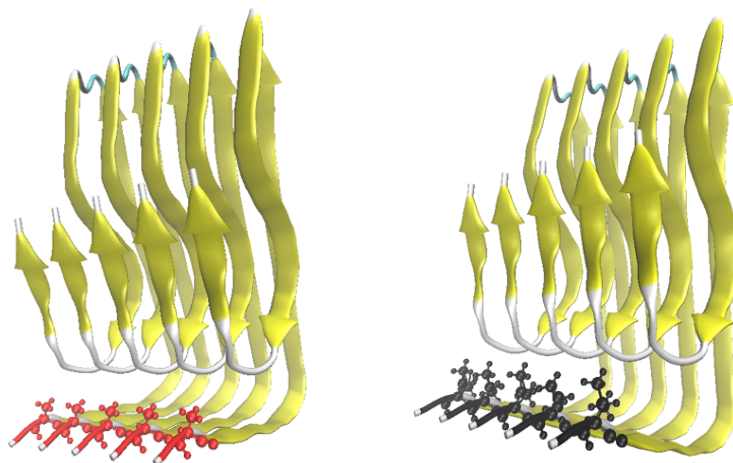


Figura 16 Nell'immagine vengono mostrati gli oligomeri 5OQV wild type e il mutante A2V

2.2 Caratterizzazione *in vitro*

Il vantaggio dello studio *in vitro* rispetto ad uno studio *in vivo*, svolto quindi all'interno di un essere vivente, deriva dal fatto che il singolo fenomeno che si vuole osservare è isolato; il contro è che sicuramente è meno realistico in quanto risulta essere un ambiente altamente semplificato. Ad oggi la caratterizzazione *in vitro* rappresenta lo step fondamentale, successivo alla caratterizzazione computazionale, che permette di passare allo studio su modello animale.

In questo lavoro di tesi l'analisi *in vitro* è stata svolta in parallelo a quella *in silico* per avere una maggiore validità scientifica. Per la preparazione dei campioni, sono stati realizzati i peptidi A β 25-42 tramite il protocollo di sintesi peptidica standard. Successivamente sono state svolte analisi con il dicroismo circolare, con lo spettrofotometro e con l'AFM per studiare l'evoluzione della struttura

secondaria della proteina in presenza di nanoparticelle di PS con dimensioni e carica diversa.

Per determinare il tipo di soluzione che permettesse una migliore caratterizzazione *in vitro* sono stati testati diversi approcci mostrati nella Tabella 1.

Tabella 1 Nella Tabella sono presenti le diverse composizioni delle soluzioni usate per la caratterizzazione *in vitro*

A	75 μ L NaOH 10 mM + 50 μ g A β 25-42 10, 5, 2.5 e 1.25 μ M
B	75 μ L DMSO 10 mM + 50 μ g A β 25-42 10, 5, 2.5 e 1.25 μ M
C	10 μ L NaOH 100 mM + 20 μ L di HCl 100mM + 260 μ L di PBS + 50 μ g A β 25-42 10 e 20 μ M
D*	20 μ L NaOH 40 mM +50 μ g del peptide A β 25-42 + 30 minuti di sonicatore + 280 PB 10 mM

Per il dicroismo circolare e l'AFM sono state provate le soluzioni presenti in tabella, e nel caso del saggio con ThT, a ciascuna sospensione sono stati aggiunti 10 μ L di ThT ad una concentrazione di 20 μ M.

Dopo diverse prove, è stato ritenuto che i risultati maggiormente interpretabili fossero quelli ottenuti con la soluzione D, con aggiunta nel caso della spettroscopia di ThT 20 μ M.

Il passaggio della Eppendorf⁴ nel sonicatore per 30 minuti si è rilevato fondamentale per sciogliere al meglio il peptide liofilizzato. Rispetto a tutte le altre soluzioni, questa ha permesso di ottenere un segnale al CD maggiore e uno spettro in beta al tempo iniziale meno marcato rispetto alle altre.

⁴ Eppendorf: provette monouso per piccole quantità di liquido che devono il loro nome nell'uso comune all' industria Eppendorf, uno dei più importanti produttori di questo materiale da laboratorio.

2.2.1. Sintesi dei peptidi

La sintesi peptidica è una procedura difficoltosa che avviene mediante la formazione chimica del legame *ammidico*, il quale unisce il gruppo carbossilico R'-COOH e il gruppo amminico R'-NH. La complessità è data dalla presenza di altri gruppi funzionali che possono essere presenti nelle catene laterali degli aminoacidi. Non è quindi sufficiente realizzare il legame peptidico in sé, ma bisogna controllare ed evitare la formazione di altri legami indesiderati. Per fare ciò si utilizzano dei *gruppi protettori* diversi a seconda del terminale da coprire.

Tra i protettori più utilizzati con il gruppo amminico c'è il Fluorenil metilossicarbonile (Fmoc) (Figura 17). È una molecola ottenuta dall'estere cloroformiato Fmoc-Cl.

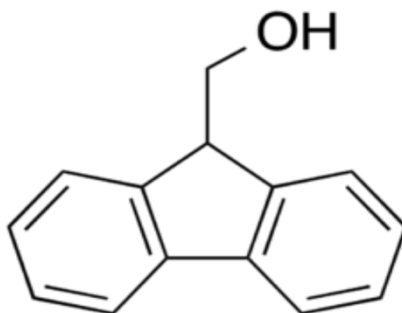


Figura 17 Struttura molecolare del Fmoc

Il legame tra BOC e AA è altamente reversibile in ambiente acido e viene staccato generalmente con acido Trifluoroacetico (TFA) disciolto in Diclorometano (DCM). Un altro vantaggio derivante dall'utilizzo del BOC è la difesa dalla racemizzazione⁵ grazie all'impedimento della formazione di ossazoloni.

Nel caso del gruppo carbossilico, uno dei protettori più comunemente utilizzati è il gruppo benzilico (Bzl). Anche in questo caso, come per l'N-ter, l'efficacia del

⁵ Trasformazione di un composto otticamente attivo nella forma otticamente inattiva (racemo).

protettore deriva da un cambio chimico del terminale protetto: la reattività del gruppo carbossile è inibita poiché viene trasformato in un estere benzilico. Quest'ultimo legame è stabile nelle condizioni di scissione del legame BOC-NH (Figura 19), ma viene spezzato in acido fluoridrico liquido anidro a 0 °C.

Quindi nella sintesi peptidica, la formazione del legame ammidico avviene correttamente solo se abbiamo il primo AA bloccato con il BOC e avente il gruppo carbossile libero, e il secondo AA bloccato con il BZL e avente il gruppo amminico libero. Attualmente esistono 4 metodi di attivazione: la preparazione di cloruri acilici, anidridi simmetriche, esteri attivi e l'attivazione con N,N'-dicicloesil carbodiimide DCC aggiunta in situ (60).

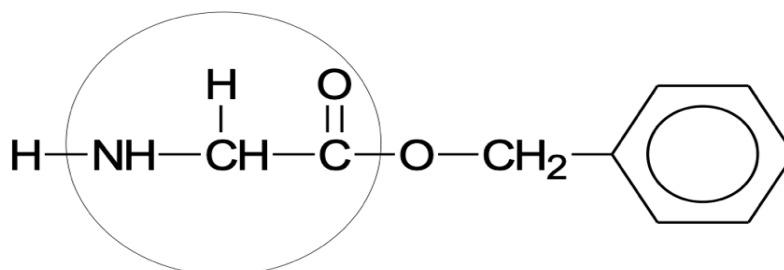


Figura 18 Esempio di protezione del C-ter della glicina (Gly).

2.2.2. Dicroismo Circolare

Il dicroismo circolare, sigla CD dall'inglese circular dichroism, è uno strumento che sfrutta l'omonimo fenomeno fisico, il quale permette l'assorbimento differente della luce polarizzata circolarmente da parte di una sostanza chirale (Figura 19).

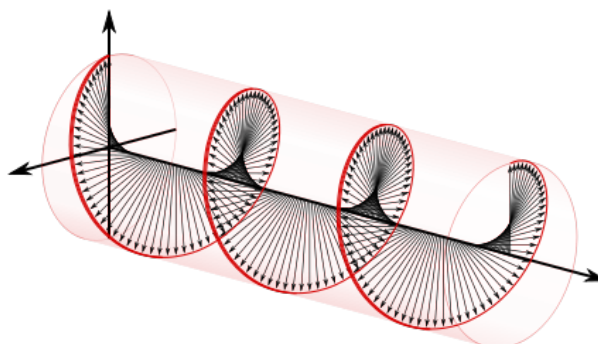


Figura 19 Schema della luce polarizzata circolare

Tale fenomeno, scoperto intorno alla metà del XIX secolo, viene sfruttato in diversi campi, tra cui l'analisi delle strutture secondarie delle proteine.

La matematica che definisce il funzionamento del dicroismo circolare è basata sul concetto che la luce polarizzata circolarmente quando attraversa un medium ha tre differenze relative al verso di polarizzazione (destra e sinistra):

- 1) Diversa velocità di polarizzazione, $c_{left} \neq c_{right}$;
- 2) Diversa lunghezza d'onda, $\lambda_{left} \neq \lambda_{right}$;
- 3) Diversa estensione di assorbimento, $\epsilon_{left} \neq \epsilon_{right}$.

Il dicroismo circolare è proprio la differenza di assorbimento $\Delta\epsilon = \epsilon_{left} - \epsilon_{right}$. Il moto traslatorio e rotatorio degli elettroni deriva rispettivamente dall'interazione del campo elettrico e dal campo magnetico della sorgente luminosa con una molecola.

Gli unici due parametri che ha bisogno di conoscere la macchina per l'analisi strutturale, sono la concentrazione molare dell'analita e la distanza tra campione e laser, infatti:

$$\Delta A = A_{left} - A_{right}$$
$$\Delta A = (\epsilon_{left} - \epsilon_{right})Cl \rightarrow \Delta\epsilon = \frac{\Delta A}{Cl} \quad (\text{Eq. 2})$$

Con A assorbanza e C ed l rispettivamente concentrazione molare e cammino ottico in cm.

In conclusione, quello che restituisce un'analisi al CD è un grafico dipendente dalla struttura secondaria della proteina analizzata. Sono presenti in letteratura dei grafici standard, come in Figura 20, in cui vengono rappresentate le curve per diverse le strutture secondarie.

Come si può vedere in Figura 20, le α -eliche presentano due picchi negativi a 208 e 222 nm e uno positivo a 193 nm, mentre i β foglietti antiparalleli hanno un picco negativo a 218 nm e uno positivo a 195 nm (61).

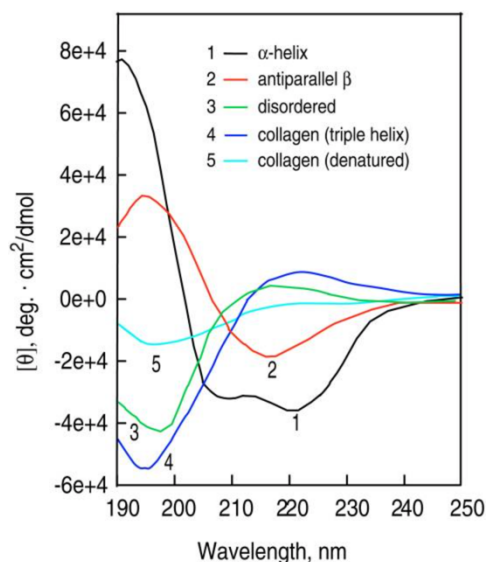


Figura 20 Grafico rappresentante le curve di strutture secondarie standard.

Essendo l'esito dell'analisi, per la maggior parte delle volte, un misto di struttura secondarie, esistono banche date (come ad esempio Protein Circular Dichroism Data Base, PCDDDB) che hanno in archivio i grafici relativi all'analisi di diverse proteine. Mediante l'utilizzo di algoritmi, sono in grado di eseguire una convoluzione tra l'analisi effettuata e i propri dati, identificando quali sono le strutture secondarie presenti e in quale percentuale.

In questo lavoro di tesi il CD è stato utilizzato per la misura della struttura secondaria degli oligomeri di A β 25-42. Le proteine sono state immerse in una soluzione a base di NaOH, con differenti molarità, la quale è stata sfruttata per la sua proprietà di visualizzare e quantificare la presenza di aggregati proteici non perfettamente foldati con lo spettroscopio.

2.2.3. Spettroscopia e saggio TioflavinaT (ThT)

La spettroscopia è una tecnica d'analisi che studia le interazioni tra materia e radiazione elettromagnetica in funzione della sua lunghezza d'onda o frequenza. Lo spettrofotometro è usato in chimica per investigare strutture atomiche e

molecolari, in particolare in questo lavoro di tesi è stato utilizzato per l'analisi della struttura secondaria, in parallelo al diicroismo circolare.

La teoria alla base della spettroscopia è legata al concetto di risonanza; essa descrive il fenomeno nel quale una forza periodica ha un aumento in ampiezza se la sua frequenza di oscillazione è simile alla sua frequenza naturale. Quest'ultima,

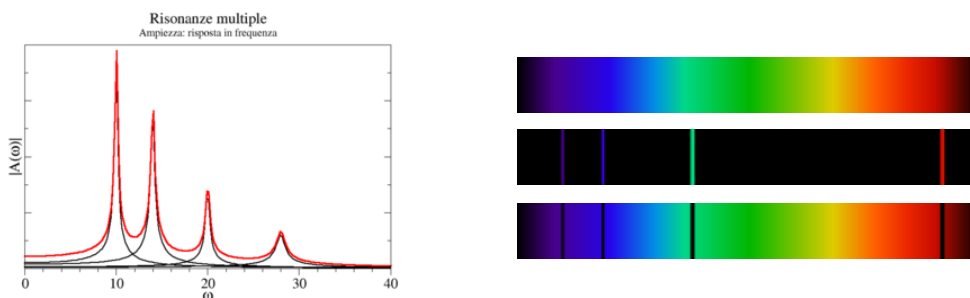


Figura 21 A sinistra è rappresentato un grafico frequenza vs. ampiezza con curve che hanno un picco nella loro frequenza di risonanza. A destra dall'alto verso il basso si ha lo spettro continuo, lo spettro di emissione e lo spettro di assorbimento di un dato elemento.

detta anche frequenza propria, è la frequenza che ha un corpo che vibra liberamente dopo che è stato eccitato. Se quindi si tracciasse un grafico frequenza vs. ampiezza, quello che si otterrebbe sarebbe una curva che presenta un picco alla frequenza di risonanza (sinistra della Figura 21). Nella teoria della meccanica quantistica, la rispettiva risonanza è rappresentata da una coppia di stati stazionari di un sistema, correlati ad una fonte di energia che li fa oscillare, come un fotone. Lo spettro di atomi e molecole spesso è rappresentato come una serie di linee spettrali che rappresentano la frequenza di risonanza tra due stati quantici. Le linee spettrali sono il risultato dell'assorbimento o dell'emissione di luce in un piccolo range di frequenze (destra della Figura 21).

Lo spettrofotometro è in grado di captare le linee spettrali e identificare la molecola che si sta analizzando. Esistono diversi tipi di spettrofotometri che differiscono per la natura di interazione tra materia e sorgente di energia: in questa tesi è stato utilizzato lo spettrofotometro ad emissione. Quest'ultimo è in grado di determinare la quantità di radiazione emessa da parte dell'analita durante la transizione degli elettroni di un atomo, da un livello di energia maggiore ad uno minore.

La sonda utilizzata per l'analisi della cinetica di aggregazione proteica in presenza delle nanoplastiche è la Tioflavina T, nota anche con la sigla ThT. La struttura molecolare è mostrata nella Figura 22.

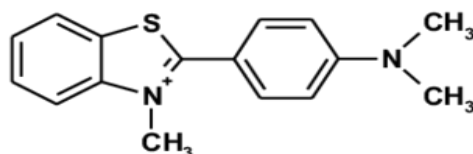


Figura 22 Struttura Tioflavina T (ThT)

La ThT è comunemente utilizzata per analisi *in vitro* di fibrille amiloidi; essa è infatti in grado di legarsi stabilmente con le fibre e dare un segnale di fluorescenza a circa 482 nm quando stimolata con un laser di lunghezza d'onda 450 nm (62). Inoltre, è comunemente accettato che il legame è selettivo e avviene nel canale della catena laterale lungo l'asse principale della fibrilla (63). Nonostante il grande utilizzo della Tioflavina T, diversi studi hanno come obiettivo trovare la concentrazione ottimale della sonda in base alla soluzione da analizzare. Il gruppo del Dottor Xue, per esempio, suggerisce l'utilizzo di una concentrazione di ThT pari a 10-20 μM per gli studi di cinetica di fibrillazione e 50 μM per la quantificazione di fibrille preformate (62).

In conclusione, è stato scelto di utilizzare una concentrazione di 20 μM di ThT per eseguire le analisi di spettroscopia con timestep di 24, 48 e 96h, in cui le soluzioni sono state mantenute a 37 °C e ogni 2 minuti la piastra veniva agitata per 30 secondi.

2.2.4. Microscopia a Forza Atomica

Il microscopio a forza atomica, noto con l'acronimo AFM (Atomic Force Microscopy), riesce ad analizzare la materia su scala nanometrica grazie ad una micro-leva chiamata cantilever, la quale presenta all'estremità una punta generalmente in silicio.

L'analisi sfrutta la formazione di forze di Van der Waals tra la punta e il campione che determinano l'inclinazione del cantilever. È presente, inoltre, un sistema laser in grado di osservare il movimento della leva. Infatti, il laser va a colpire la parte terminale del cantilever per poi essere riflesso su una matrice di fotodiodi:

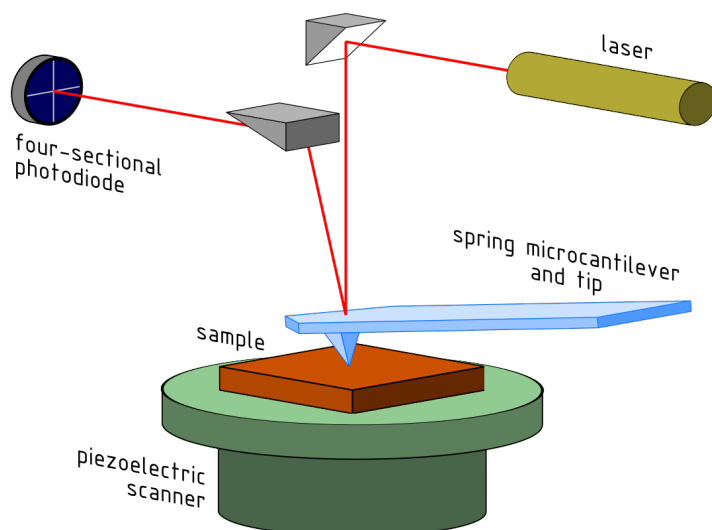


Figura 23 Schema AFM (80)

il minimo movimento del cantilever andrà a modificare quindi la posizione finale del laser e in base al segnale misurato dai sensori è possibile ricostruire la morfologia delle superfici analizzate. Lo schema in Figura 23 mostra il funzionamento dell'AFM.

In generale questo microscopio può essere utilizzato in tre modi diversi:

- 1) Misurazione di forza;
- 2) Studio della topologia di un materiale;
- 3) Manipolazione.

In questo caso specifico è stato impiegato per l'analisi delle interazioni tra nanoparticelle di polistirene e filamenti di A β 25-42. Sono stati analizzati 5 diversi sistemi che variavano in base alla carica e alla grandezza delle nanoparticelle. Inoltre, ogni sistema aveva una concentrazione di nanoplastica di 1:1000 V/V.

I sistemi analizzati:

- 1) A β 25-42 25 μ M+ PS⁺ sferico con un diametro pari a 50 nm;
- 2) A β 25-42 25 μ M+ PS⁻ sferico con un diametro pari a 50 nm;
- 3) A β 25-42 25 μ M+ PS neutro sferico con un diametro pari a 50 nm;
- 4) A β 25-42 25 μ M+ PS⁺ sferico con un diametro pari a 100 nm;
- 5) A β 25-42 25 μ M+ PS⁻ sferico con un diametro pari a 100 nm;

Ogni campione è stato bagnato con HCl 10 mM per 10 minuti, in modo da favorire l'attaccamento delle fibre alla mica⁶, lavato con 10 ml di H₂O e fatto asciugare per altri 10 minuti.

Tutte le immagini acquisite con l'AFM sono state ottenute dall'analisi prima di un quadrato di lato 17 μ m e poi da una sotto analisi dello stesso, ma con un lato pari a 5 μ m.

⁶ Le miche sono materiali appartenenti ai fillosilicati. Presentano una struttura a strati e sono facilmente sfaldabili e per questo è facile "pulirle" rimuovendo lo strato più superficiale. Trovano largo impiego come substrato nell'AFM e generalmente presentano una forma discoidale con diametro di circa 12mm.

Capitolo 3

Risultati e discussione

3.1 Analisi *in silico*

Come già introdotto nei capitoli precedenti, la ricerca del lavoro di tesi si è articolata tra analisi *in silico* e *in vitro*. Nel presente capitolo vengono espone le conclusioni tratte dalle simulazioni di dinamica molecolare, in seguito le osservazioni degli esperimenti eseguiti con strumentazione laboratoriale, per poi giungere, tenuto conto dei risultati complessivi, alle conclusioni e discussioni.

Il fine dell'analisi *in silico* in questo lavoro di tesi è stato lo studio delle interazioni che si instaurano tra il peptide A β 1-42, nelle diverse forme presentate nel capitolo precedente, e le nanoplastiche. La Tabella 2 riassume le simulazioni svolte.

Nanoplastica +	A β 1-42	A β 42-A2V	5OQV	5OQV-A2V	A β 16-20	A β 25-42	5OQV25-42
-------------------	----------------	------------------	------	----------	-----------------	-----------------	-----------

Tabella 2 Elementi delle diverse simulazioni

Le nanoplastiche che si sono analizzate PE, PS, PET e PP hanno tutte sempre interagito, anche se in modo diverso, con le proteine. Di ogni sistema sono state svolte 5 simulazioni, tutte della durata di 100 ns per un tempo computazionale totale di analisi superiore ai 16 μ s.

Di ogni simulazione inoltre, sono stati studiati i seguenti parametri:

- RMSD;
- % di β -sheet presente;
- Numero di contatti che si sono instaurati tra NP e proteina;
- Analisi dei residui coinvolti nei contatti.

Il primo step dell'analisi *in silico* è stato riprodurre il lavoro svolto da Oldamur Hollóczki nel quale viene affermato che la presenza delle nanoplastiche può cambiare la struttura secondaria delle proteine (1).

Nel lavoro di Hollóczki viene analizzata l'interazione tra il polietilene, polipropilene, polietilene tereftalato e nylon-6,6 (N66) e due frammenti proteici rappresentativi dell' α -elica e β -foglietto. Per questi ultimi, nel presente lavoro sono stati utilizzati per la prima struttura la decaalanina, usata anche nel tutorial di VMD [<https://www.ks.uiuc.edu/>], mentre per la struttura β -sheet è stata utilizzata la proteina triptophan zipper scaricata dalla Protein Data Bank (ID PDB: 1LE1). Invece, il polimero utilizzato in questa prima parte del lavoro è stato il polietilene. Il fine di queste prime simulazioni è determinare come la presenza della nanoplastica possa interagire, e nel caso modificare, la struttura secondaria dei peptidi. Le simulazioni sono state svolte in ambiente acquoso esplicito ionizzato della sola proteina e in presenza della nanoplastica.

Si è osservato che la proteina entrava sempre in contatto con la nanoparticella, andandosi ad appoggiare sulla superficie (Figura 24).

