

## Lezione 11

### Introduzione ad Amiloidi e Metodi di Analisi Biofisica del Folding

La proteina neosintetizzata dal ribosoma raggiunge il suo stato nativo in seguito al processo di folding. La struttura definisce la funzione della gran parte delle proteine.

Ci sono *proteine intrinsecamente disordinate*, che non hanno una struttura tridimensionale ben precisa ma possono popolare un gran numero di stati conformazionali.

Strutture parzialmente ripiegate si possono derivare da stati intermedi del ripiegamento di una proteina, da proteine intrinsecamente disordinate o da un precursore già foldato, e rappresentano il punto di partenza nella formazione degli aggregati iniziali.

Proteine in stati di folding parziale, specialmente se espongono cluster idrofobici sulla superficie, tendono a formare aggregati intermedi, che poi possono evolvere in aggregati maturi, i quali possono essere divisi in tre categorie:

- Aggregati amorfi

Sono associazione di monomeri di proteina o frammenti di proteina. Definiti amorfi perché non riusciamo a riconoscere una organizzazione morfologica strutturata, né si riescono a riconoscere elementi di struttura secondaria in maniera precisa. Sono in genere aggregati ricchi in strutture disordinate e strutture a beta foglietto poco organizzate.

- Aggregato amiloide

Caratterizzato da un elevato ordine strutturale, sia a livello morfologico dove appaiono come una struttura fibrillare, sia come struttura secondaria che è definita cross-beta.

- Aggregati native-like

La proteina all'interno dell'aggregato mantiene una struttura molto simile allo stato nativo, e può anche essere funzionale.

Esistono comunque aggregati di tipo misto, ad esempio con una impalcatura amiloide con associati depositi di tipo amorfo o anche aggregati native-like.

L'aggregazione native like è spesso presente come intermedio, ed evolve in altre forme, ma si ritrovano anche aggregati in cui la porzione native-like è stabile e contiene proteine funzionali.

L'aggregato amiloide può fare da impalcatura in associazione agli altri tipi di aggregato.

### Amiloidi

La spinta nello studio dell'aggregato amiloide è partita dall'implicazione che questi hanno nel contesto medico.

Sono conosciute più di 50 proteine amiloidogeniche, che vanno facilmente incontro ad aggregazione amiloide, di cui è nota la loro relazione a patologie.

Alcune di queste patologie sono particolarmente rilevanti, sia dal punto di vista del numero di pazienti sia per la gravità della patologia. Per molte di queste patologie non abbiamo farmaci che permettano di guarire, ma riusciamo solo a rallentarne la progressione.

Possiamo distinguere le patologie in:

- Malattie neurodegenerative

Alzheimer, Parkinson, atassie ed altre.

Queste patologie hanno in comune il fatto di avere una proteina precursore all'origine della formazione degli aggregati.

Nell'Alzheimer c'è la *proteina Tau*, nel Parkinson la *sinucleina*.

- Amiloidosi sistemiche non neuropatiche

Tra le patologie di importanza troviamo (amyloid light-chain) AL amiloidosi, dovuta alle catene leggere degli anticorpi, e l'amiloidosi correlata ad emodialisi, che si presenta in pazienti dializzati per oltre 10 anni.

- Patologie localizzate non neuropatiche

Tra queste il diabete di tipo II e le amiloidosi cutanee.

Più di recente si è visto che l'aggregazione amiloide non è solo legata a stati patologici, ma la natura con l'evoluzione ha sfruttato le proprietà strutturali peculiari degli aggregati amiloidi anche per ruoli fisiologici. Parliamo in questi casi di *amiloidi funzionali*, che si differenziano dagli *amiloidi patologici* precedentemente citati.

*E. coli* ad esempio è in grado di produrre amiloidi in maniera regolata, che utilizza come scaffold per la creazione di biofilm, che gli permettono di colonizzare superfici inerti.

Anche nell'uomo troviamo amiloidi funzionali, ad esempio la proteina Pmel17 che si trova nei melanosomi, e serve da scaffold che aiuta a catalizzare la formazione della melanina, intrappolando gli intermedi tossici che si formano nel processo di formazione della melanina, limitandone la diffusione e gli effetti nocivi.

Si possono quindi distinguere amiloidi intracellulari ed amiloidi extracellulari.

Le proteine che formano il biofilm in alcuni batteri e funghi, e la A-beta amiloide nella malattia di Alzheimer sono amiloidi extracellulari.

L'amiloide coinvolta nella sintesi della melanina e i corpi di Lewy nel Parkinson sono amiloidi intracellulari.