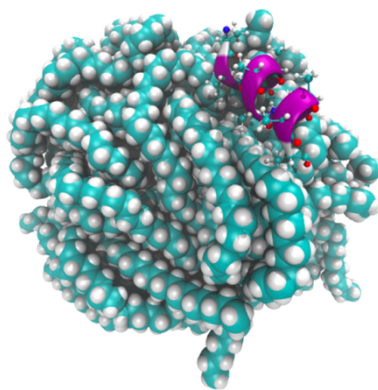


Figura 24 Nell'immagine si può osservare il contatto tra decaalanina e polietilene.

Basandosi sul confronto delle modifiche della conformazione strutturale dei frammenti proteici si osserva, analogamente allo studio di Hollóczki, che nel caso del polietilene la conformazione della decaalanina è stabilizzata dalla presenza di nanoplastiche mentre la triptophan zipper non mostra condizioni indotte dal polimero.

Infatti, nella simulazione della sola componente proteica, la struttura β -foglietto si mantiene costante per tutta la durata, mostrando una stabilità maggiore in acqua rispetto all' α -elica che si riorganizza assumendo una configurazione molto variabile, presentando turn e random coil (Figura 25 A e 25 B). In presenza del PE si nota una stabilizzazione dell' α -elica che non perde la sua struttura secondaria, mentre per il β -sheet non si osservano differenze (Figura 25 C e 25D). La Figura 25 E rappresenta la legenda.

L'analisi è stata svolta mediante il tool di VMD che permette di identificare sette possibili conformazioni delle proteine:

- T = hydrogen bonded turn;
- E = extended conformation, componente principale del β -foglietto;
- B = isolated β -bridge (legami idrogeno β -sheet a coppia singola);
- H = α -helix (α -elica);
- G = 3-turn helix (elica 3-10);
- I = 5-turn helix (elica π);
- C = random coil.

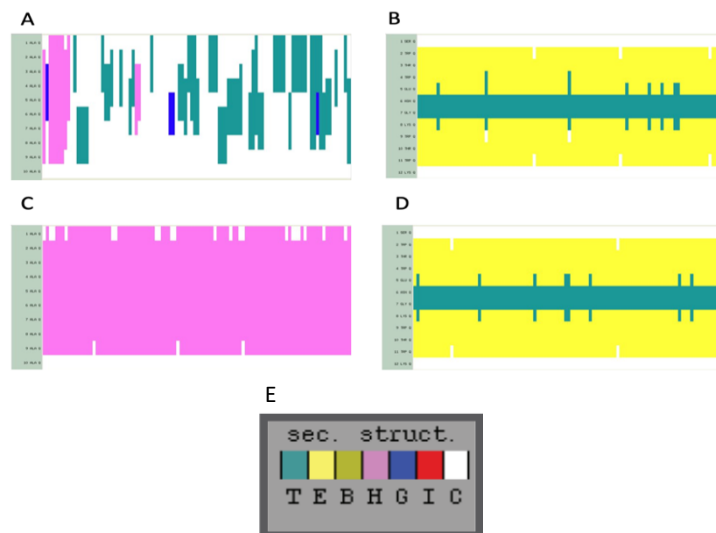


Figura 25 Nell'immagine vengono mostrate i timeline relative alla struttura secondaria dei frammenti peptidici, ottenuti con il tool di VMD.

Nelle figure A e B vengono mostrate le strutture secondarie rispettivamente della decalanina e del triptophan zipper in ambiente acquoso senza presenza di nanoplastica; nelle figure C e D le strutture secondarie rispettivamente della decalanina e del triptophan zipper in ambiente acquoso con presenza di nanoplastica

3.1.1. RMSD

L'analisi del RMSD ha la funzione di misurare la distanza media tra gli atomi nel tempo. Questa misura può essere utilizzata con diversi fini, in questo caso specifico l'RMSD ha la funzione di indagare su come varia nel tempo la stabilità della proteina a contatto con le diverse nanoplastiche.

L'equazione che permette il calcolo dell'RMSD è la seguente:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Dove δ_i è la distanza tra l'atomo i e il punto di riferimento o il punto medio degli N atomi equivalenti. Generalmente sono usati come riferimento gli atomi del backbone come C, N e O o semplicemente il C_α . L'unità di misura dell'RMSD è generalmente l'Å, che equivale a 10^{-10} m, in quanto rappresenta una lunghezza.

Nei risultati ottenuti si è osservata una maggiore stabilità della versione A2V della proteina sia per quanto riguarda il peptide singolo che la fibrilla con e senza la presenza delle nanoplastiche. Il risultato è perfettamente in linea con i dati presenti in letteratura, infatti, la versione A2V ha un tasso di aggregazione molto più basso rispetto alla versione wild type (2). Questo va anche a spiegare la sua maggiore tossicità in quanto la fase da oligomero dura mediamente di più rispetto alla sua versione naturale. La Figura 26 mostra il caso in cui si analizza il peptide A β 1-42 wild type e mutato senza la presenza delle nanoplastiche.

Come si può osservare nei grafici il valore massimo che l'A β 42-A2V raggiunge, ossia 12 Å, è circa uguale al punto di partenza (T_0) della A β 1-42, a supporto della tesi relativa alla maggiore stabilità della A2V.

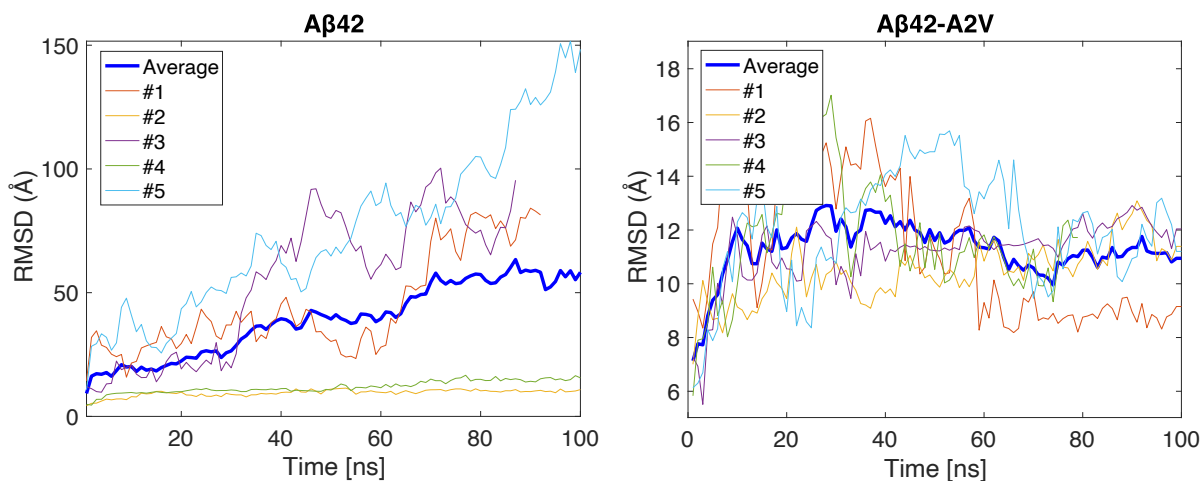


Figura 26 Grafici di RMSD del peptide A β 42 (sinistra) e A β 42-A2V (destra).

Un secondo aspetto molto interessante è legato alla nanoplastica in sé: il PE e il PS rispetto al PET e il PP causano un'instabilità molto maggiore. In generale infatti, le prime due nanoplastiche hanno sempre generato dei valori di RMSD dalle 3 alle 10 volte superiori in tutti i sistemi analizzati, come si può osservare nella Figura 27.

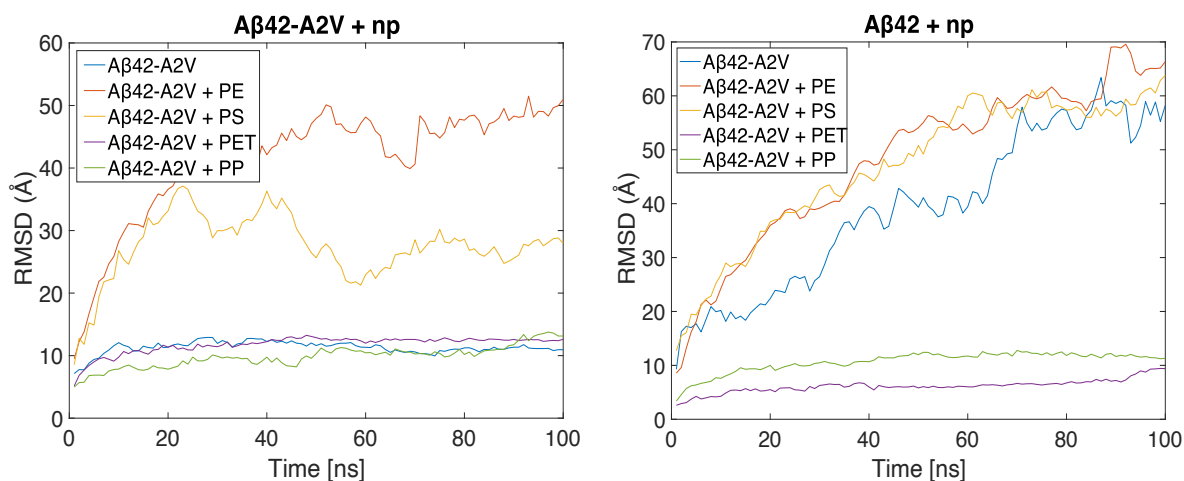


Figura 27 Grafici RMSD in cui viene mostrato il confronto delle interazioni delle diverse nanoplastiche con il peptide A β 42 a sinistra e con il peptide A β 42A-2V a destra.

	PE	PS	PET	PP
Aβ42	8-70	15-65	3-10	3-12
Aβ42-A2V	10-50	10-38	5-13	5-14
5OQV	20-38	5-23	2-3.5	2-3
5OQV-A2V	10-60	5-25	2-3	7-12
Aβ25-42	30-80	15-80	5-9	6-9
5OQV25-42	10-57	10-60	2.5-7	2.5-5
KLVFF	10-70	10-50	3-10	3-20

Tabella 3 Valori minimi e massimi di RMSD osservati nei diversi sistemi.

Tutti i valori riportati in tabella sono in Å.

A seconda della nanoplastica e della proteina analizzata si sono ottenuti dei valori abbastanza differenti, la tabella 3 riassume il massimo e il minimo valore assunto durante l'analisi RMSD.

Come si può vedere i valori più alti si raggiungono sempre con il PE e PS, in particolare la prima sembra essere la plastica che aumenta l'instabilità maggiormente. I valori di PET e PP sono invece molto simili e decisamente più bassi rispetto a quelli ottenuti con le altre due plastiche; in questo caso il PET sembra essere la plastica che genera la più alta stabilità proteica con valori massimi che sono mediamente inferiori rispetto ai minimi del PE e PS.

In riferimento al peptide KLVFF, si può dire che come per tutti gli altri sistemi, è stato maggiormente stabilizzato dal PET e PP rispetto al PS e PE, ma comunque, verso gli ultimi 10 ns, anche con le prime due plastiche, la stabilità stava venendo a meno.

Questo fenomeno è particolarmente interessante se si considera il fatto che in tutte le altre analisi RMSD non succede, all'opposto, come si può vedere nelle immagini precedenti, il valore sembra diminuire. Probabilmente questa

differenza può essere data dalla diversa dimensione del peptide. Inoltre, come ci si poteva immaginare, c'è una notevole differenza nella stabilità del KLVFF, anche in assenza di nanoplastiche, quando parte perfettamente assemblato rispetto a quando al tempo zero presenta una posizione meno organizzata. La Figura 28 mostra questo risultato.

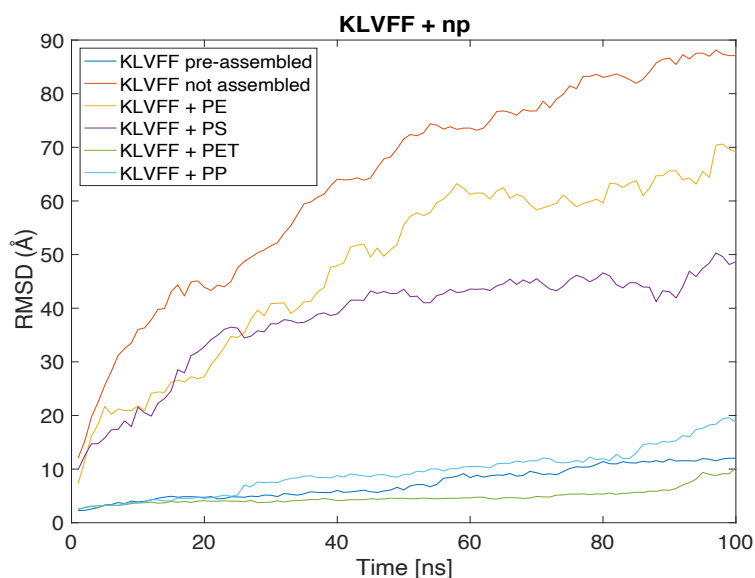


Figura 28 RMSD di confronto delle varie nanoplastiche con il peptide

In conclusione, il polietilene è la plastica che genera i valori più alti, di RMSD tranne nel caso della 5OQV25-42 dove il PS sembra essere più determinante. Inoltre, si può notare velocemente come la A2V sia nella forma peptide che oligomero è decisamente più stabile. Stesso discorso può essere fatto per il KLVFF pre-assemblato rispetto a quello non strutturato.

3.1.2. Percentuale β -sheet

Il calcolo della percentuale di β -sheet ad ogni frame della simulazione (1 frame corrisponde ad un ns), ha la funzione di comprendere l'effettiva capacità da parte delle diverse nanoplastiche di modificare la struttura secondaria delle proteine.

Sono stati analizzati solo i β -sheet in quanto è la struttura principale degli oligomeri e delle fibrille amiloidi. Le analisi sono state fatte sia del singolo peptide, che partiva ogni volta da diverse configurazioni iniziali, sia dello oligomero 5OQV25-42, 5OQV wild type e modificata. È stato però scelto di non proseguire con l'analisi dei peptidi singoli in quanto i tempi di formazione di una struttura secondaria stabile non erano compatibili con i tempi computazionali. La struttura predominante in tutte le simulazioni infatti era il random coil e la percentuale di β -sheet non ha mai superato il 10% come si può vedere in Figura 29.

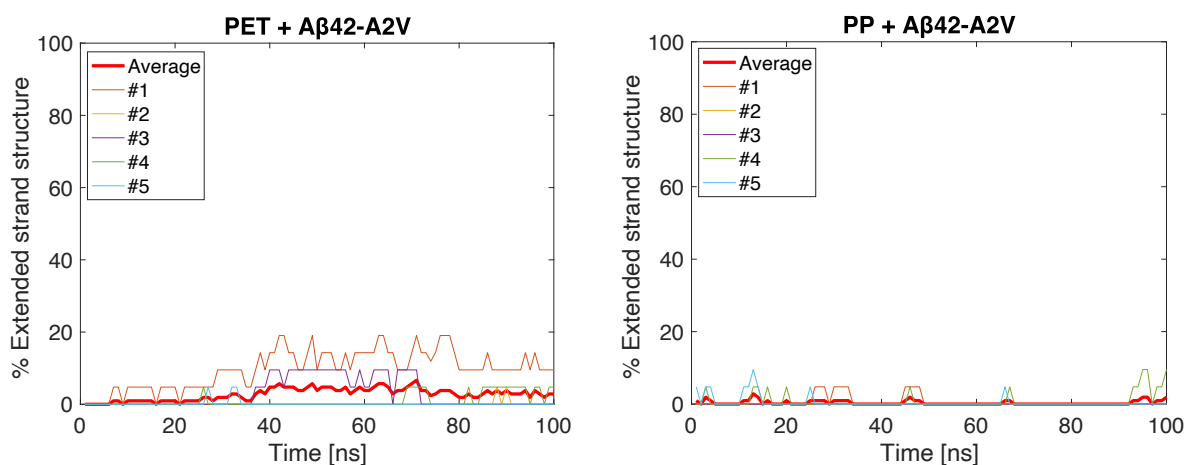


Figura 29 Grafici rappresentati la struttura β -sheet formata e mantenuta nel tempo del peptide $\alpha\beta 42$ -A2V a contatto con la nanoplastica

Per quanto concerne l'oligomero, si è potuto notare il mantenimento costante della struttura, pari a circa 70% nel caso della 5OQV (Figura 30) e 5OQV-A2V; mentre per la versione tagliata 25-42 i valori si conservano per tutta la simulazione a circa il 50/60%. Come si può osservare i valori delle singole

simulazioni non si sono mai discostati di più del 5% dalla loro media garantendo un'alta affidabilità dell'analisi.

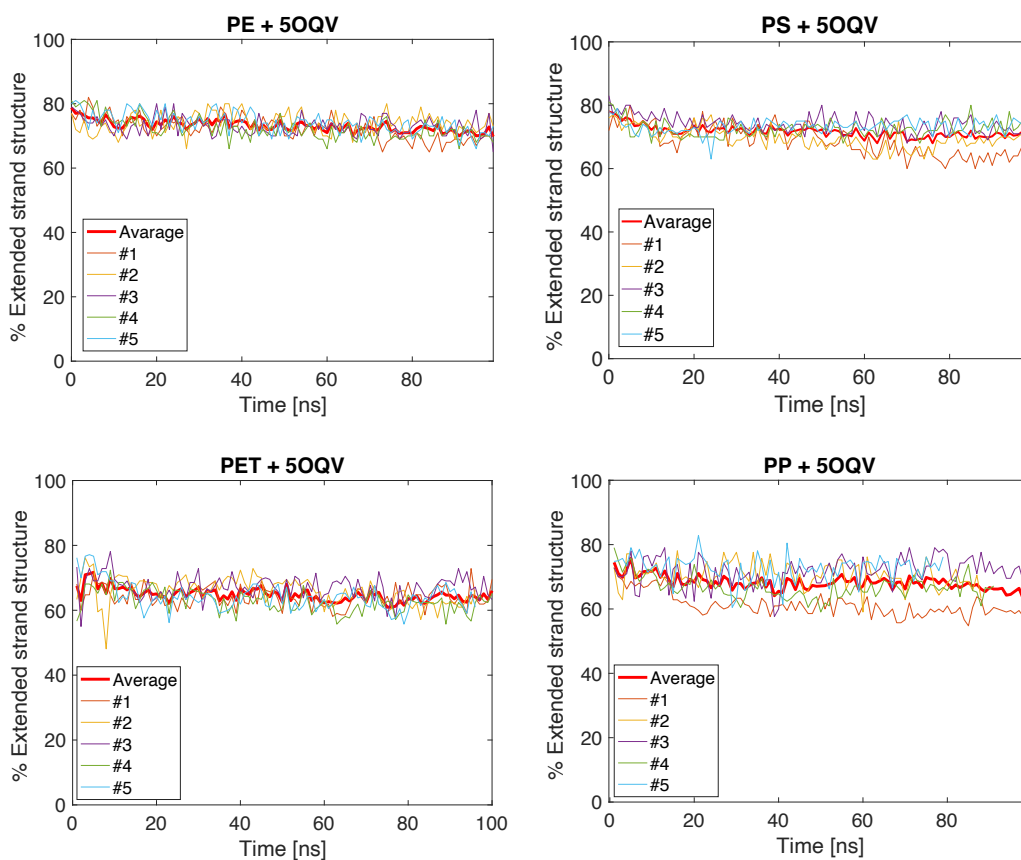


Figura 30 Dall'alto verso il basso vengono riportate le percentuali di struttura β -sheet mantenuta nel tempo della fibrilla 5OQV a contatto con le diverse nanoplastiche.

Relativamente all'oligomero 25-42, il motivo della minore percentuale di β -foglietti, può essere dovuto dal fatto che è una struttura molto più piccola e quindi il peso dei residui in turn è molto maggiore. Nonostante essa sia una fibrilla costituita da circa la metà degli atomi, e quindi teoricamente più influenzabile, mantiene per tutta la durata della simulazione la sua struttura, interagendo ripetutamente con la nanoplastica. Come è successo con la versione semplificata che prendeva in esame il triptophan zipper, la struttura β -sheet risulta altamente stabile, confermando l'alta solidità della fibrilla data dai ponti π (π -bridges) tra le fenilalanine adiacenti (Phe19 e Phe20) e dai ponti salini (salt-bridges) data dagli AA diversamente carichi (4).

3.1.2. Analisi dei contatti

Le simulazioni di dinamica molecolare forniscono uno strumento che consente di studiare i dettagli delle interazioni molecolari, responsabili dell'iniziale formazione dell'oligomero tossico ma anche della stabilizzazione della fibrilla amiloide. L'analisi dei contatti instaurati tra le varie nanoparticelle di plastica e le proteine è stata effettuata con le informazioni, ottenute mediante lo script `Analysis_Contact` (Appendice u), in cui si ottiene un contatto quando la molecola polimerica si trova entro 3 Å dai peptidi per almeno 5 ns. Il file è fondamentalmente costituito da due dati principali:

- 1) Numero di contatti ad ogni nanosecondo;
- 2) Amminoacidi coinvolti nell'interazione.

Per il primo dato (per esempio in Figura 31) è stato trovato il numero di interazioni che si instauravano ad ogni ns di ogni simulazione; è stata presa in considerazione la media delle 5 simulazioni di ogni sistema per determinare quale sia la nanoplastica che interagisce maggiormente con le proteine;

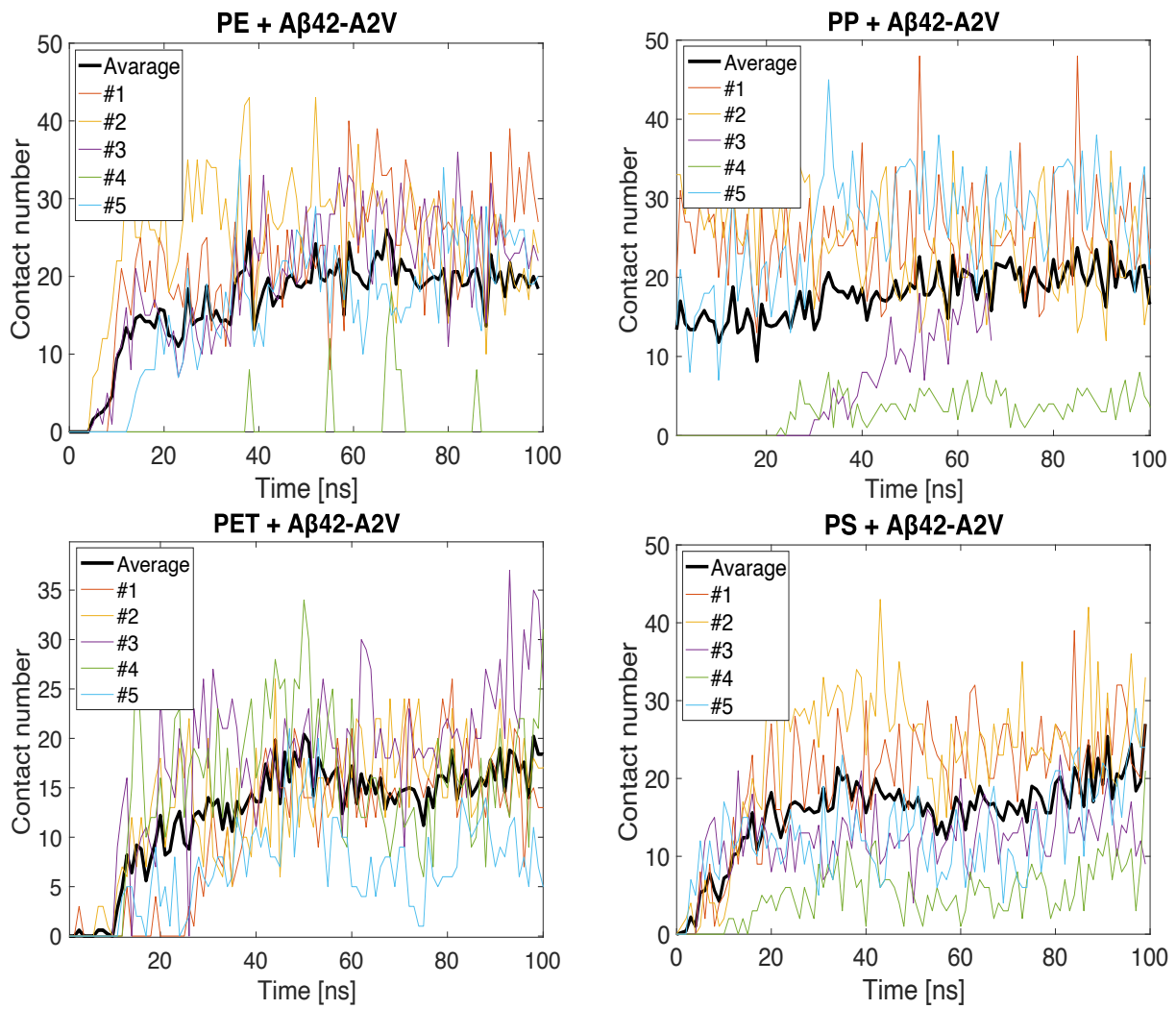


Figura 31 Confronto tra i contatti instaurati tra le varie nanoplastiche e il peptide Aβ42-A2V. Da sinistra verso destra PS e PE (in alto), PET e PP (in basso).

Il dato dei residui coinvolti nelle interazioni invece è stato utilizzato per determinare quanti amminoacidi si legano e quali sono quelli che lo fanno maggiormente come mostrato in figura 32. Sono stati presi in considerazione i residui che determinavano contatti in tutte e cinque le simulazioni per ciascun sistema. È stata fatta eccezione per l'oligomero 5OQV-A2V, per cui si sono presi in considerazione i residui che determinavano contatti in almeno 3 simulazioni in quanto per quattro e cinque simulazioni non si avevano interazioni comuni.

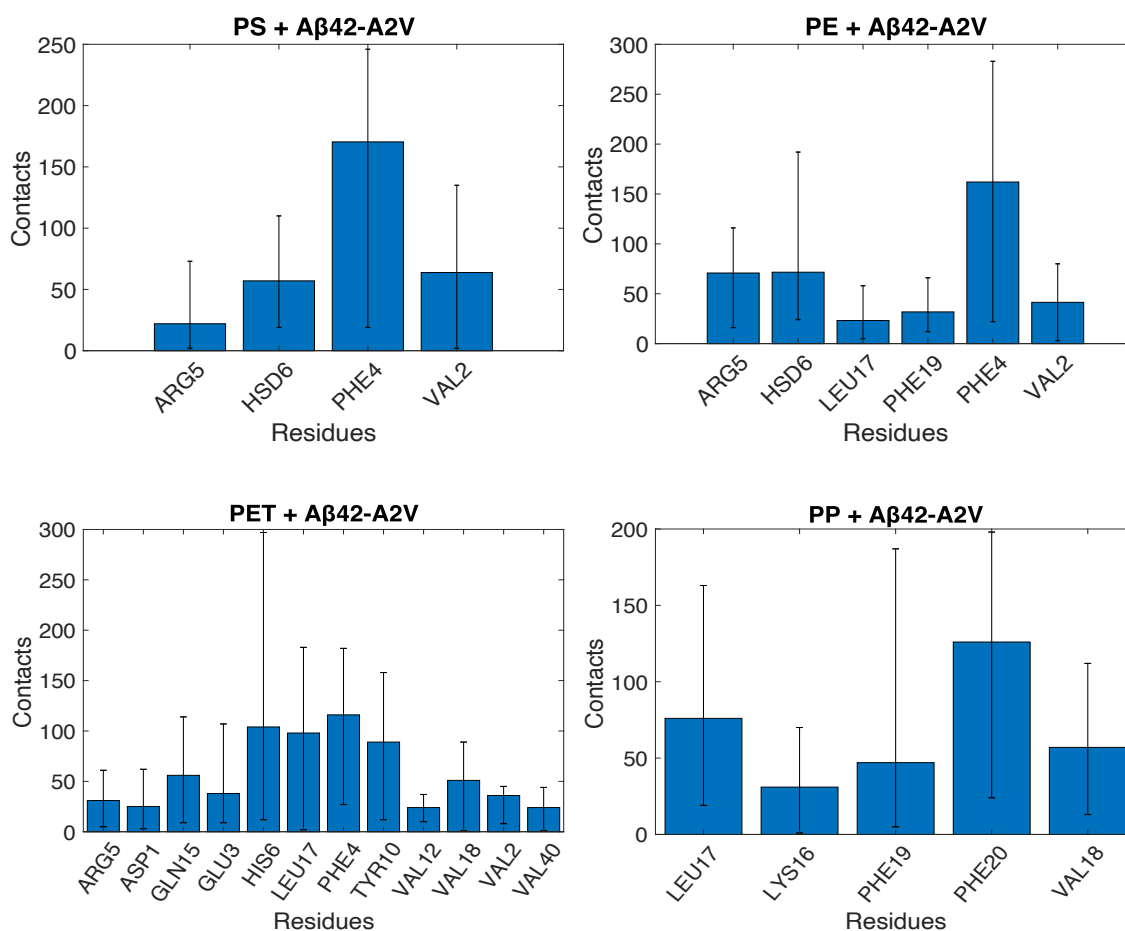


Figura 32 Negli istogrammi è possibile individuare quali siano gli amminoacidi che determinano un maggior numero di contatti per ogni sistema.

Nella tabella 4 sono riportate le interazioni medie e nella tabella 5 i residui che hanno determinato i contatti comuni ad ogni nanoplastica, raggruppati per

posizione sulla catena in modo da poter identificare diverse regioni; da sinistra a destra le regioni sono ordinate per numero di contatti complessivi.

	PE	PS	PET	PP
Aβ42	25/ns	25/ns	7/ns	15/ns
Aβ42- A2V	20/ns	20/ns	13/ns	15/ns
5OQV	10/ns	5/ns	6/ns	3/ns
5OQV-A2V	17/ns	15/ns	10/ns	11/ns
Aβ25-42	35/ns	17/ns	3/ns	10/ns
5OQV25-42	15/ns	10/ns	80/ns	20/ns
KLVFF	20/ns	15/ns	6/ns	12/ns

Tabella 4 Media dei contatti per ciascuna nanoplastica

Come si può osservare in tabella 4, il polietilene e polistirene determinano un numero di legami superiore alle altre nanoplastiche. Unica eccezione viene fatta per le interazioni instaurate tra PET e 5OQV25-42 per cui risulta una media di circa 80 interazioni per nanosecondo.

Le interazioni del PE raggiungono i 35/ns per il peptide A β 25-42 wild type, mentre per le altre rimane nei valori tra 15-20/ns, fino al un minimo di 10 per l'oligomero 5OQV25-42. La nanoplastica con il minore numero di interazioni invece risulta essere il PET, motivo per cui risulta maggiormente strano il valore relativo alla 5OQV25-42.

	Regione 1	Regione 2	Regione 3
Aβ42	Val18 Phe19 Phe20	Ser8	His14
Aβ42-A2V	Val2 Phe4 Arg5 His6	Lys16 Leu17 Val18 Phe19 Phe20	
5OQV	Gly9 Tyr10	Val39	Asp1
5OQV-A2V	Asp1 Val2	Gly38 Val39 Val40 Ile41	Tyr10 Glu11 Val12
Aβ 25-42	Gly25	Met35 Val36 Gly37 Gly38	
5OQV 2542	Val36 Gly37 Gly38 Val 39	Ile31 Gly33 Leu34	
KLVFF	Phe19		

Tabella 5 Regioni e relativi residui che hanno determinato il maggior numero di contatti.

Per quanto riguarda gli amminoacidi di contatto sono state identificate per ciascuna componente proteica almeno due regioni di interazione di circa 4-5 AA, ad eccezione del frammento KLVFF per cui si è scelto di mettere in risalto un solo residuo per cui si hanno maggiori contatti.

Tutte le regioni identificate sono caratterizzate da amminoacidi neutri e non polari con delle eccezioni per le regioni di minor interazione in cui sono state riscontrate interazioni con Ser8 e His14 Asp1 Glu11.

Nel caso dell'oligomero 5OQV, il PET è stata l'unica nanoplastica che ha riportato contatti comuni (al netto delle 5 simulazioni) con Asp7 e Ser9, mentre, per il PP

non si è indentificata nessuna regione comune nelle diverse simulazioni. Situazione analoga viene riportata per il PS e il PP per cui non si è riusciti ad identificare regioni di contatto con l'oligomero 5OQV-A2V. Per quest'ultima componente proteica le regioni 1 e 2 della tabella sono relative al PE, e la regione 3 per il solo PET. Tale risultato risulta essere inatteso in quanto, essendo la valina più idrofobica dell'alanina, era dato presunto che l'oligomero mutato instaurasse più contatti nella regione N terminale.

Si possono quindi identificare tre regioni (Figura 33):

1. Gly9 Tyr10;
2. Val18 Phe19 Phe20;
3. Gly38, Val39, Val40, Ile41 e Ala42.

I segmenti individuati sono caratterizzati da AA idrofobici. Essendo questi circondanti anche da residui polari è possibile che le interazioni tra la nanoplastica e questi ultimi possano essere indotti dalla vicinanza con le regioni identificate.

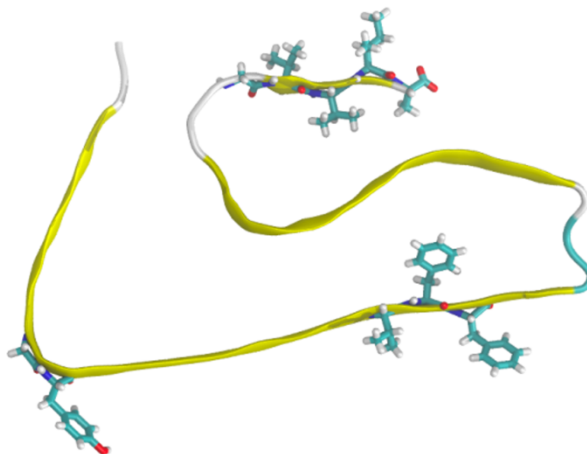


Figura 33 Identificazione delle tre principali regioni identificate: a sinistra la regione 1 con Gly9, Tyr10, al centro la regione 2 con Val18, Phe19, Phe20 e a destra la regione 3 con Gly38, Val39, Val40,

Sulla base di quanto riconosciuto in questa prima parte del capitolo si può affermare che l'interazione stabilizzante tra la nanoplastica e le proteine beta amiloidi è il legame idrofobico.

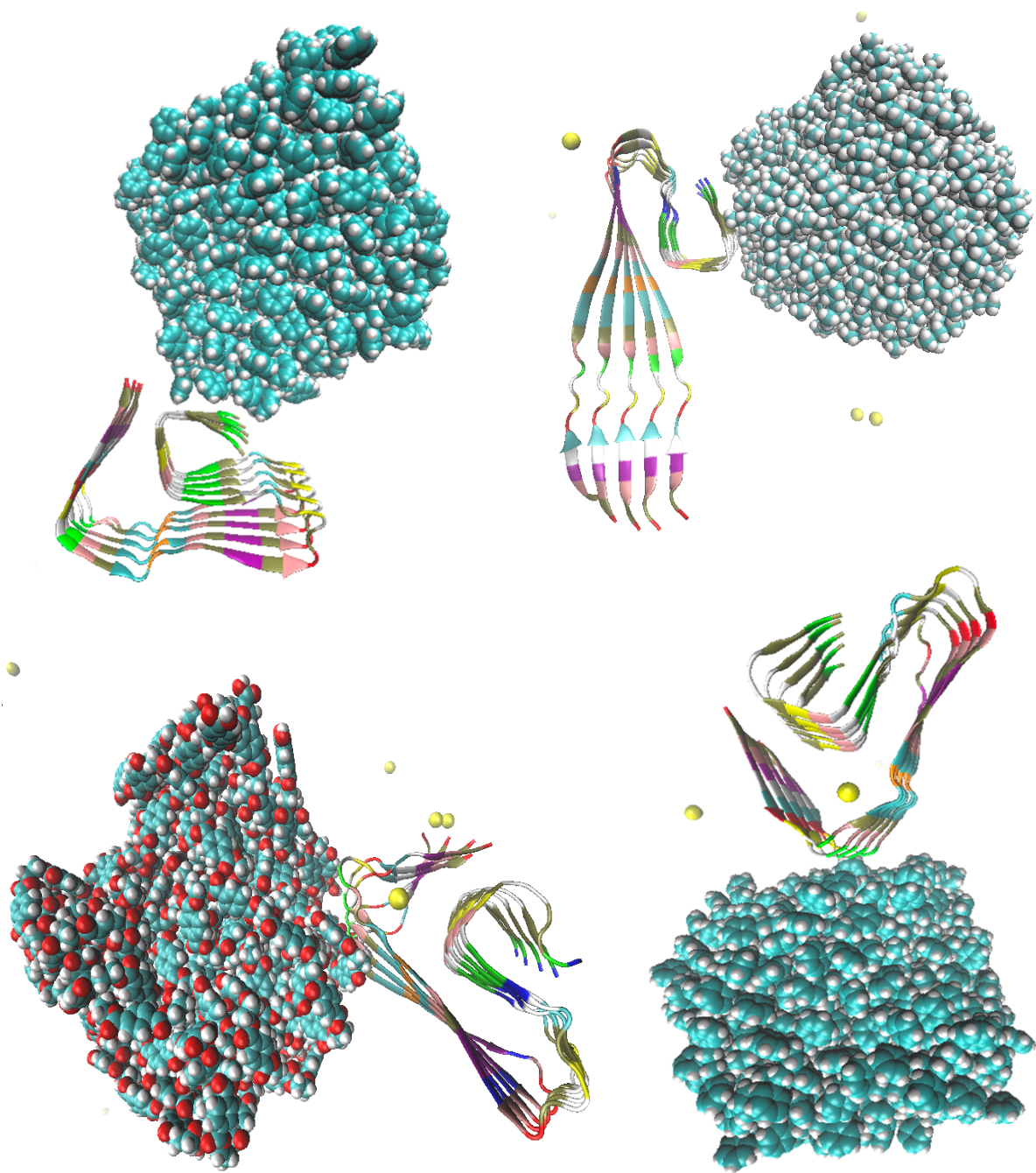


Figura 34 Nelle immagini vengono mostrate le nanoplastiche che interagiscono con le diverse regioni individuate. In alto a sinistra è rappresentato il PP, in alto a destra il PE, in basso a sinistra il PET e in basso a destra il PS.

3.2. Analisi *in vitro*

Le analisi *in vitro* sono state svolte presso il Dipartimento di Ricerca Biochimica e Farmacologia molecolare dell'Istituto di ricerche farmacologiche Mario Negri.

Per semplicità nell'esposizione dei risultati vengono utilizzate le seguenti sigle semplificative:

- PS_{50}^n = polistirene con diametro di 50 nm con carica neutra
- PS_{50}^+ = polistirene con diametro di 50 nm e funzionalizzato con carica positiva
- PS_{50}^- = polistirene con diametro di 50 nm e funzionalizzato con carica negativa
- PS_{100}^+ = polistirene con diametro di 100 nm e funzionalizzato con carica positiva
- PS_{100}^- = polistirene con diametro di 100 nm e funzionalizzato con carica negativa

3.2.1. Saggio TioflavinaT (ThT)

Il saggio con Tioflavina T sfrutta la capacità della Tioflavina di intercalarsi alle strutture amiloidi aumentando il suo picco di fluorescenza alla lunghezza di eccitazione di 450nm e di emissione a 482nm.

L'analisi delle diverse soluzioni di A β 25-42 a nanoplastiche è stata portata avanti per 120 h e i risultati sono gli spettri riportati in Figura 35. La lettura della fluorescenza è stata effettuata in piastra su spettrofotometro Tecan, a 37°C sotto agitazione. Come si può vedere si hanno dei valori di fluorescenza basali (solo nanoparticelle), molto variabili. Le nanoplastiche grandi hanno portato a dei segnali più intensi nel caso delle nanoparticelle cariche, sia positive che negative, ma paragonabili alle NP neutre piccole. In particolare, le nanoparticelle grandi positive hanno dato dei valori più alti di quelli delle PS_{50}^- , mentre quelle grandi negative erano comunque più basse. Nella Figura 35 inoltre, tutti gli spettri sono in riferimento alle nanoparticelle diluite 1:1000 V/V.

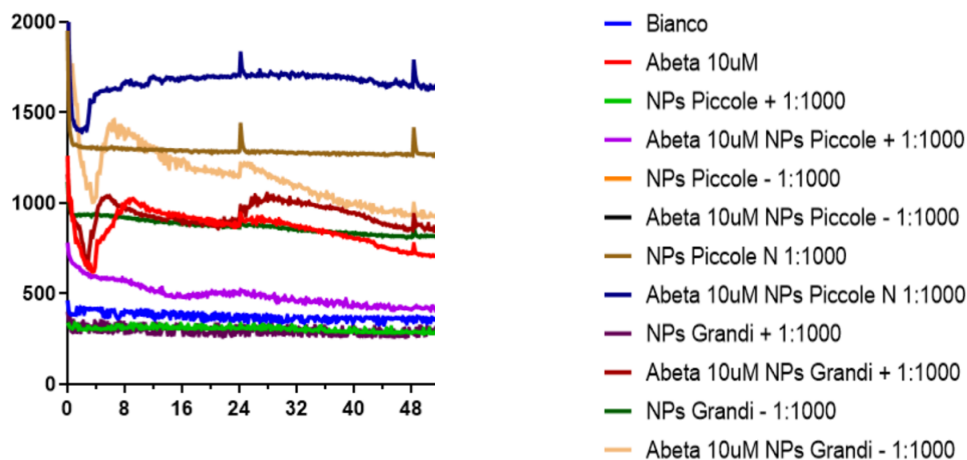


Figura 35 Spettri del saggio con ThT

La Figura 36, invece, deriva dalla normalizzazione dei controlli di quella precedente.

In questo caso si può osservare, in particolare per le PS_{50}^- , una curva negativa che è di difficile interpretazione in quanto il suo valore negativo indica una maggior

fluorescenza alla lunghezza d'onda della Tioflavina delle nanoplastiche da sole rispetto alla corrispettiva mix. In ogni caso è osservabile, in senso assoluto, una cinetica in cui il segnale fra le 6h e le 24h aumenta come nelle altre condizioni.

Si è pensato che la carica potesse inficiare sulla misura, probabilmente a causa di interazioni non del tutto comprese. In questa figura risulta inoltre più chiaro la differenza nel segnale data dalle diverse grandezze.

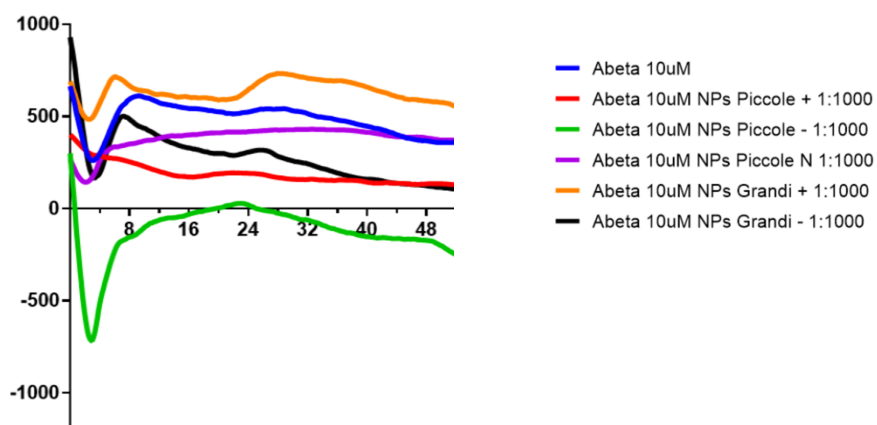


Figura 36 Spettri normalizzati del saggio con ThT

3.2.2. Dicroismo Circolare

L'analisi con il dicroismo circolare ha permesso lo studio delle strutture secondarie dei peptidi A β 25-42 in assenza e presenza delle nanoplastiche. Per questa indagine è stato possibile effettuare una singola scansione a lettura o farne molteplici e mediarle per avere un segnale più pulito; nel presente lavoro, ogni spettro ottenuto è una media di 30 letture, definite accumuli. Le letture sono state fatte a 0, 24, 48 e 120 ore alla temperatura controllata di 22°C (Figura 37). L'incubazione dei diversi tempi è avvenuta in parallelo alle letture per la ThT, quindi in piastra, nella quale dei pozzetti sono stati dedicati alle soluzioni che sono state utilizzate per le analisi di dicroismo circolare e di AFM. Questi campioni sono stati incubati alla concentrazione di A β 25-42 100 μ M e non è stata aggiunta ThT. L'incubazione è avvenuta a 37°C sotto agitazione. Le tipologie di campioni analizzati sono due: una soluzione contenente i soli peptidi A β 25-42 e una in presenza anche delle nanoparticelle di PS.

Gli spettri della sola A β 25-42 hanno mostrato già al t=0 h una componente β - sheet, com'è possibile osservare dal picco negativo intorno a 220nm, oltre alla componente random coil rappresentata dal picco negativo al di sotto dei 200nm. Le successive analisi non hanno mostrato una progressione particolarmente evidente della strutturazione. I campioni contenenti anche le nanoplastiche sono stati di più difficile interpretazione poiché alcune nanoplastiche di controllo hanno dato spettri decisamente disturbati, che una volta sottratti allo spettro del mix hanno dato curve non ritenute attendibili. Più nel dettaglio le mix con le PS $_{50}^-$ e le PS $_{100}^+$, non hanno dato spettri utilizzabili. Invece è interessante notare come la mix con +50 ha prodotto uno spettro particolarmente vicino al random coil con la predominanza di un picco negativo all'altezza dei 200nm. Invece il mix contenente le -100 sembra particolarmente strutturato, con un caratteristico picco positivo a 200nm e uno negativo intorno a 220nm.

Va ricordato che quando si effettua questo tipo di analisi si deve anche considerare che le curve sono il risultato di ciò che la luce dello strumento riesce a leggere e non è da escludere che possano essersi formati degli aggregati che precipitano e si depositano sul fondo della cuvetta. Un esempio che indica la

precipitazione del campione è l'abbassamento del segnale. Se questo mantiene lo stesso andamento ma è più basso, si può dedurre che una parte della proteina, che prima contribuiva a quel segnale, è precipitata e non viene più letta dallo strumento. In teoria, effettuando 30 scansioni del campione con solo PS e ottenendo un bianco attendibile, quello che si vede nelle curve proposte dovrebbe essere il solo contributo della proteina.