Gli amiloidi sono strutture con caratteristiche meccaniche interessanti, sono strutture resistenti a stress chimici e fisici, per cui si è pensato di usarli come biomateriali. I primi lavori sono comparsi nel 1997 e negli ultimi anni ci sono stati interessanti studi sulla struttura spaziale degli amiloidi a risoluzione atomica.

La formazione di amiloidi è molto utile nella costruzione di scaffold tridimensionali per l'ingegneria tissutale, che possono essere funzionalizzati con altre proteine e molecole bioattive.

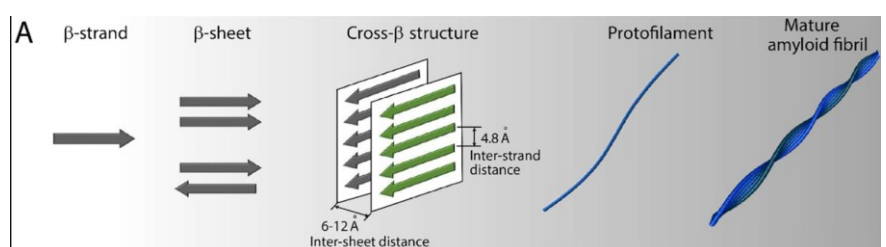
### Strutture e Proprietà degli amiloidi

Un aggregato è definito amiloide in base alle sue proprietà strutturali. (da *Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade*. F. Chiti, C.M. Dobson)

- L'aggregato in questione deve avere una struttura di tipo fibrillare, nell'ordine di 7 – 13 nm. La caratterizzazione di questi aggregati viene fatta con tecniche di microscopia elettronica e mediante la microscopia a forza atomica.
- L'aggregato amiloide possiede una struttura cross-beta, ricca in foglietti beta. Queste strutture possono essere identificate con tecniche di cristallografia a raggi X ed NMR.
- L'aggregato amiloide lega coloranti specifici come la tioflavina T (ThT) ed il Congo red (CR). La capacità di legare questi coloranti viene definita proprietà tintoriale.

Gli autori concludono dicendo che queste tre caratteristiche ci permettono di definire un aggregato come *aggregato amiloide*.

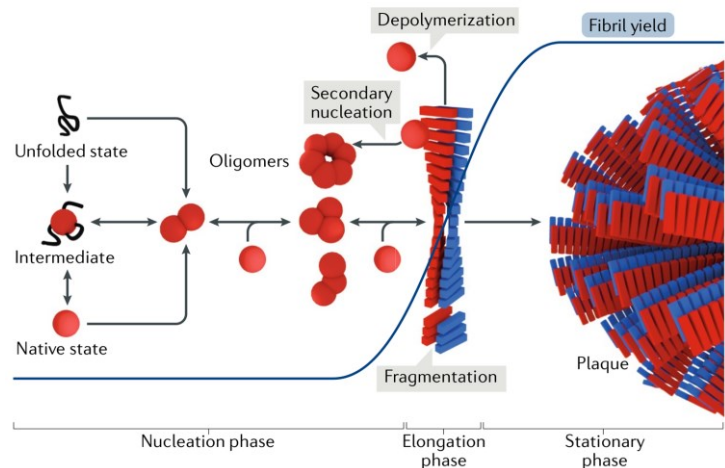
La struttura cross-beta è caratterizzata dalla presenza di beta filamenti perpendicolari all'asse delle fibrille. Queste strutture cross-beta si organizzano in protofilamenti, che si



organizzano successivamente a formare le fibrille amiloidi.

La cinetica tipica di aggregazione dell'amiloide può essere misurata mediante la combinazione di spettroscopia e microscopia, usando fluorescenza intrinseca o estrinseca (mediante l'uso di cromofori quali ThT o ANS), e si evidenzia una cinetica di tipo sigmoideale, dove la quantità di fibrille aumenta col passare del tempo.

Le tempistiche delle cinetiche di aggregazione cambiano molto da proteina a proteina, ed anche al cambiamento delle condizioni ambientali per una singola proteina.



(Da *A new era for understanding amyloid structures and disease*. M.G. Iadanza, M.P. Jackson, E.W. Hewitt, S.E. Radford)

Possiamo differenziare tre fasi nel processo di formazione delle fibrille.

La prima è una fase di lag, o fase di nucleazione, in cui non si osserva la presenza di fibrille ma la proteina in stato nativo passa a conformazioni intermedie, con esposizione di regioni idrofobiche, con maggiore propensione all'aggregazione e formazione di nuclei di aggregazione.