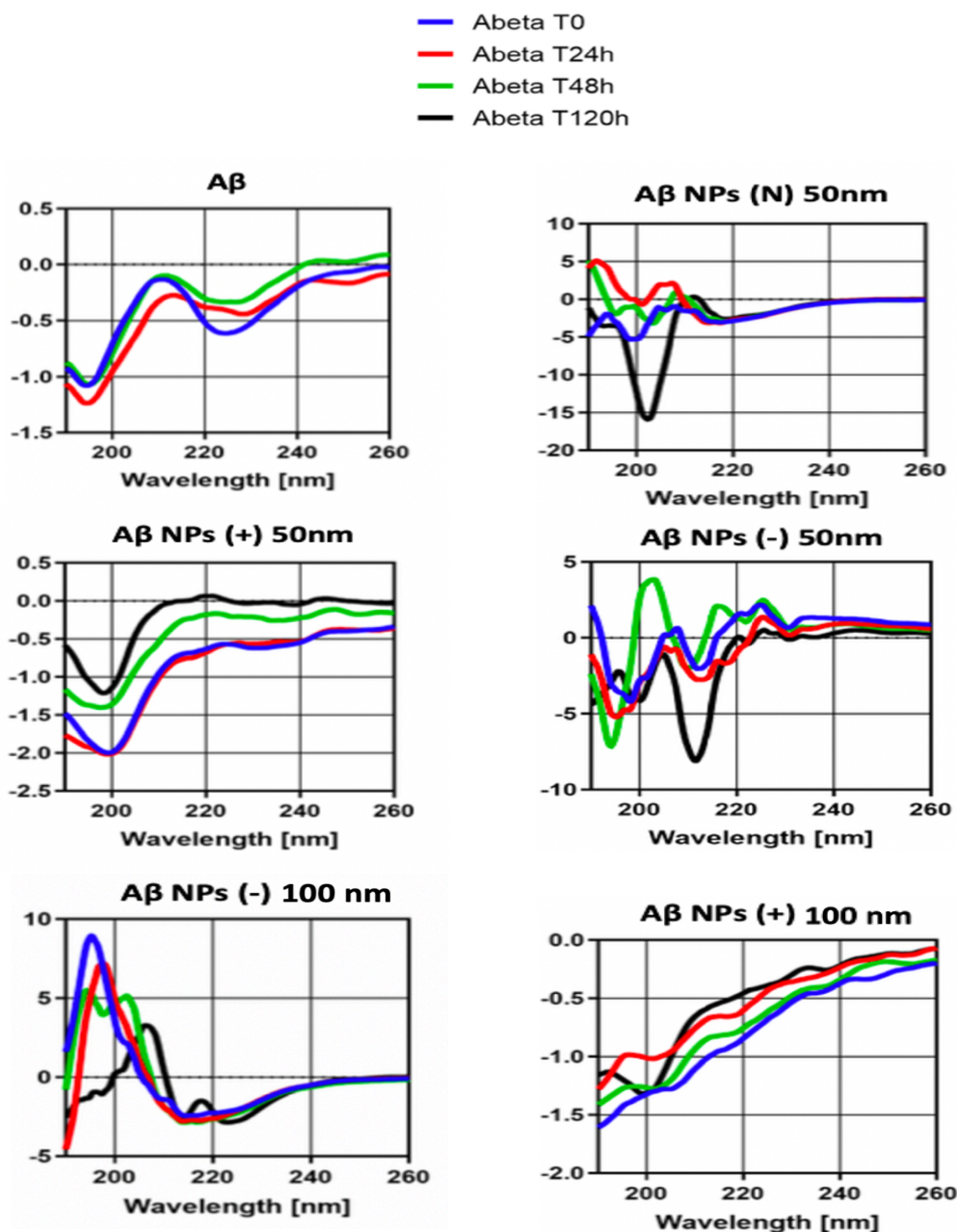


Figura 37 Spettri ottenuti mediante analisi di dicroismo circolare.

3.2.3. AFM

L'analisi al microscopio a forza atomica è stato un metodo d'indagine fondamentale in quanto ha permesso di vedere effettivamente la non formazione di fibrille amiloidi. Quest'ultime non formandosi in tutte le condizioni, hanno aperto un punto cruciale nel quale sono nate diverse ipotesi che verranno poi discusse in seguito.

In primo luogo, nelle immagini (Figura 38) si possono notare immediatamente delle differenze di materiale depositato sulla mica. Ricordando che la preparazione del campione avviene in ambiente acido, che si è visto per favorire l'adesione delle fibre, si può supporre che la carica delle nanoplastiche possa essere stata un fattore di variabilità aggiuntivo, interferendo sulla capacità di contatto con il substrato.

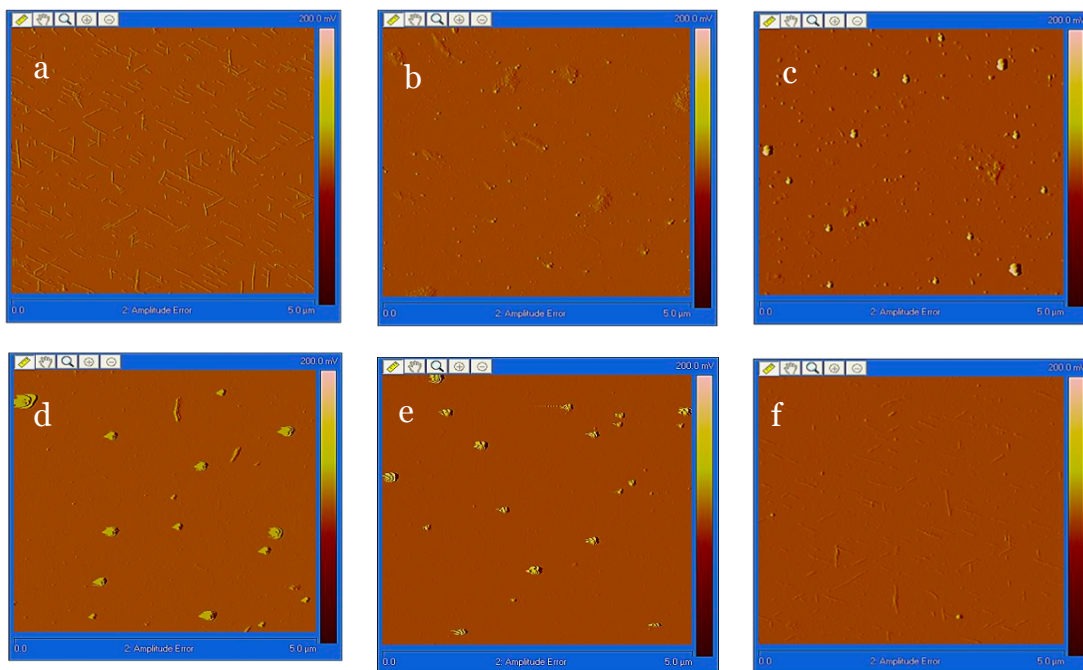


Figura 38 Acquisizioni di AFM al tempo $t=0$ dei campioni:

- a) $A\beta_{25-42}$
- b) $A\beta_{25-42} + PS_{50}^+$
- c) $A\beta_{25-42} + PS_{100}^+$
- d) $A\beta_{25-42} + PS_{100}^n$
- e) $A\beta_{25-42} + PS_{50}^-$
- f) $A\beta_{25-42} + PS_{50}^+$

Come già mostrato dalle analisi di dicroismo circolare questa preparazione di A β 25-42 presenta già una strutturazione al tempo t=0 h, non partendo da una condizione di totale random coil e questo viene confermato dalla struttura morfologica osservabile con le analisi di AFM.

Nel campione di PS_{50}^+ si può osservare, invece, del materiale senza la presenza di fibrille strutturate; nonostante il fondo della mica non sia perfettamente pulito non si osservano aggregati. Le stesse considerazioni si possono fare per i campioni di PS_{50}^n e PS_{100}^+ .

Diversamente, per campioni al tempo t=0 del PS caricato negativamente di entrambe le grandezze, si possono osservare fibre particolarmente corte; nel caso del PS_{50}^- si osservano poche e piccole strutture fibrillari, mentre per il PS_{100}^- è presente un tappeto di fibre leggermente meno concentrato rispetto al campione di sola A β .

I campioni al tempo t=48 h (Figura 39) riprendono i tempi zero, differendo per il fatto che il fondo della mica è più pulito. Unica eccezione è per il PS_{100}^+ per cui, nel campione delle 48 h, si osservano delle formazioni strutturate numerose in quantità ma di dimensioni ridotte.

Per tutti i campioni ad esclusione di quelli del controllo, nelle acquisizioni al tempo t=0 è possibile osservare la presenza di accumuli di materiale: numerosi e di dimensioni ridotte nel caso di PS_{50}^- , PS_{50}^n e PS_{100}^+ , di dimensioni maggiori e ridotti in numero per il PS_{50}^+ . Nel caso di PS_{50}^n è presente un tappeto uniforme di strutture con dimensioni simili.

Le striature che si osservano in alcuni agglomerati sono da considerarsi artefatti della tecnica in quanto alcuni aggregati risultano essere di un'altezza tale per cui la punta dell'AFM non riesce a salire determinando lo spostamento del materiale.

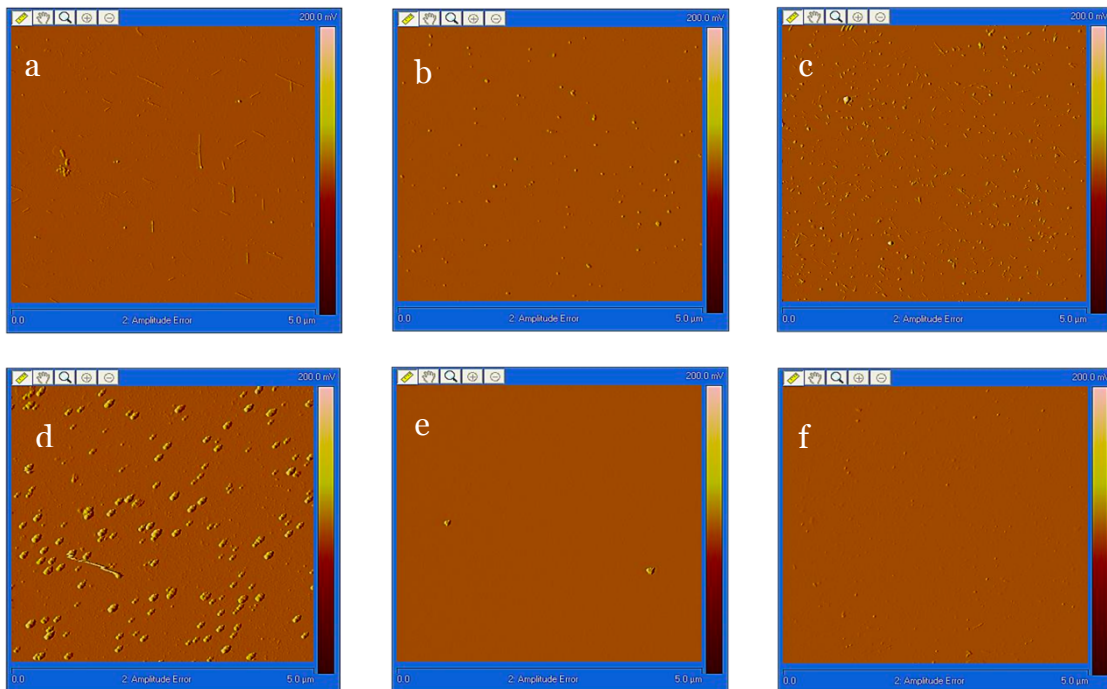


Figura 39 Acquisizioni di AFM al tempo $t=48$ h dei campioni:

- a) $A\beta_{25-42}$
- b) $A\beta_{25-42} + PS_{50}^+$
- c) $A\beta_{25-42} + PS_{100}^+$
- d) $A\beta_{25-42} + PS_{100}^n$
- e) $A\beta_{25-42} + PS_{50}^-$
- f) $A\beta_{25-42} + PS_{50}^+$

Discussione

Dalle analisi *in silico* relative al RMSD, si è osservato un comportamento molto diverso tra le nanoplastiche che possono essere suddivise in due gruppi in base a come le proteine vengono stabilizzate:

- 1) PE e PS rendono più instabili le proteine;
- 2) PET e PP stabilizzano le proteine.

In riferimento al PET e il PP, questa evidenza può essere allarmante se, come nel caso della A2V, viene determinata una situazione di maggior permanenza nella fase oligomerica, aumentando così la tossicità. Nonostante tutte le nanoplastiche analizzate abbiamo un alto grado di idrofobicità molto simile, ci sono diversi studi che analizzano la loro diversa risposta con molecole organiche di natura idrofobica (3). Questi diversi comportamenti nanoplastica-specifici potrebbero motivare il perché i peptidi rispondono in modo diverso in sistemi che differiscono solo per la plastica.

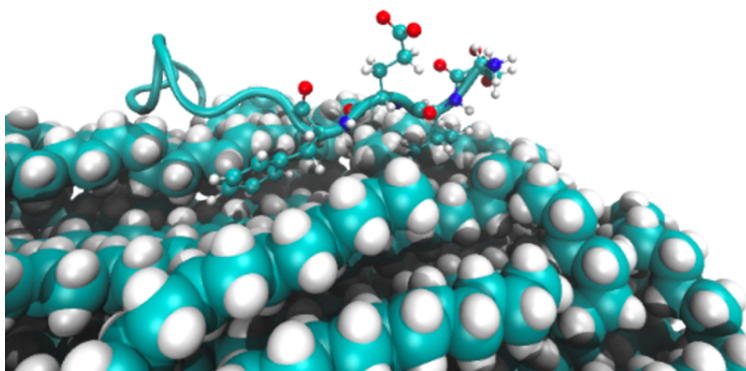


Figura 40 Nell'immagine viene mostrato il contatto tra Phe4 Arg5 His6 e il polietilene; in particolare si vuole far notare come l'anello della fenilalanina si intercala tra le catene del polimero.

Per quanto riguarda più in generale le simulazioni si può affermare che apparentemente, gli amminoacidi con catene laterali apolari, come la fenilalanina, tendono ad adsorbirsi sulla superficie delle nanoplastiche. Questa interazione è così forte che le nanoplastiche determinano contatti con quasi tutti gli amminoacidi di questo tipo presenti nel peptide: la catena laterale idrofobica

punta alla superficie della particella polimerica altrettanto idrofoba, mentre i gruppi amino e carbossilico degli amminoacidi sono rivolti verso la soluzione acquosa. La natura idrofobica delle nanoparticelle e l'interazione con i frammenti proteici determinano l'adesione di questi ultimi sulla superficie inducendo una condizione che potrebbe essere lo step iniziale di una protein corona (Figura 41) creando quindi una maschera di biomolecole che possono modificare la loro solubilità e il loro comportamento di aggregazione. Pertanto, è probabile che le nanoplastiche vengano incorporate e possano interferire con le strutture a livello molecolare, inducendo alterazioni funzionalmente cruciali.

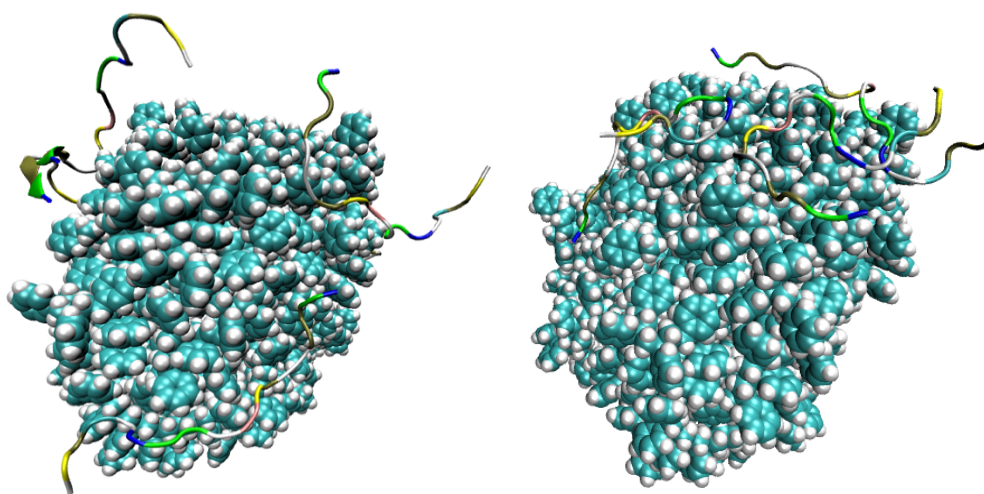


Figura 41 Le proteine in soluzione vengono attratte dalla nanoplastica rimanendo adese alla superficie per tutta la durata della simulazione.

Dall'analisi *in vitro*, in particolare dai risultati dell'AFM, si può affermare che la presenza delle nanoplastiche non aumenti la fibrillogenesi delle beta amiloidi ma che conduca a due possibili scenari:

- 1) La nanoplastica sequestra le fibre dalla soluzione, ricoprendosi in superficie senza indurre una struttura definita;
- 2) La nanoplastica è in grado di spezzare le fibrille in soluzione e rilasciare in soluzione gli oligomeri.

Inoltre, l'interazione che determina un "sequestro" dei peptidi in soluzione risulta essere carica dipendente.

Il punto due è chiaramente il più critico, in quanto, allo stato attuale delle conoscenze è nota l'alta stabilità delle fibrille; se questa dovesse essere compromessa dalla presenza delle nanoplastiche si potrebbe ottenere una situazione di permanenza degli oligomeri tossici. Nel morbo di Alzheimer, tale fenomeno potrebbe portare ad una situazione più acuta della malattia stessa.

Alla luce dei risultati sopra riportati, è stato scelto di svolgere 5 simulazioni con un sistema composta da una fibrilla e una nanoparticella di poliestere per capire se effettivamente la nanoplastica ha la capacità di sfibrare una struttura organizzata (Figura 42).

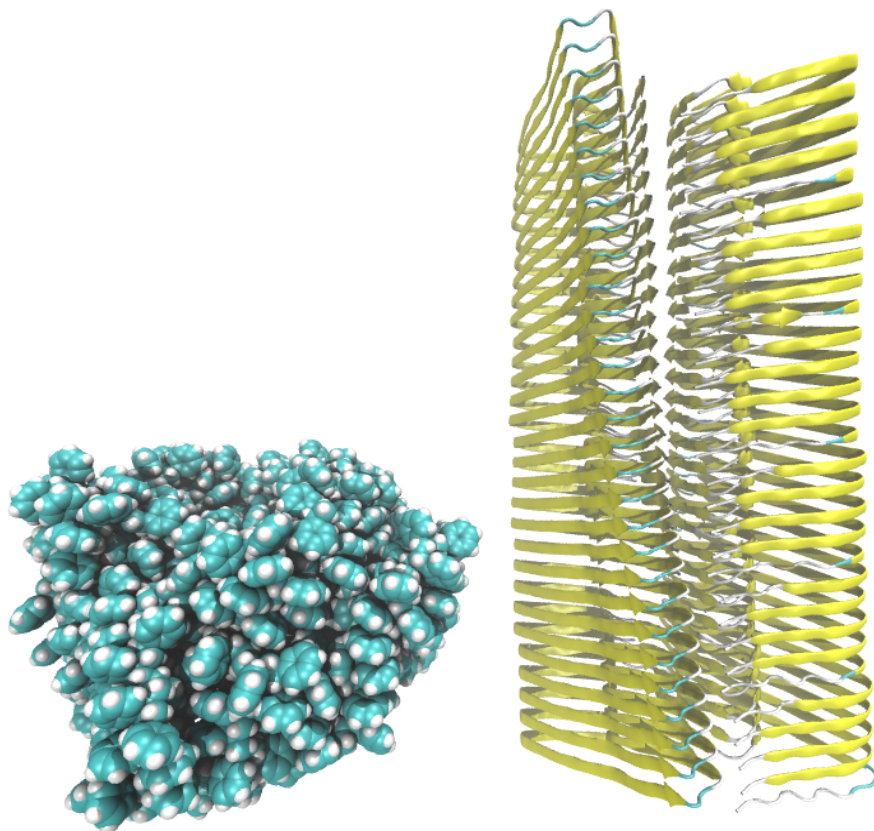


Figura 42 Sistema iniziale del polistirene in presenza della fibrilla costruita su base dell'oligomero 5OQV

In questo caso, viene dato in input una struttura fibrillare costituita da 30 copie di peptidi, per un totale 38700 atomi per la sola componente proteica. Per la nanoplastica è stata usata la molecola utilizzata in precedenza.

In questo caso, il numero di atomi risulta essere notevole e in una prima fase è stato deciso di svolgere la dinamica molecolare in ambiente implicito per abbreviare i tempi computazionali. Purtroppo, l'oligomero 5OQV su cui si è stata costruita la fibrilla non si è rivelato stabile ed idoneo per il solvente implicito; pertanto le simulazioni sono state svolte in ambiente acquoso ionizzato esplicito determinando la necessità di tempi maggiori.

Ad oggi, il sistema è stato analizzato per 50 ns e in questo breve intervallo di tempo non si è potuta osservare alcuna interazione tra le due componenti e variazioni della struttura secondaria della componente proteica.

In parallelo alle simulazioni di dinamica computazionale, al Dipartimento di Ricerca Biochimica e Farmacologia molecolare dell'Istituto di ricerche farmacologiche Mario Negri si ipotizza di procedere con l'indagine mediante l'utilizzo di microscopia elettronica.

Bibliografia

1. **R.C. Thompson, C.J. Moore, F.S. vom Saal, S.H. Swan.** *Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends.* *Philos. Trans. R. Soc. B*, 364 (2009), pp. 2153-2166.
2. **Atsuhiko Isobe, Kaori Uchiyama-Matsumoto, Keiichi Uchida, Tadashi Tokai.** *Microplastics in the Southern Ocean.* *Science Direct.* 2017.
3. **BERGMANN, Melanie, GUTOW, Lars e KLAGES, Michael.** *Marine anthropogenic litter.* s.l. : Springer Nature, 2015.
4. *Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea.* **ERIKSEN, Marcus, et al.** 9.12: e111913., s.l. : PloS one, 2014.
5. **SILVA, Ana L. Patrício, et al.** *Increased plastic pollution due to COVID-19 pandemic: Challenges and recommendations.* *Chemical Engineering Journal.* 2020, 126683.
6. **Shim, Won Joon, Hong, Sang Hee e Eo, Soeun Eo.** s.l. : *The Royal Society of Chemistry*, 2017. 10.1039/C6AY02558G.
7. *A catchment-scale perspective of plastic pollution.* **WINDSOR, Fredric M., et al.** 25.4: 1207-1221. , s.l. : *Global change biology*, 2019.
8. **L.Andrady, Author links open overlay panel Anthony.** *Microplastics in the marine environment.* 2011.
9. **YONG, Cheryl Qian Ying, VALIYAVEETILL, Suresh e TANG, Bor Luen.** *Toxicity of microplastics and Nanoplastics in mammalian systems.* *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2020, 17.5: 1509.
10. **BARRÍA, Camila, et al.** *Effect of nanoplastics on fish health and performance: A review.* *Marine Pollution Bulletin.* 2020, 151: 110791.
11. **SHEN, Maocai, et al.** *Micro (nano) plastics: Unignorable vectors for organisms.* *Marine pollution bulletin.* 2019, 139: 328-331.

12. **ARIAS-ANDRES, Maria, et al.** Microplastic pollution increases gene exchange in aquatic ecosystems. *Environmental Pollution*. 2018, 237: 253-261.
13. Influence of nanoplastic surface charge on eco-corona formation, aggregation and toxicity to freshwater zooplankton. **SAAVEDRA, Juan, STOLL, Serge e SLAVEYKOVA, Vera I.** 2019, *Environmental pollution*, p. 252: 715-722.
14. Micro-and Nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A Review. . **BANERJEE, Amrita e SHELVER, Weilin L.** 2020, *Science of The Total Environment*, p. 142518.
15. Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. **Amanda L. Dawson, So Kawaguchi, Catherine K. King, Kathy A. Townsend, Robert King, Wilhelmina M. Huston & Susan M. Bengtson Nash.** 1001, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03465-9>.
16. **Jiana Lia, b, Christopher Greenc , Alan Reynoldsd , Huahong Shia 6 , Jeanette M. Rotchellb, 7.** Human Health and Emerging Environmental Contaminants. *Environmental Pollution*. 241:35-44, 0.1016/j.envpol.2018.05.038.
17. **Cheryl Qian Ying Yong 1, Suresh Valiyaveetill 2 and Bor Luen Tang.** Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health* . 2020.
18. **iu Z, Jiao Y, Chen Q, Li Y, Tian J, Huang Y, Cai M, Wu D, Zhao Y.** Two sigma and two mu class genes of glutathione S-transferase in the waterflea *Daphnia pulex*: Molecular characterization and transcriptional response to nanoplastic exposure. *Chemosphere*. 2020, Vol. 248:126065, 10.1016/j.chemosphere.2020.126065.
19. **HOLLÓCZKI, Oldamur e GEHRKE, Sascha.** Can nanoplastics alter cell membranes? *ChemPhysChem*. 2020, 21.1: 9-12.
20. **BERG, Niels van den, et al.** Longevity around the turn of the 20th Century: life-long sustained survival advantage for parents of today's

nonagenarians. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2018, 73.10: 1295-1302.

21. *Invecchiamento cerebrale, demenze e Malattia di Alzheimer. Una guida informativa per familiari e gli operatori con l'elenco delle Unità Valutative Alzheimer (UVA)*. **Carbone, G.** Milano : Angeli, 2007.

22. *Malattia di Alzheimer e stile di vita. Proposta per un possibile intervento terapeutico in chiave adleriana*. **Maestroni, Paola**. 69: 63-87, s.l. : *Rivista di Psicologia Individuale*, 2011.

23. *Is brain amyloid production a cause or a result of dementia of the Alzheimer's type?* **Struble RG, Ala T, Patrylo PR, Brewer GJ, Yan XX**. 2010, Vol. 393-9. 10.3233/JAD-2010-100846..

24. *Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease*. **Selkoe, Dennis J**. 399.6738: A23-A31, s.l. : *Nature*, 1999.

25. **Small, S.A. and K. Duff**. *Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis*. *Neuron*. 2008, p. p. 534-42.

26. **BarbaraBorronia, ChiaraAgostia, Elena Marcello, Monica Di Luca, Alessandro Padovania**. *Blood cell markers in Alzheimer Disease: Amyloid Precursor Protein form ratio in platelets*. *Exp Gerontol*. 2010, p. p. 53-6.

27. **Bennett, D.A.,.** *Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies*. *Neurology*. 2006, p. p. 1837-44.

28. **Aizenstein, H.J.** *Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly*. *Archives of neurology*. *Archives of neurology*. 2008, p. p. 1509-17.

29. **Bird, T.D.** *Genetic aspects of Alzheimer disease*. *Genet Med*. 2008, p. 10(4): p. 231- 9.

30. **Musiek, E.S. and D.M. Holtzman.** *Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'.* *Nature neuroscience.* 2015, p. 18(6): p. 800-6.
31. **M.Mandelkow, J.Biernat, G.Drewes, N.Gustke, B.Trinczek E.Mandelkow,.** *Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules.* *Neurobiology of Aging.* 1995, p. Pages 355-362 .
32. **Xiaoguang Du, Xinyi Wang & Meiyu Geng.** *Alzheimer's disease hypothesis and related therapies.* *Translational neurodegeneration.* 2018, p. <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0107-y>.
33. **CAMERON, Brent e LANDRETH, Gary E.** *Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease.* *Neurobiology of disease.* 37:3: 503-509., 2010.
34. **Arosio, M. Casati E. Ferri C. Gussago P. Mazzola C. Abbate G. Bellelli D. Mari M. Cesari B.** *Increased expression of TREM2 in peripheral cells from mild cognitive impairment patients that progress into Alzheimer's disease.* *European journal of neurology.* 2018 , p. <https://doi.org/10.1111/ene.13583>.
35. **Aaron M Swomley, D Allan Butterfield.** *Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics.* *Archives of toxicology,.* 2015, p. DOI: 10.1007/s00204-015-1556-z.
36. **Anna Maria Giudetti, Michel Salzet, and Tommaso Cassano.** *Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases.* 2018.
37. **Banks, W.A.** *The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation.* . 2015, p. p. 1-8.
38. **Collins, S.M., M. Surette, and P. Bercik,.** *he interplay between the intestinal microbiota and the brain.* *Nature reviews.* 2012, p. 10(11): p. 735-42.

39. *Microplastics in seafood and the implications for human health.* **Smith, Madeleine, et al.** 5.3: 375-386, s.l. : *Current environmental health reports*, 2018.
40. *Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran Daphnia magna Straus.* **Martins, Alexandra e Guilhermino, Lúcia.** 631: 421-428, s.l. : *Science of The Total Environment*, 2018.
41. **Karin Mattsson^{1, 2}, Elyse V. Johnson³, Anders Malmendal, Sara Linse, Lars-Anders Hansson & Tommy Cedervall.** *Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain . Scientific Reports.* 2017.
42. *Occupational Styrene Exposure and Risk of Encephalopathy and Unspecified Dementia: A Long-Term Follow-Up Study of Workers of the Reinforced Plastics Industry.* **IVERSEN, Inge Brosbøl, et al.** s.l. : *American Journal of Epidemiology*, 2020.
43. *Polystyrene nanoplastic induces ROS production and affects the MAPK-HIF-1/NFκB-mediated antioxidant system in Daphnia pulex.* **LIU, Zhiquan, et al.** 105420, s.l. : *Aquatic Toxicology*, 2020, Vol. 220.
44. **KIROUAC, Lisa, et al.** *Activation of Ras-ERK signaling and GSK-3 by amyloid precursor protein and amyloid beta facilitates neurodegeneration in Alzheimer's disease.* s.l. : *Eneuro*, 2017. 4,2.
45. *Polystyrene (nano) microplastics cause size-dependent neurotoxicity, oxidative damage and other adverse effects in Caenorhabditis elegans.* **LEI, Lili, et al.** 2009-2020, s.l. : *Environmental Science: Nano*, 2018, Vol. 5.8.
46. **LI, Yanfang, et al.** *Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer's disease.* s.l. : *Frontiers in aging neuroscience*, 2016. 8: 31..
47. *The GABAergic system as a therapeutic target for Alzheimer's disease.* **CALVO-FLORES GUZMÁN, Beatriz, et al.** 649-669, s.l. : *Journal of neurochemistry*, 2018, Vol. 146.6.

48. *Nanoplastics can change the secondary structure of proteins.* **HOLLÓCZKI, Oldamur e GEHRKE, Sascha.** 1-7, s.l. : Scientific reports, 2019, Vol. 9.1.
49. *A ubiquitin ligase-associated chaperone holdase maintains polypeptides in soluble states for proteasome degradation.* **WANG, Qiuyan, et al.** 42.6: 758-770., s.l. : Molecular cell,, 2011.
50. *Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation.* **KOPITO, Ron R.** 10.12: 524-530., s.l. : Trends in cell biology, 2000.
51. **SANTA-MARIA, Ismael, et al.** *Paired helical filaments from Alzheimer disease brain induce intracellular accumulation of Tau protein in aggresomes.* *Journal of Biological Chemistry.* 2012, 287.24: 20522-20533.
52. *Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically effects corona composition.* **WINZEN, Svenja, et al.** 7.7: 2992-3001., s.l. : Nanoscale, 2015.
53. **Shinji Kihara, Nadine J. van der Heijden, Chris K. Seal, Jitendra P. Mata, Andrew E. Whitten, Ingo Köper, and Duncan J. McGillivray.** *Bioconjugate Chemistry.* 2019 , p. 30 (4), 1067-1076.
54. **Vertegel AA, Siegel RW, Dordick JS.** *Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme.* *Langmuir.* 2004 Aug , Vol. 20(16):6800-7.
55. **Yan Li, Jae-Seung Lee.** *settings Open AccessReview Insights into Characterization Methods and Biomedical Applications of Nanoparticle–Protein Corona.* 2020.
56. **ROTH, Charles M., NEAL, Brian L. e LENHOFF, Abraham M.** *Van der Waals interactions involving proteins.* *Biophysical journal.* 1996, p. 70.2: 977-987.
57. **PRIVALOV, Peter L. e GILL, Stanley J.** *Stability of protein structure and hydrophobic interaction.* *Advances in protein chemistry.* 1988, p. 191-234.

58. **Laura Colombo, Alessio Gamba, Laura Cantù, Mario Salmona, Fabrizio Tagliavini, Valeria Rondelli, Elena Del Favero, Paola Brocca.** Pathogenic A β A2V versus protective A β A2T mutation: Early stage aggregation and membrane interaction. *Biophysical Chemistry*. 2017, Vol. 229, p:11-18 .
59. **Bortolini, C., Klausen, L. H., Hoffmann, S. V., Jones, N. C., Saadeh, D., Wang, Z., Knowles, T., & Dong, M.** Rapid Growth of Acetylated A β (16-20) into Macroscopic Crystals. *Macroscopic Crystals. ACS nano*,. 2018, Vol. 12(6), 5408–5416.
60. **Tonellato, Mauro.** Sintesi di Peptidi. [Online]
https://www.pianetachimica.it/didattica/documenti/sintesi_peptidi_fase_solida.pdf.
61. **GREENFIELD, Norma J.** Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*. 2006, 1.6: 2876.
62. **XUE, Christine, et al.** Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society open science*. 2017, 4.1: 160696.
63. **Krebs MRH, Bromley EHC, Donald AM.** The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.* 2015, 149, 30–37.
64. **Hollóczki, O., & Gehrke, S.** Nanoplastics can change the secondary structure of proteins. *Scientific reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52495-w>, 2019, Vol. 9(1), 16013.
65. **MURRAY, Brian, et al.** A2T and A2V A β peptides exhibit different aggregation kinetics, primary nucleation, morphology, structure, and LTP inhibition. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2016, 84.4: 488-500.
66. **MAKIN, O. Sumner, et al.** Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005, 102.2: 315-320.

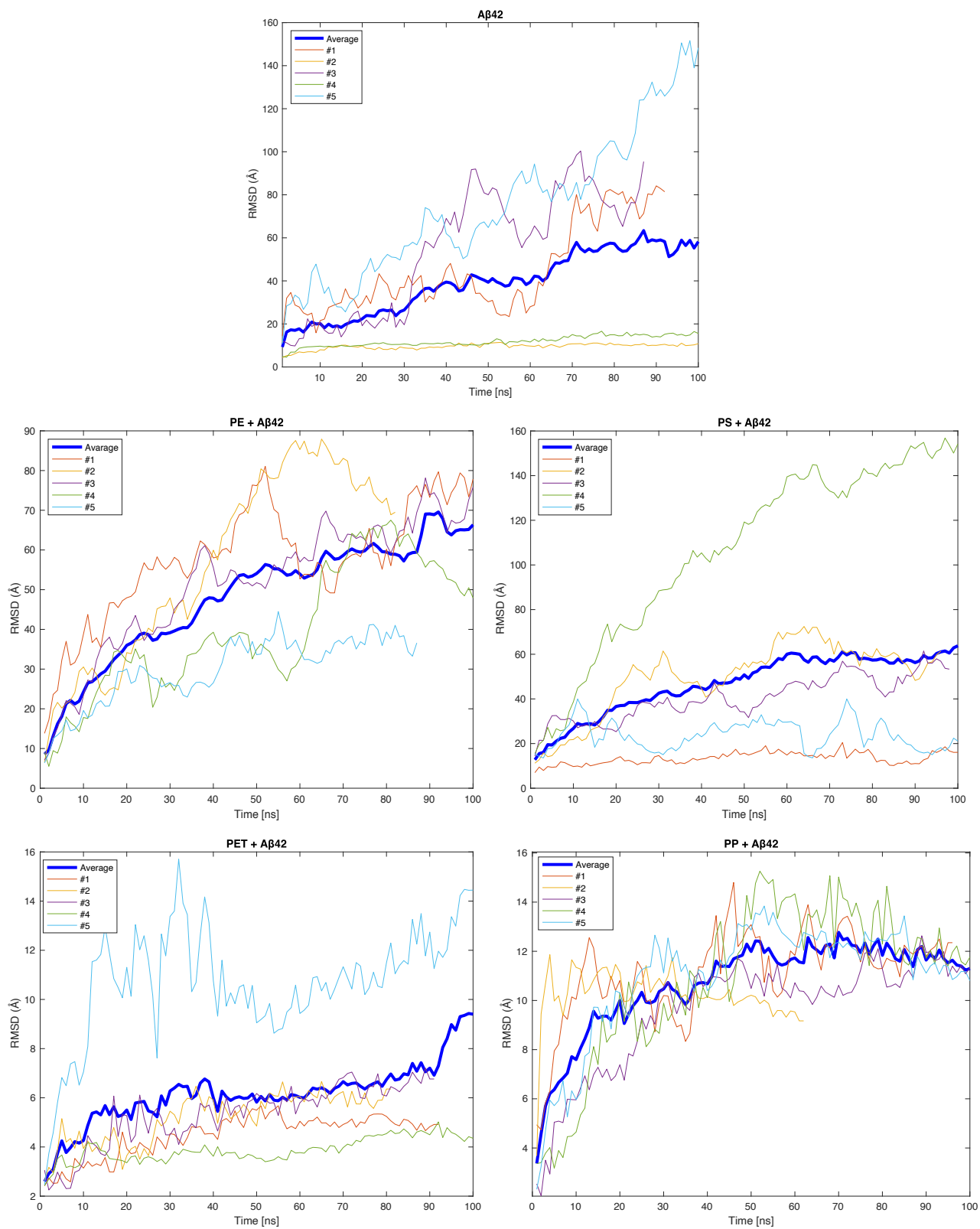
67. **BOCHICCHIO, D., et al.** *Interaction of hydrophobic polymers with model lipid bilayers.* *Scientific reports.* 2017, Vol. 7.1: 1-9.

68. **Illinois University.** *VMD - Visual Molecular Dynamics.* [Online]
<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>.

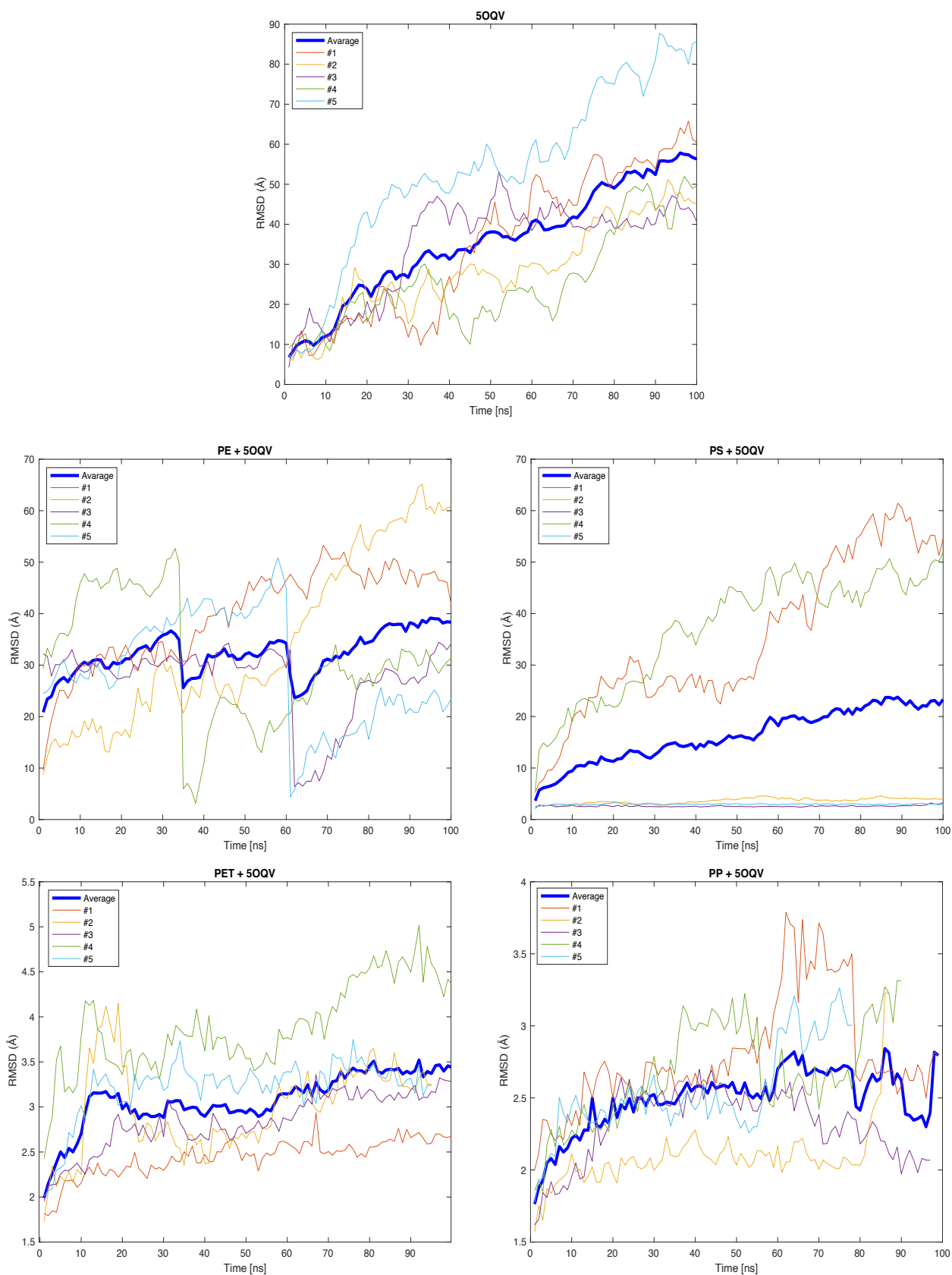
69. **CAMERON, Brent e LANDRETH, Gary E.** *Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease.* . *Neurobiology of disease.* 2010, p. 37.3: 503-509.

APPENDICE

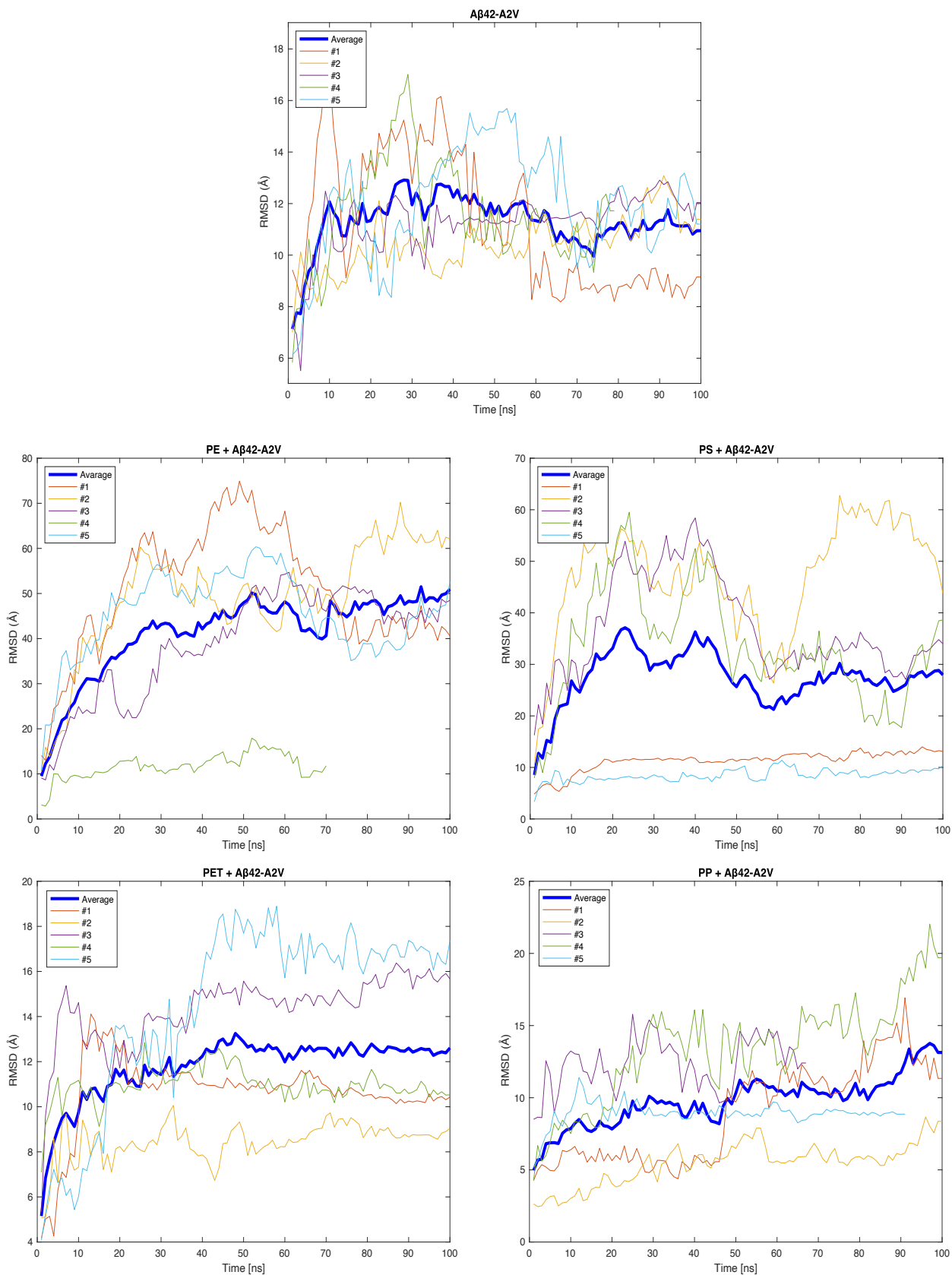
a) Confronto delle interazioni tra il peptide A β 42 e le nanoplastiche



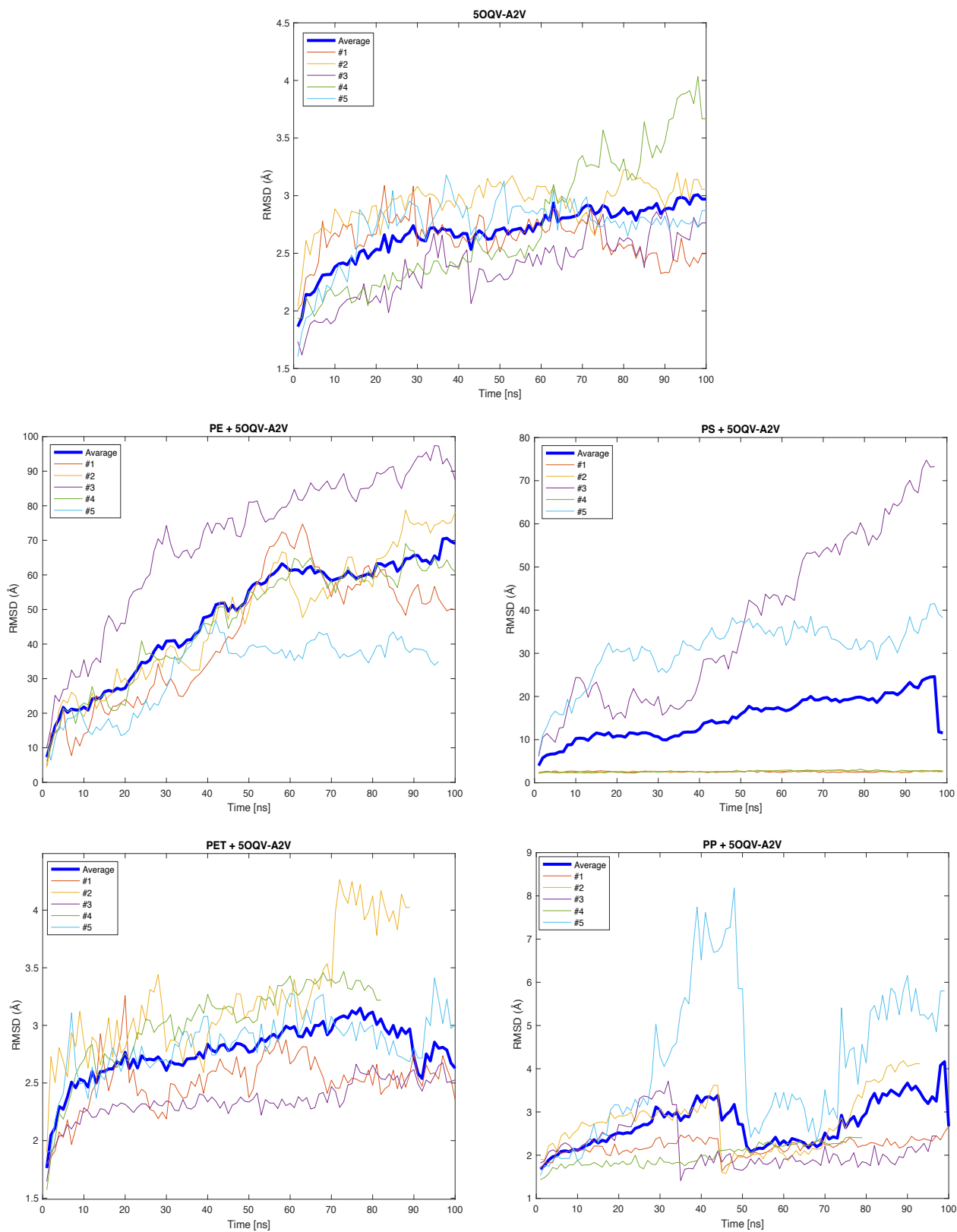
b) Confronto delle interazioni tra l'oligomero 5OQV e le nanoplastiche