Nella seconda fase, dai nuclei di aggregazione, che sono piccoli oligomeri, parte la formazione delle strutture fibrillari vere e proprie. La crescita è facilitata dalla frammentazione delle fibrille, perché si creano nuovi siti in cui può avvenire la crescita della fibrilla. Anche la superficie delle fibrille può catalizzare la conversione di strutture native in strutture disordinate propense all'aggregazione.

Nel processo di crescita si ha sempre contemporaneamente un processo di dissoluzione di monomero dalla fibrilla, ma la percentuale di questo è relativamente bassa, quindi l'equilibrio si sposta verso l'accrescimento della fibrilla.

La terza fase è una fase di equilibrio, in cui le fibrille si aggregano tra loro formando le placche amiloidi.

Vedendola da un punto di vista tecnologico, la terza fase è quella in cui si è formato lo scaffold fibrillare. Gli aggregati formano matrici tridimensionali.

Si può partire da sequenze peptidiche disegnate razionalmente oppure si possono usare sequenze di proteine che naturalmente tendono ad aggregare.

Queste matrici possono essere utilizzate per scopi di ingegneria tissutale.

I metodi per studiare questo processo possono essere suddivisi in:

- Tecniche spettroscopiche quali:
  - Fluorescenza
    - Intrinseca (aminoacidi aromatici, specialmente triptofano)
    - Estrinseca (sonde come ThT e ANS)
  - Congo Red

Sonda per misurare l'assorbimento e rilevare la formazione di aggregato amiloide finale.

Utilizzata anche al livello clinico in campioni di anatomopatologici di tessuti per la ricerca di amiloide.

- Dicroismo Circolare

Permette di misurare il cambiamento conformazionale della struttura nativa verso strutture disordinate e a beta foglietto

- FTIR

Utile per identificare cambiamenti conformazionali che portano dalla struttura nativa a strutture a beta foglietto. Utile anche per lo studio dell'aggregato finale.

- Raman
- NMR
- Scattering
- Microscopia
  - TEM
  - AFM
  - Cryo-EM

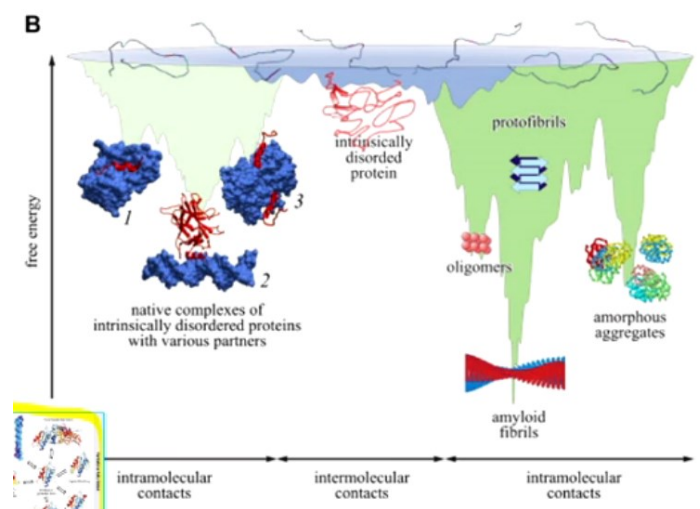
Per lo studio e la caratterizzazione delle strutture degli aggregati a risoluzione atomica

- Microscopia a fluorescenza.

### Folding Energy Landscape

Partendo da una struttura disordinata sappiamo che la proteina si ripiega raggiungendo la struttura nativa, passando attraverso varie conformazioni intermedie.

Ciò che è interessante notare è che, dal punto di vista energetico, la struttura aggregata sia particolarmente stabile, mostrando una energia libera  $\Delta G$  minore rispetto alla proteina nativa. Esiste comunque un'ampia barriera di energia che la proteina in stato nativo deve superare per passare allo stato aggregato, il che permette alla proteina di mantenere la sua struttura nativa, e causa il passaggio a stato aggregato solo in particolari condizioni.



Le interazioni di tipo *intramolecolare* sono quelle tipiche che avvengono nel folding della proteina da forma denaturata a forma nativa.

Le interazioni *intermolecolari* sono invece tipiche dell'aggregazione proteica, come quelle che portano alla formazione dell'amiloide.

Lo studio di questi processi richiede metodi in grado di rilevare differenze tra stato denaturato, stato nativo e stati intermedi, oltre ai livelli di interazione intra ed intermolecolari.