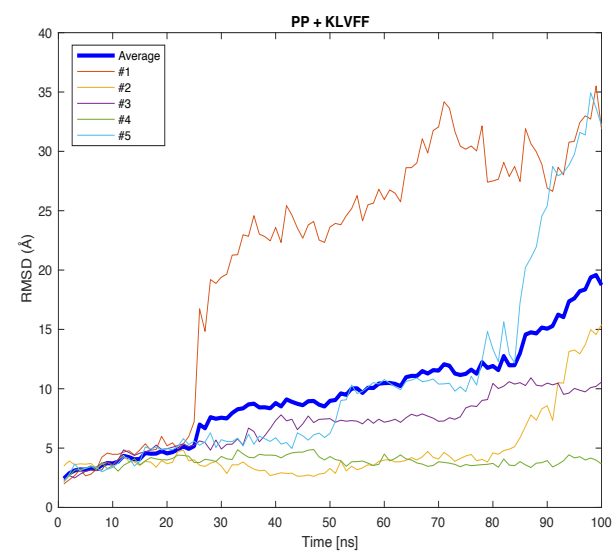
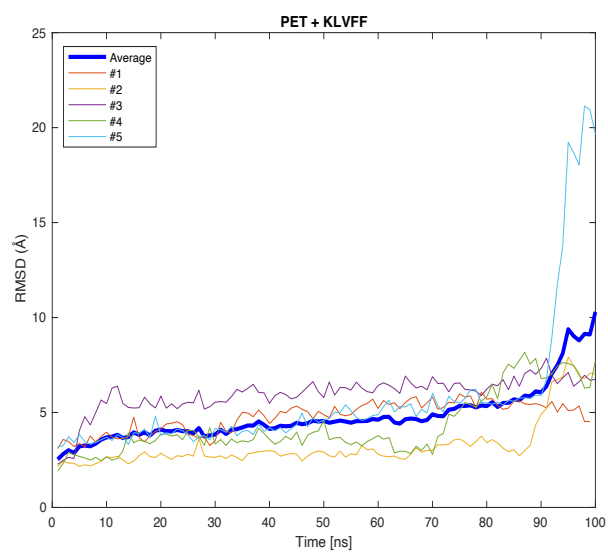
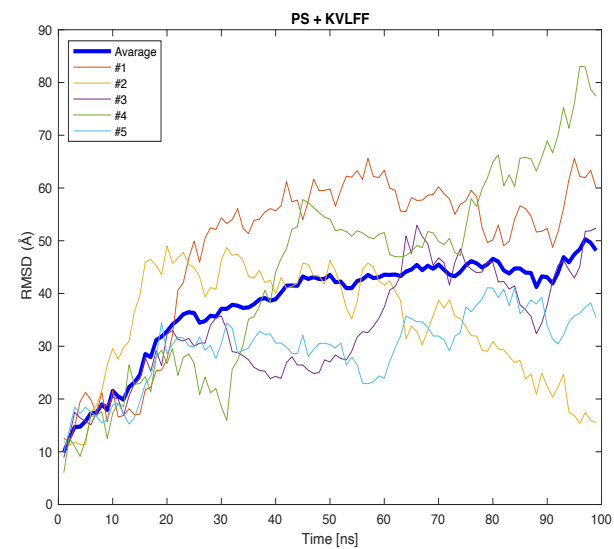
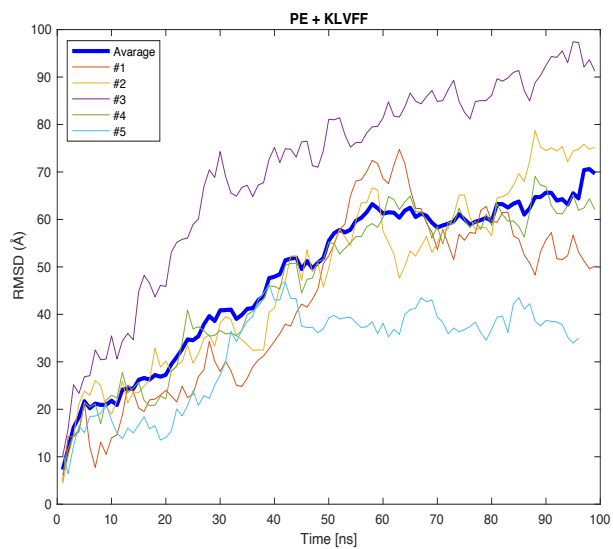
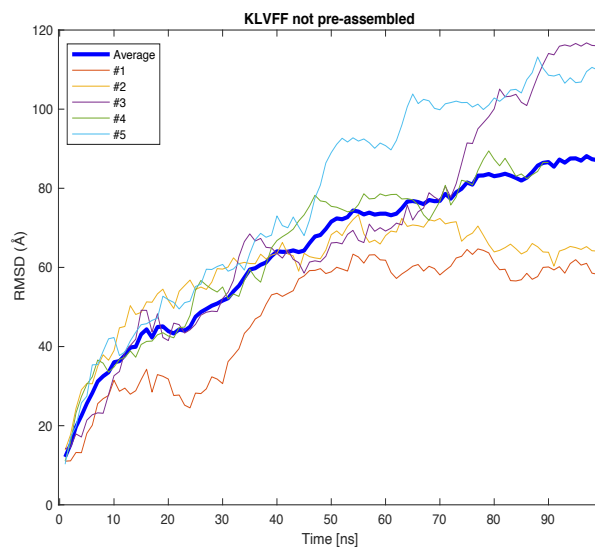
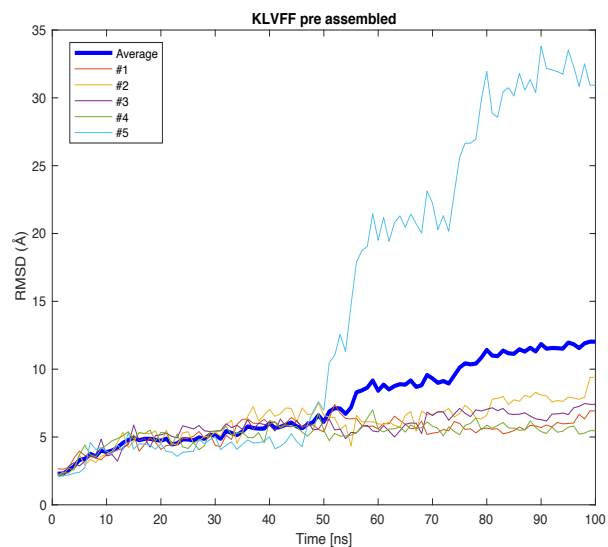
c) Confronto delle interazioni tra il peptide A β 42-A2V e le nanoplastiche



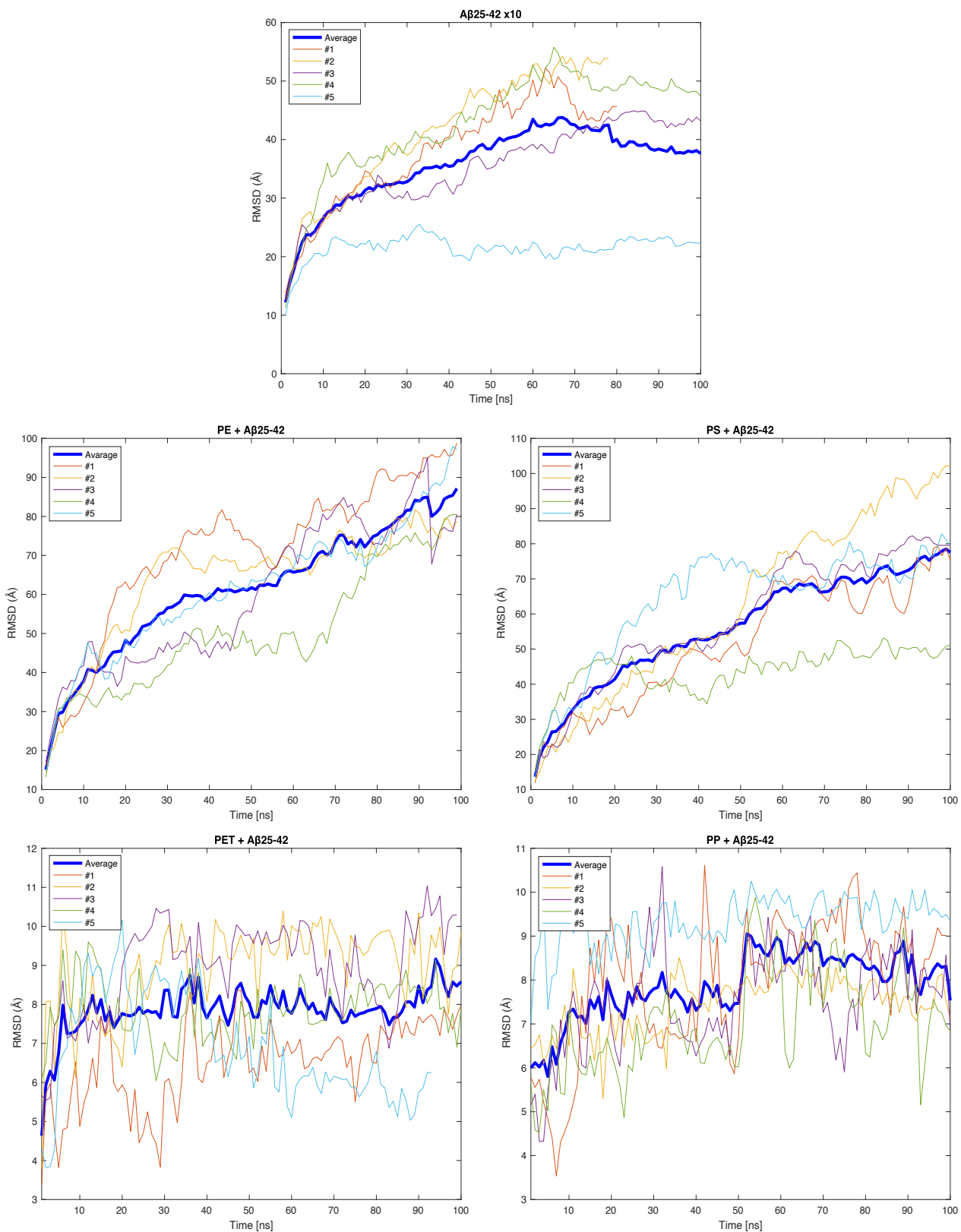
d) Confronto delle interazioni tra l'oligomero 5OQV-A2V e le nanoplastiche



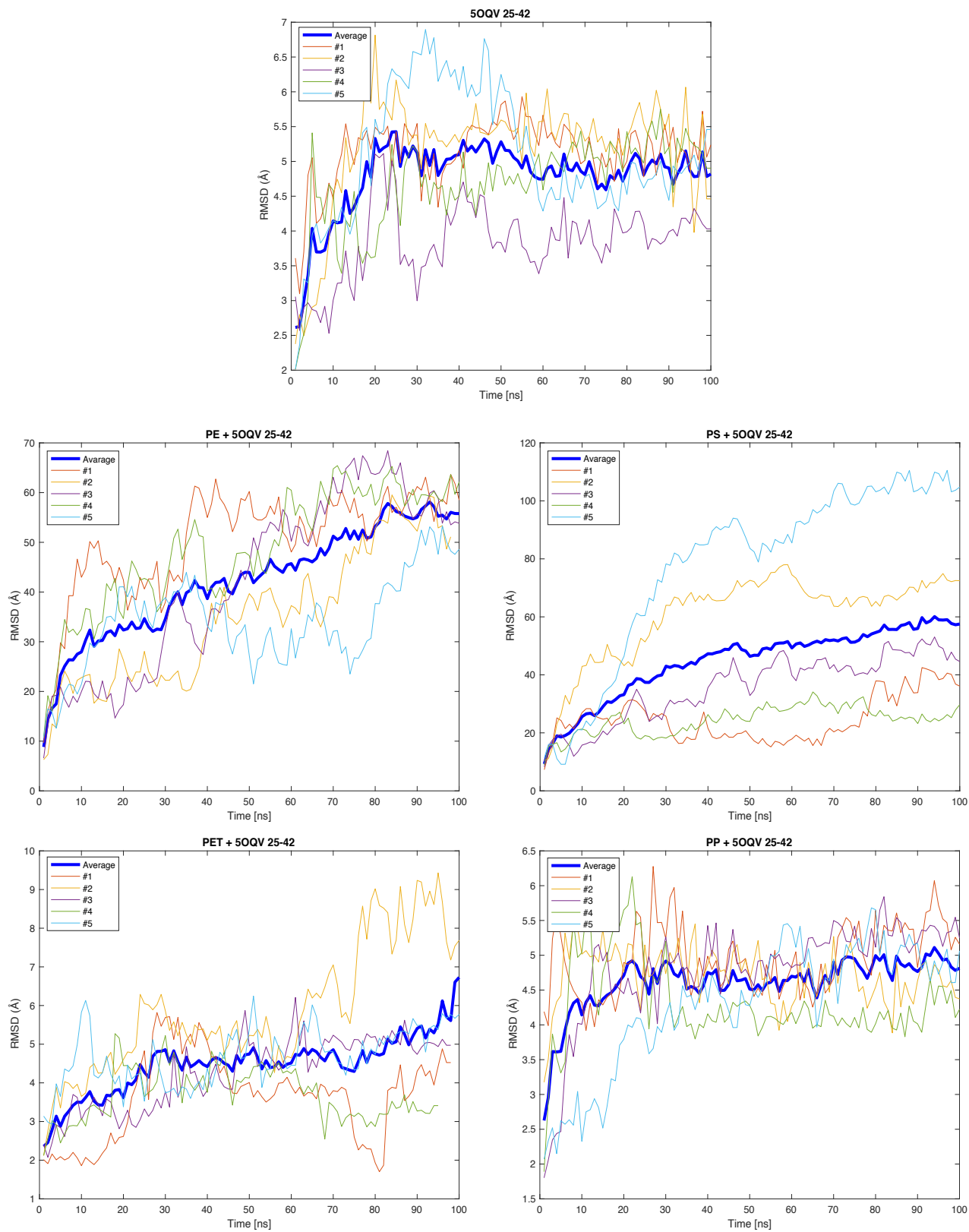
e) Confronto delle varie nanoplastiche sul peptide KLVFF



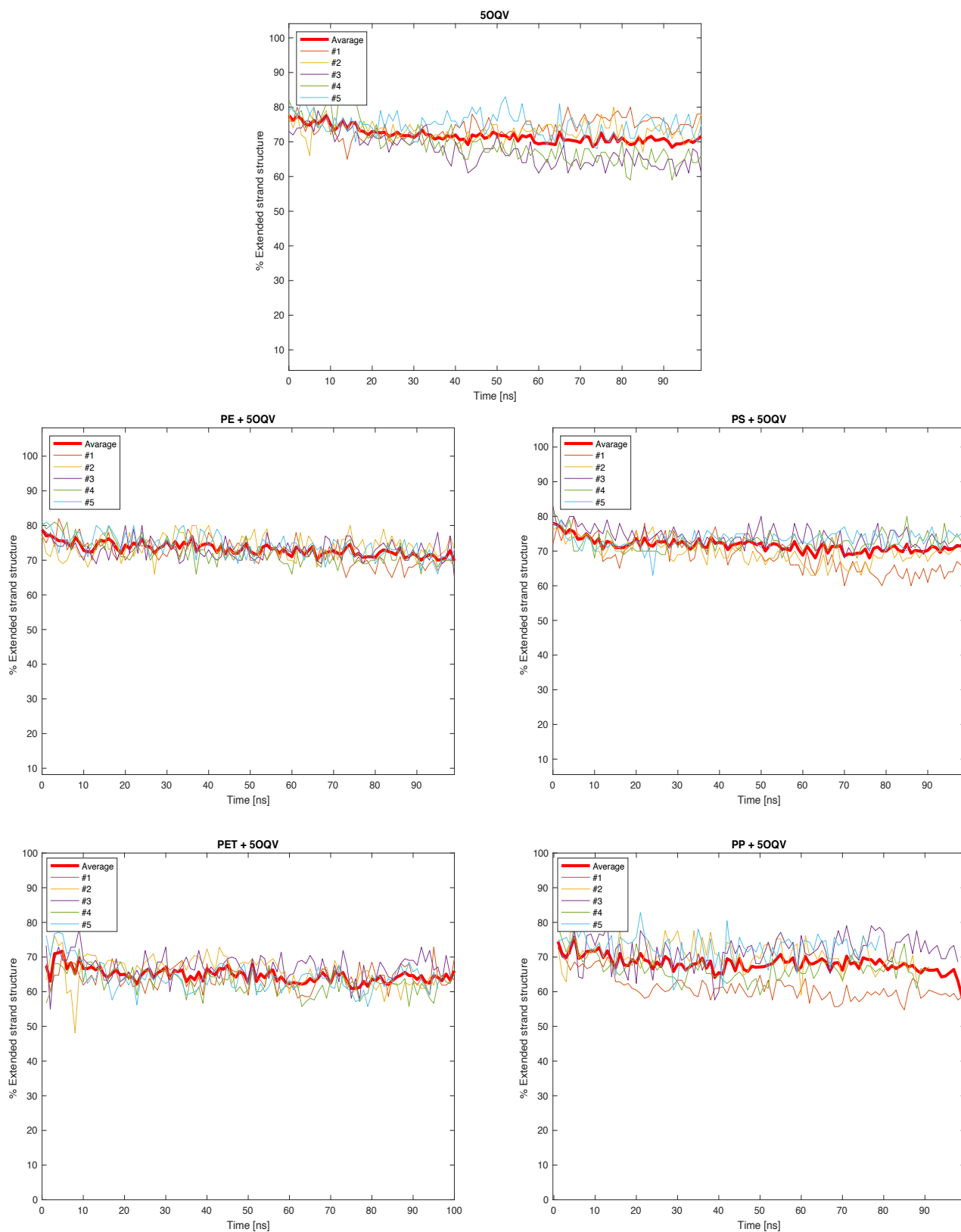
f) Confronto delle interazioni tra il peptide A β 25-42 e le nanoplastiche



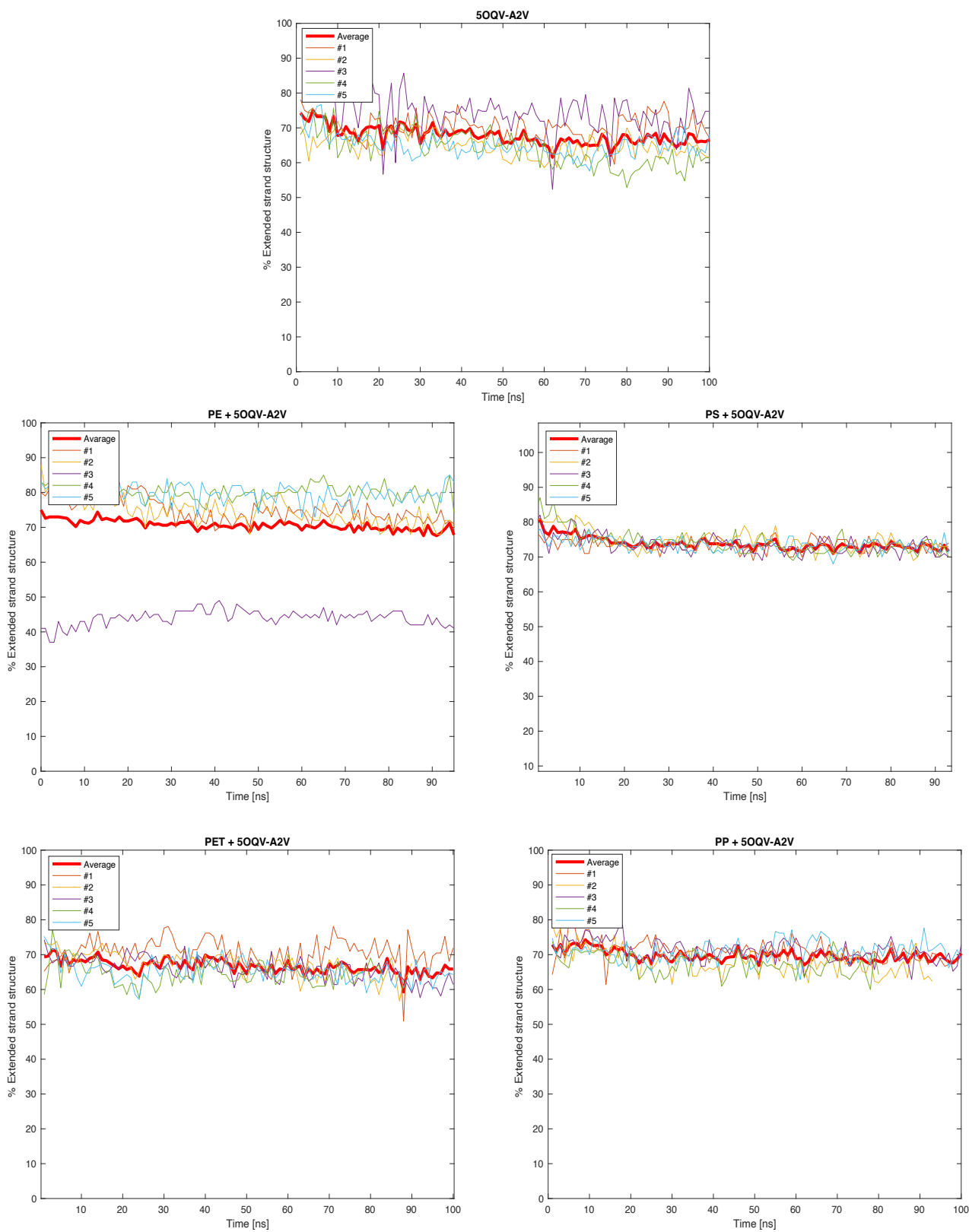
g) Confronto delle interazioni tra l'oligomero 5OQV 25-42 e le nanoplastiche



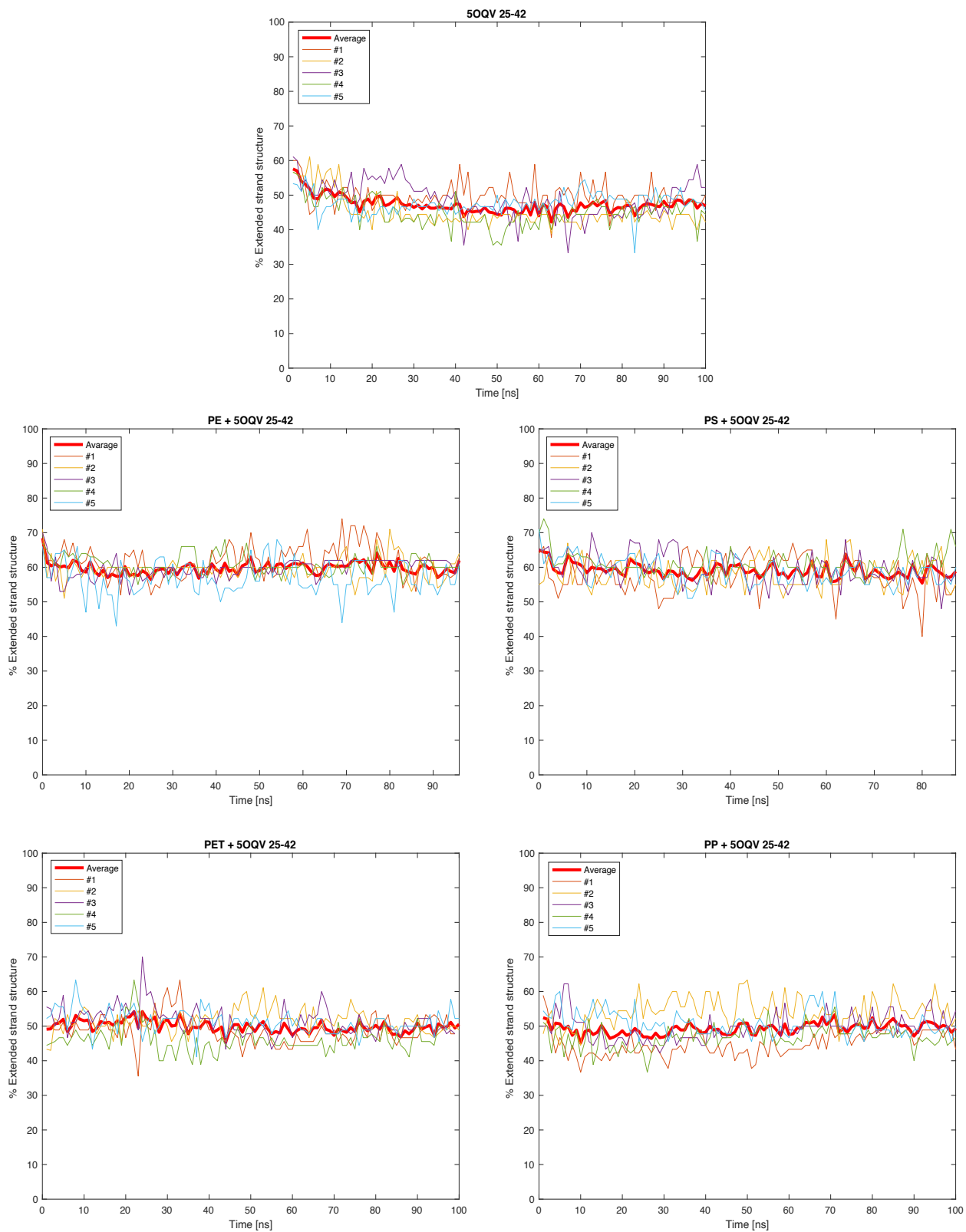
h) Influenza delle nanoplastiche nel mantenimento della struttura beta-sheet dell'oligomero 5OQV



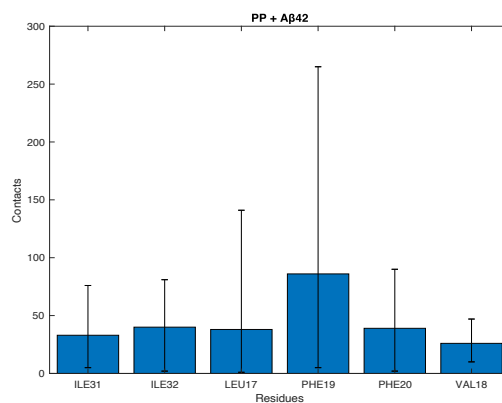
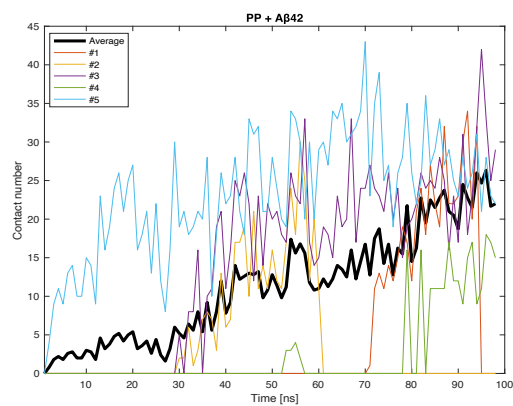
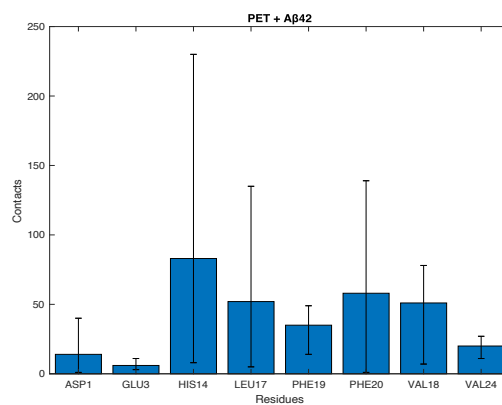
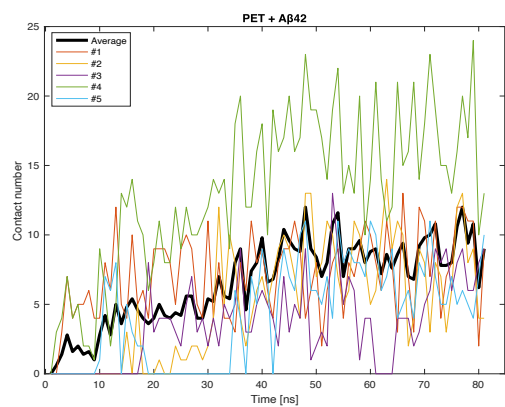
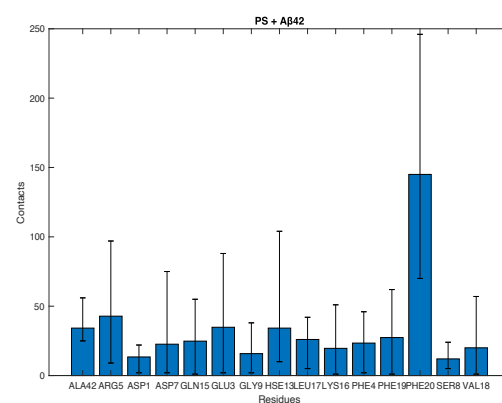
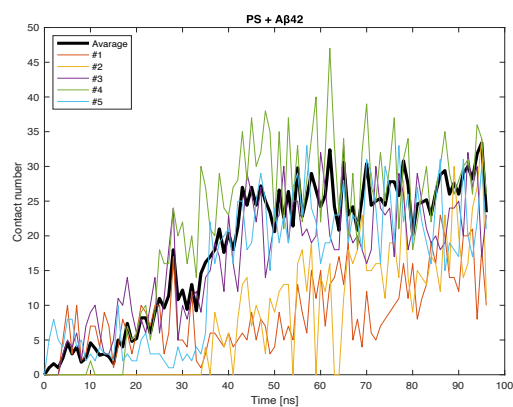
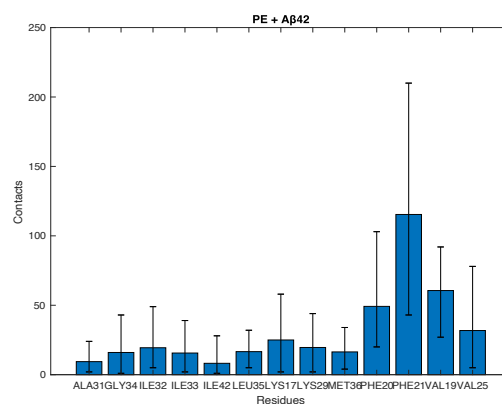
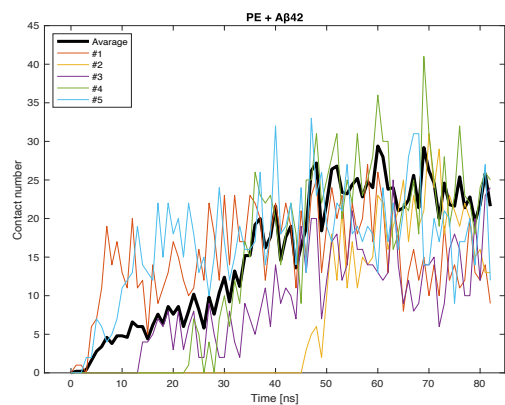
i) Influenza delle nanoplastiche nella struttura beta-sheet dell'oligomero 5OQV-A2V



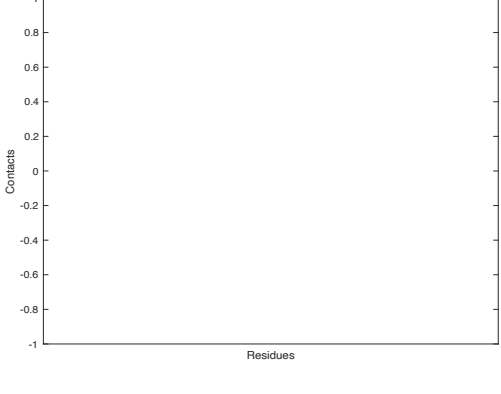
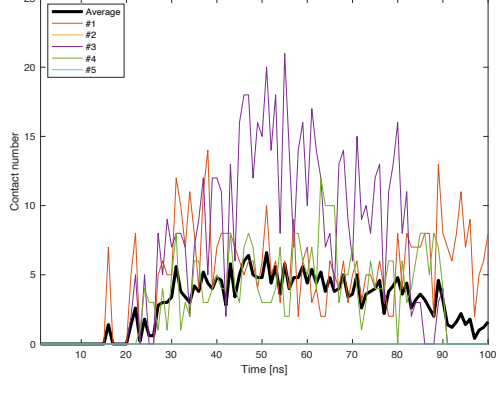
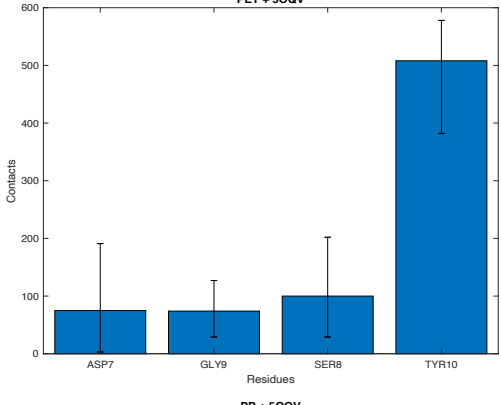
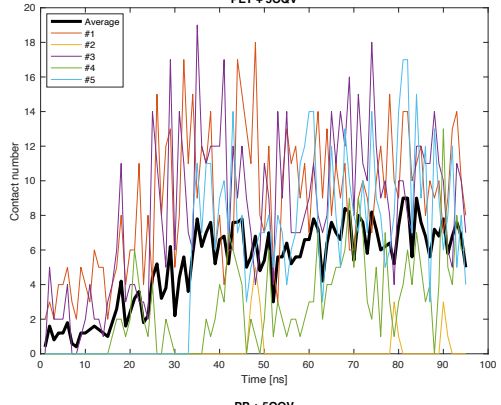
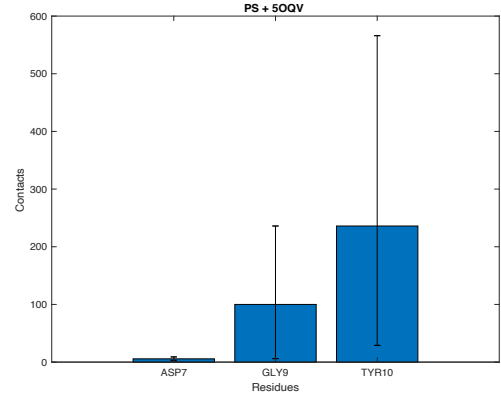
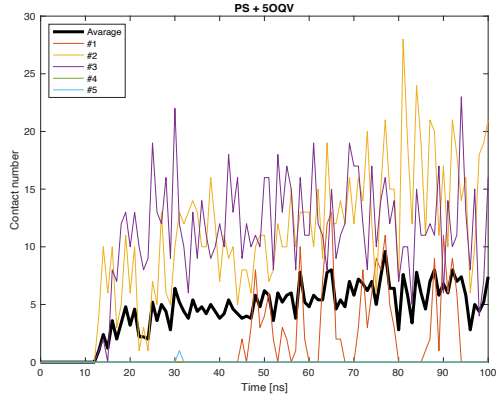
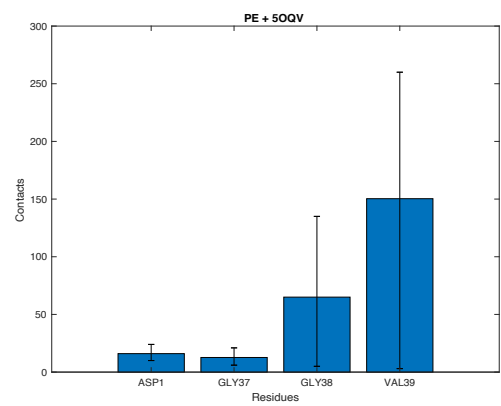
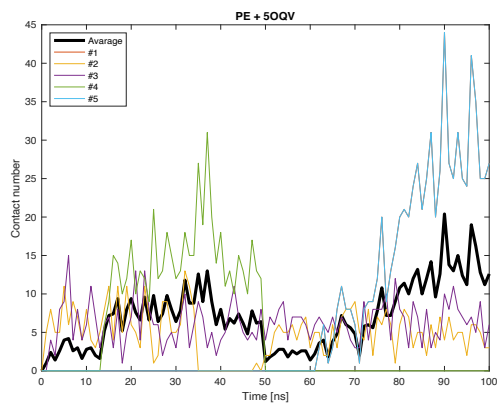
j) Influenza delle nanoplastiche nel mantenimento della struttura beta-sheet dell'oligomero 5OQV 25-42



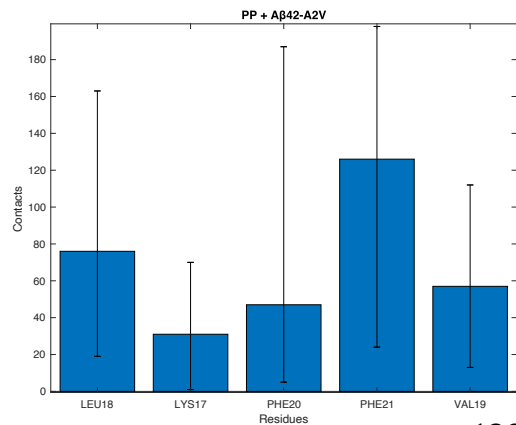
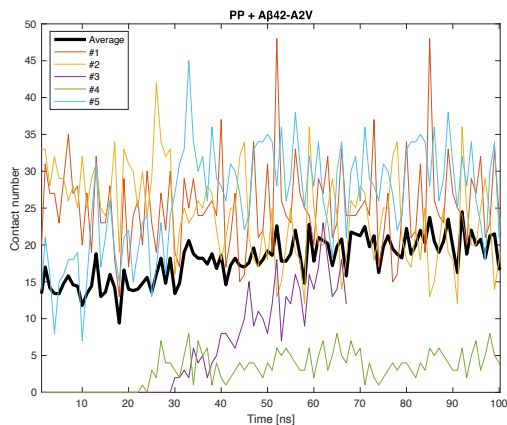
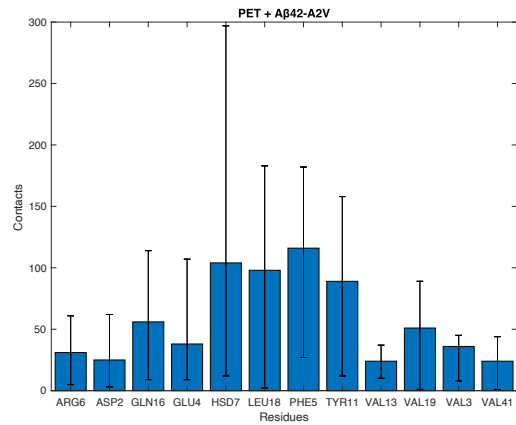
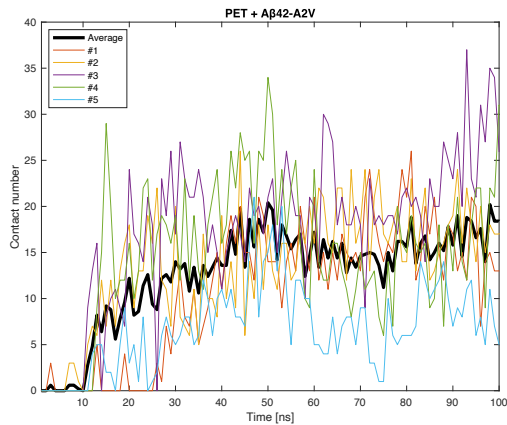
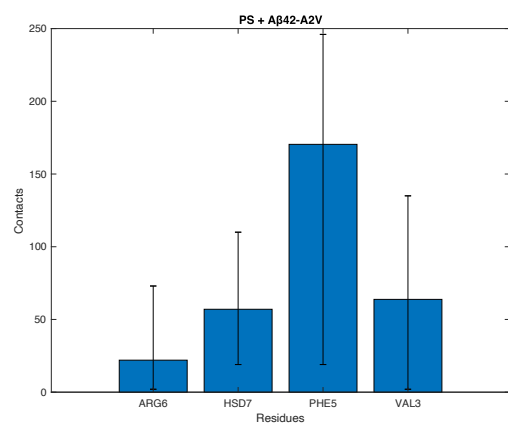
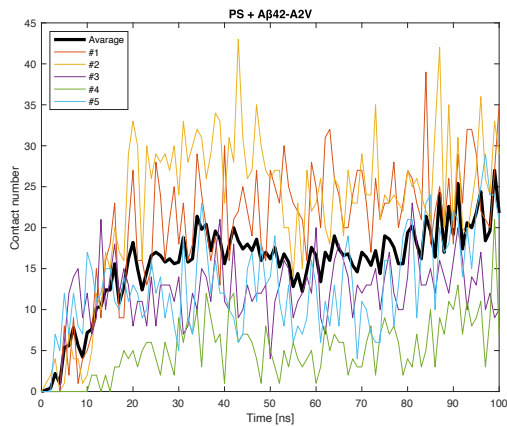
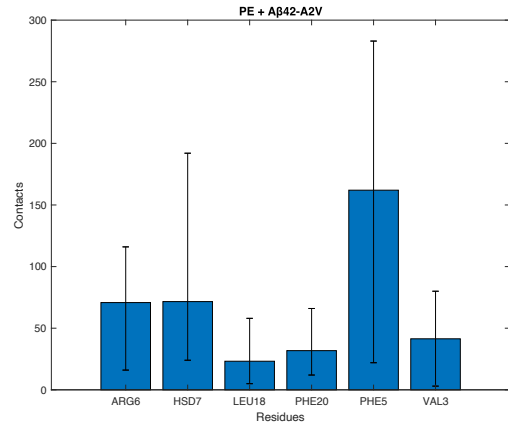
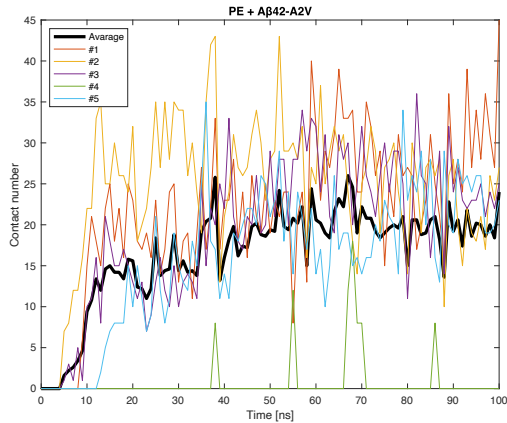
k) Numero dei contatti e residui di contatto tra le nanoplastiche e A β 42



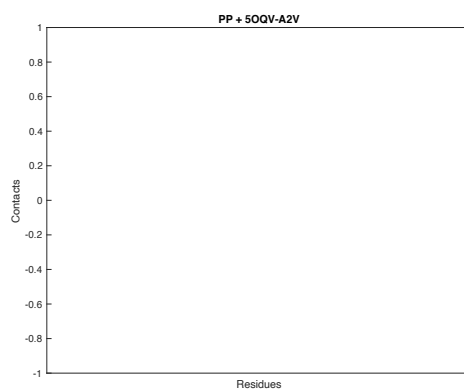
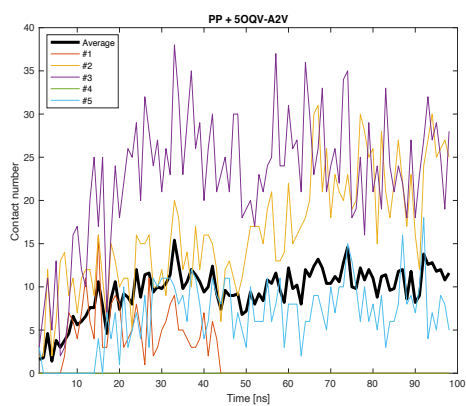
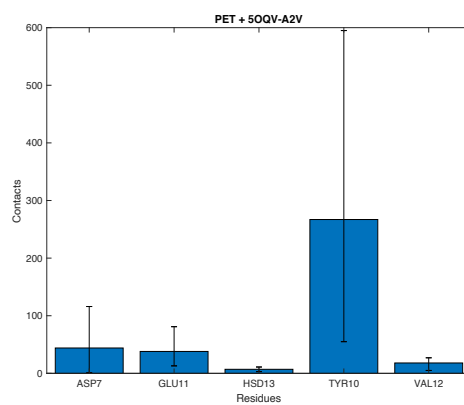
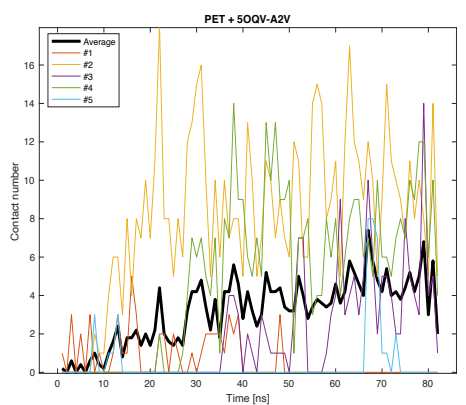
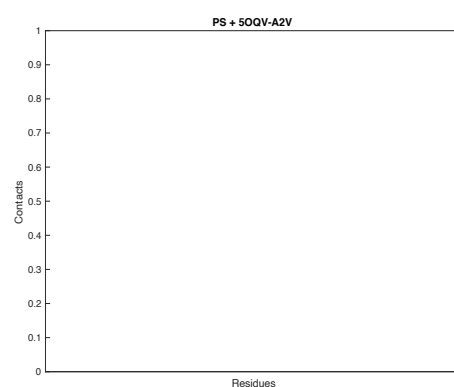
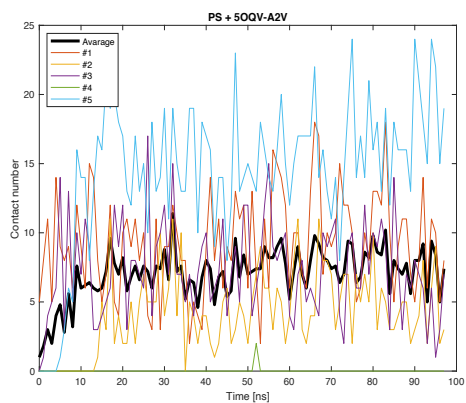
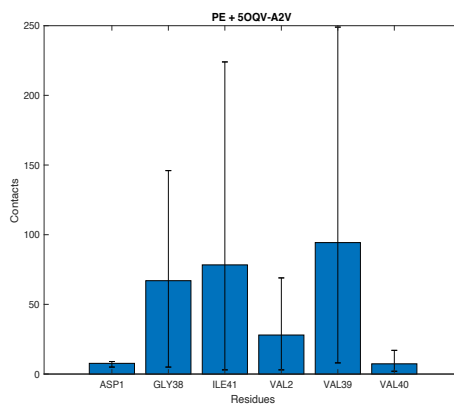
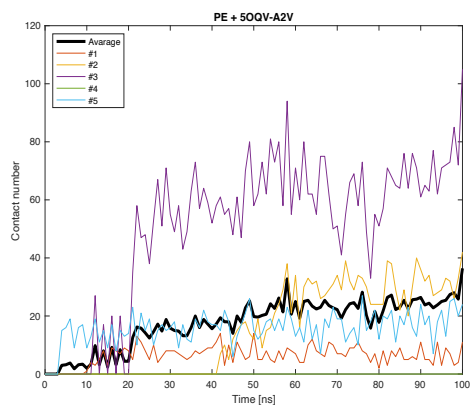
D) Numero dei contatti e residui di contatto tra nanoplastiche e 50QV



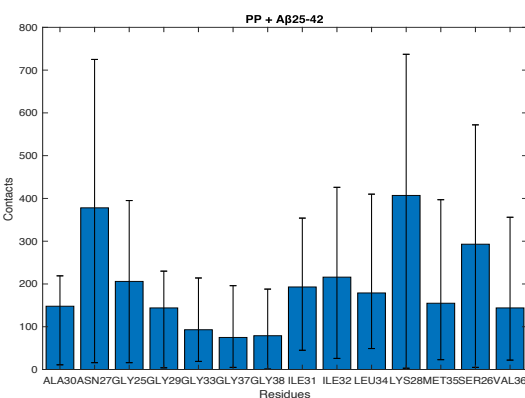
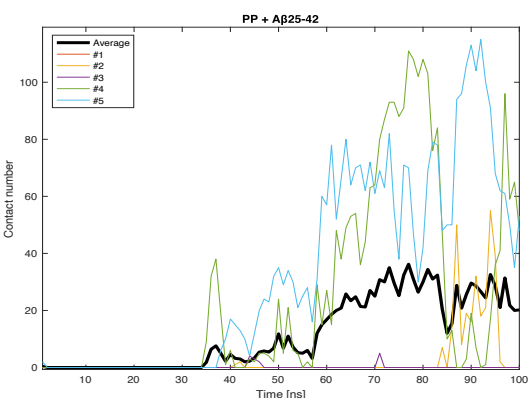
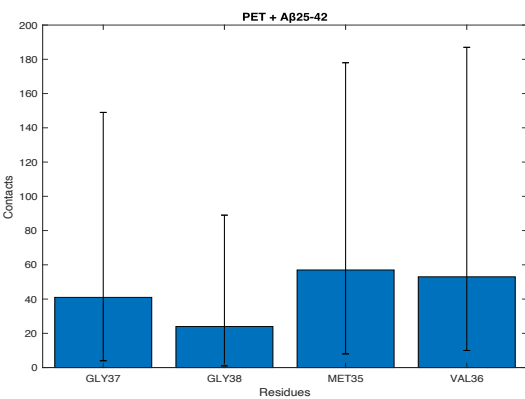
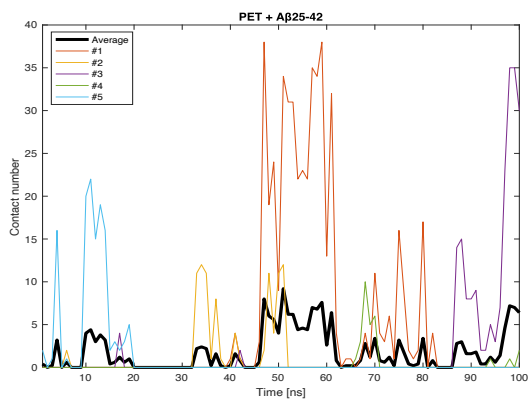
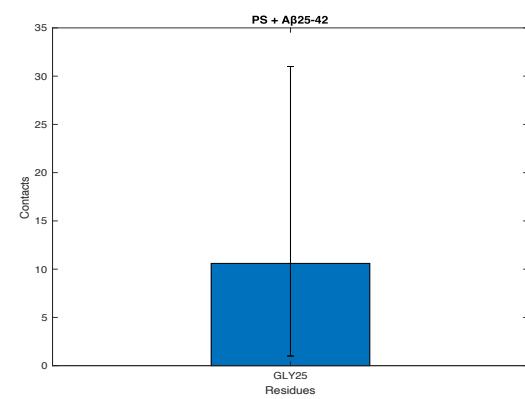
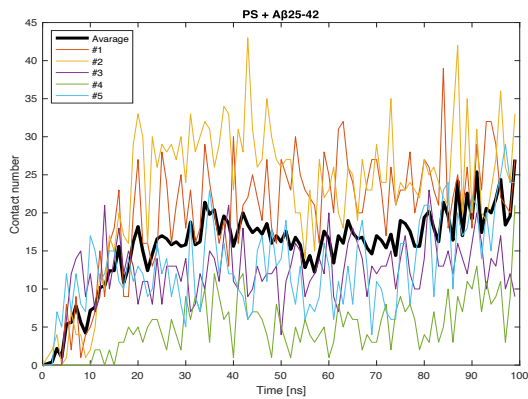
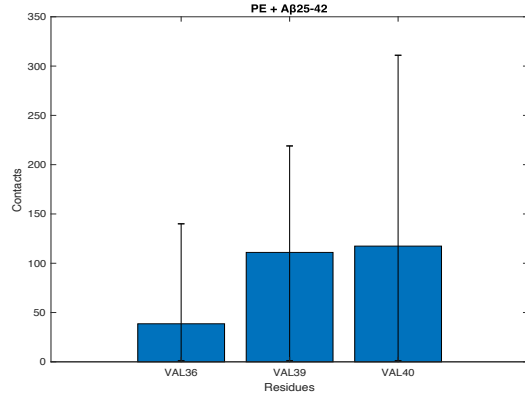
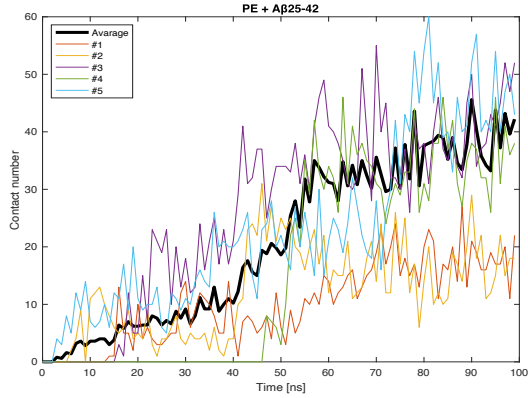
m) Numero dei contatti e residui di contatto tra nanoplastiche e A β 42-A2V



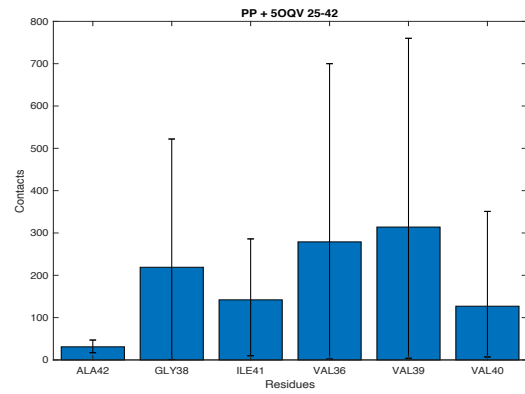
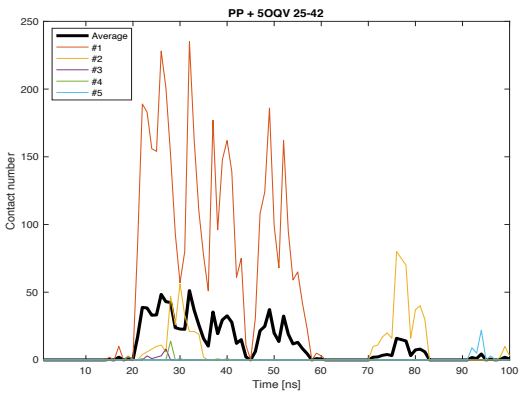
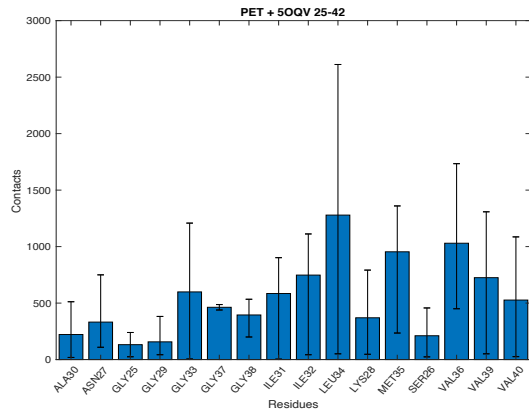
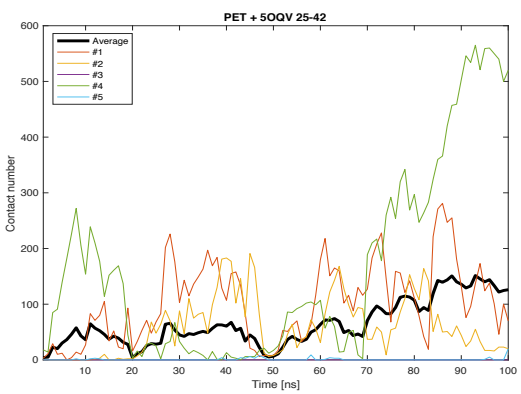
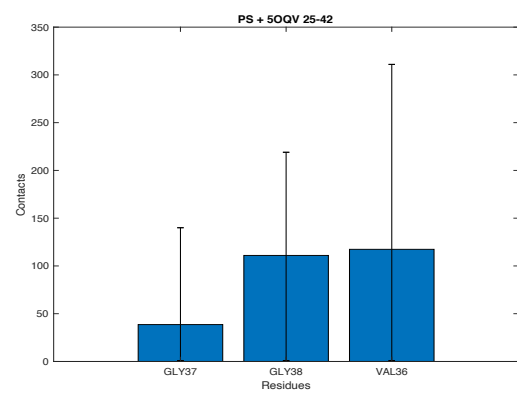
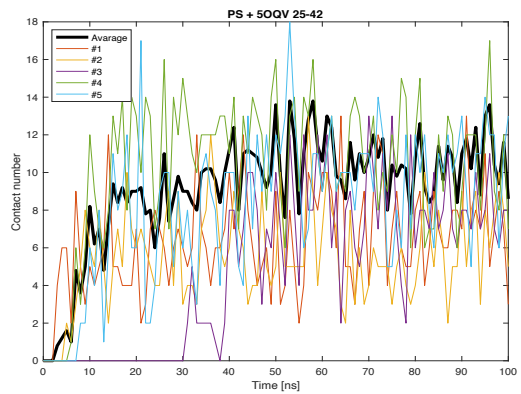
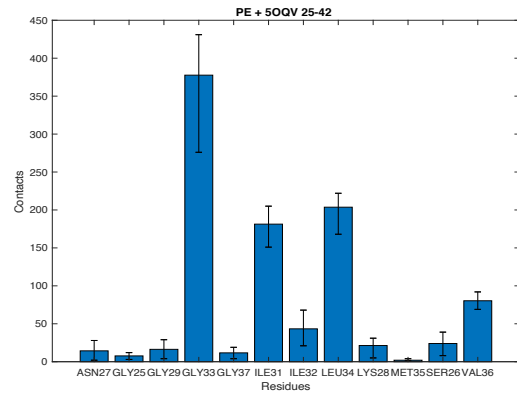
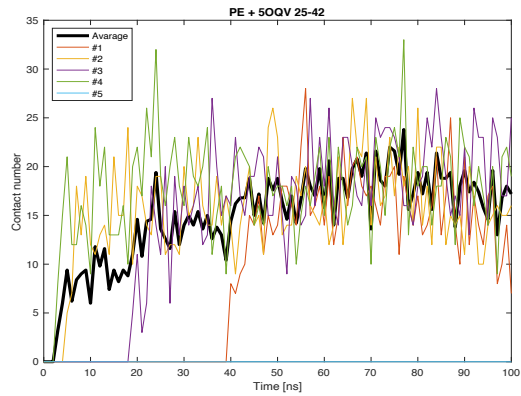
n) Numero contatti e residui di contatto tra nanoplastiche e 5OQV-A2V



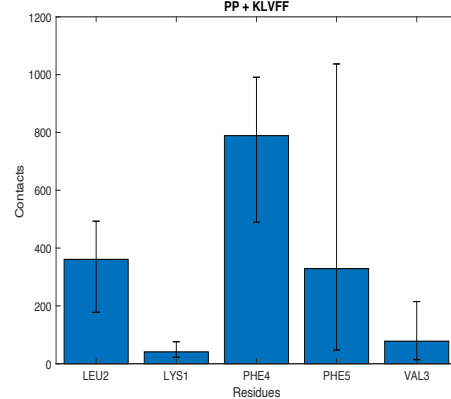
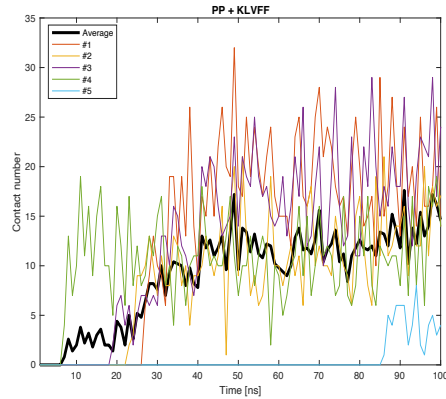
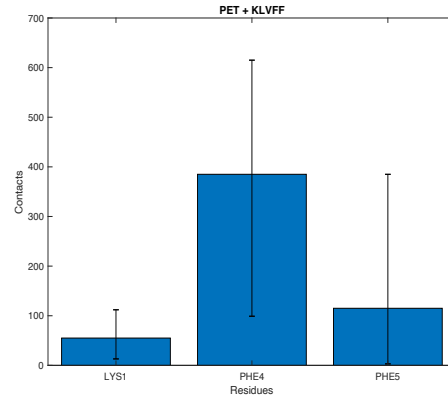
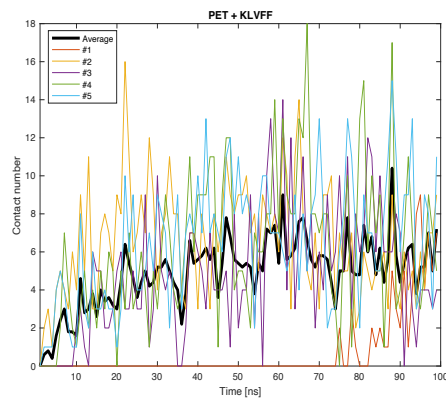
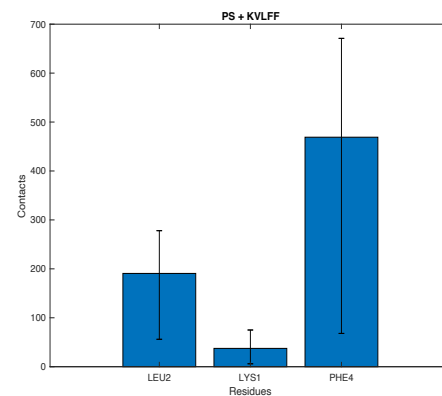
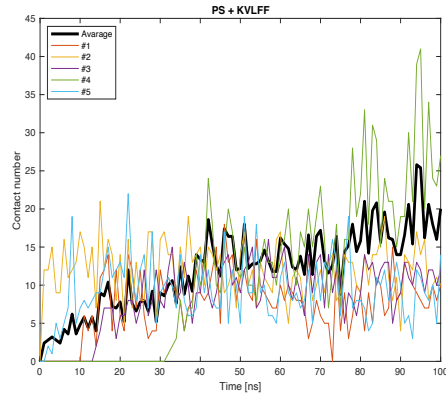
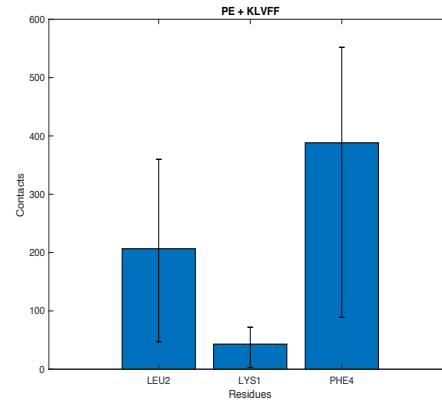
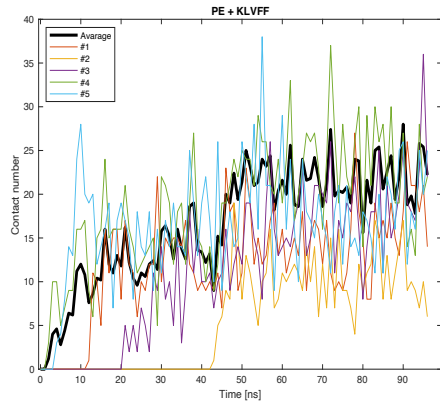
o) Numero contatti e residui di contatto tra nanoplastiche e peptide A β 25-42



p) Numero contatti e residui di contatto tra nanoplastiche e l'oligomero 5OQV25-42



q) Numero contatti e residui di contatto tra nanoplastiche e peptide KLVFF



r) ReplicatePS.sh

```
#!/bin/bash
vmd -dispdev text MON.pdb -e replicate_monomer.tcl
# Set first/last monomer
mv block0.pdb block_init.pdb
mv block24.pdb block_last.pdb
sed -i s/PSM/PST/ block_init.pdb
sed -i s/PSM/PSS/ block_last.pdb

#Delete unnecessary lines
sed -i /CRYST/d block*.pdb
sed -i /END/d block*.pdb

#Join all PDB in one
cat block_init.pdb block1.pdb block2.pdb block3.pdb block4.pdb
block5.pdb block6.pdb block7.pdb block8.pdb block9.pdb block10.pdb
block11.pdb block12.pdb block13.pdb block14.pdb block15.pdb
block16.pdb block17.pdb block18.pdb block19.pdb block_last.pdb >
PS_polymer.pdb

#Rename atoms
vmd -dispdev text PS_polymer.pdb -e rename_PS.tcl
```

s) Replicate_monomer.tcl

```
for { set i 0 } { $i < 5 } {incr i} {
    set a [atomselect top all]
    $a moveby {0 20 0}
    $a writepdb block$i.pdb
}
```

t) Rename_PS.tcl

```
set a [atomselect top all]
set N [$a num]
set Nlast [expr {$N - 13}]
set chain [expr {($N - 2) / 13}]
### Resname
$a set resname PSM

set first [atomselect top "serial 1 to 14"]
$first set resname PST

set last [atomselect top "serial $Nlast to $N"]
$last set resname PSS

## Resid
for { set i 15 } { $i <= $N } {incr i} {
    set ch [expr (($i-1)/14)]
    set x [atomselect top "serial $i"]
    $x set resid $ch
}
set x [atomselect top "serial $N"]
$x set resid [expr {$N/14}]
$a writpdb polys.pdb
```

u) BubbleFast.tcl:

```
wrapmode cell
foreach { xo yo zo } $bubbleCenter { break }
set TOL 3. ;# distance tolerance parameter
proc calcforces {step unique Rstart Rtarget Rrate K} {
    global xo yo zo TOL
```

```

set R [expr {$Rstart - $Rrate * $step}]
if { $R < $Rtarget } { set R $Rtarget }
if { $unique } {
    print "step $step, bubble radius = $R"
}
set RTOL [expr {$R + $TOL}]
if { $step % 100 == 0 } { cleardrops }
while {[nextatom]} {
    set rvec [getcoord]
    foreach { x y z } $rvec { break }
    set rho [expr {sqrt(($x-$xo)*($x-$xo) + ($y-$yo)*($y-$yo) + \
($z-$zo)*($z-$zo))}]
    if { $rho > $R } {
        set forceX [expr {- $K * ($x-$xo) / $rho}]
        set forceY [expr {- $K * ($y-$yo) / $rho}]
        set forceZ [expr {- $K * ($z-$zo) / $rho}]
        addforce "$forceX $forceY $forceZ"
    } elseif { $rho < $RTOL } {
        dropatom
    }
}
}
}

```


v) Analysis_Contact

```
# Define selections
set all [atomselect top all]
set NP [atomselect top "not water and not protein and not ions"]
set NPnoh [atomselect top "not water and not protein and not ions and not
hydrogen"]
set protein [atomselect top "protein"]
set proteinCA [atomselect top "protein and name CA"]

# Translate systems to center NP in box

#Get box size and center
set Xbox [lindex [lindex [pbc get] 0] 0]
set Ybox [lindex [lindex [pbc get] 0] 1]
set Zbox [lindex [lindex [pbc get] 0] 2]

set Xbox_center [expr $Xbox/2]
set Ybox_center [expr $Ybox/2]
set Zbox_center [expr $Zbox/2]

#For all frames translate systems to center the nanoparticle NP
set nf [molinfo top get numframes]
for {set n 0} {$n < $nf} {incr n} {
    animate goto $n
    #Get NP center
    set NPx [lindex [measure center $NP] 0]
    set NPy [lindex [measure center $NP] 1]
    set NPz [lindex [measure center $NP] 2]
    set mx [expr $Xbox_center-$NPx]
    set my [expr $Ybox_center-$NPy]
    set mz [expr $Zbox_center-$NPz]
```

```

set mvec [list "$mx" "$my" "$mz"]

$all moveby $mvec
    pbc wrap -now -sel protein -compound fragment
}

# Get number and residue of contacts

set out [open contacts.dat w]

for {set n 0} {$n < $nf} {incr n} {
    set contacts_list []
    animate goto $n
    set contacts [lindex [measure contacts 5 $proteinCA $NPnoh] 0]
    set contacts [atomselect top "protein and not hydrogen and within 3 of
(not water and not protein and not ions)"]
    set num_contacts [$contacts num]
    set serial_contact [$contacts get serial]
    set resid_contact [$contacts get resid]
    set resname_contact [$contacts get resname]

    for {set i 0} {$i < $num_contacts} {incr i} {
        set AminoAcid [list [lindex $resname_contact $i][lindex
$resid_contact $i]]
        set $contacts_list [linsert $contacts_list end-1 $AminoAcid]
        append contacts_list "$AminoAcid "
    }
    puts "$contacts_list"
    puts $out "$n $num_contacts $contacts_list"
}

close $out

```