

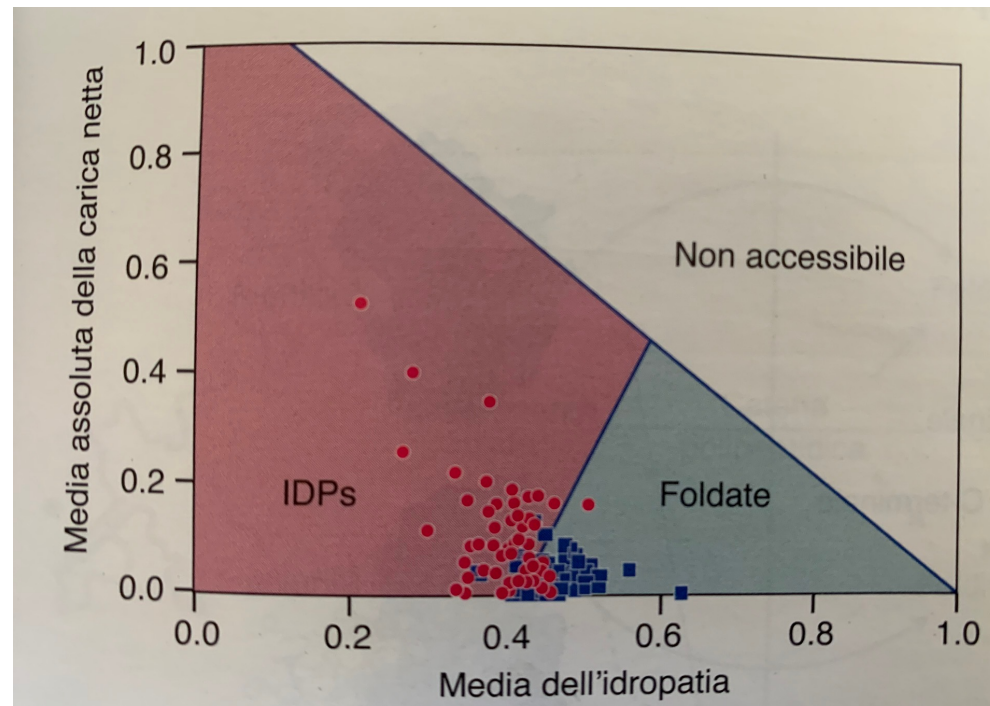
# Proteine intrinsecamente disordinate

Non tutte le proteine funzionali hanno una struttura definita

- Importanza della struttura nativa di una proteina ai fini della sua funzione biologica.
- Questo paradigma della relazione struttura-funzione è stato messo in discussione dalla scoperta delle proteine intrinsecamente disordinate (IDP; IDR, regioni intrinsecamente disordinate)
- IDP non sono dotate di struttura secondaria e terziaria stabile
- Il disordine strutturale è molto diffuso e può riguardare l'intero peptide o essere localizzato in specifiche regioni di varia lunghezza ed aumenta con la complessità degli organismi.
- In *E.coli* le proteine disordinate sono il 4-5% del totale, circa 30% delle proteine eucariote comprende regioni disordinate lunghe almeno 40 residui e una porzione significativa di queste sono completamente destrutturate.
- La mancanza di strutturazione dipende dalla sequenza primaria delle IDP in cui sono abbondanti sia residui carichi sia residui che tendono ad interrompere la struttura secondaria come prolina e glicina, mentre sono scarsi i residui idrofobici e aromatici, le cisteine e le asparigine.

# Correlazione tra indice di idropatia e carica dei residui proteici con il grado di disordine molecolare

Se comparate a proteine strutturate le IDPs e IDRs sono prive di residui che facilitano la formazione di strutture definite (cisteina, triptofano, tirosina, isoleucina, fenilalanina, valina, leucina, istidina, treonina, asparagina). Sono invece presenti acido aspartico, metionina, lisina, arginina, serina, glutammina, prolina e acido glutammico.



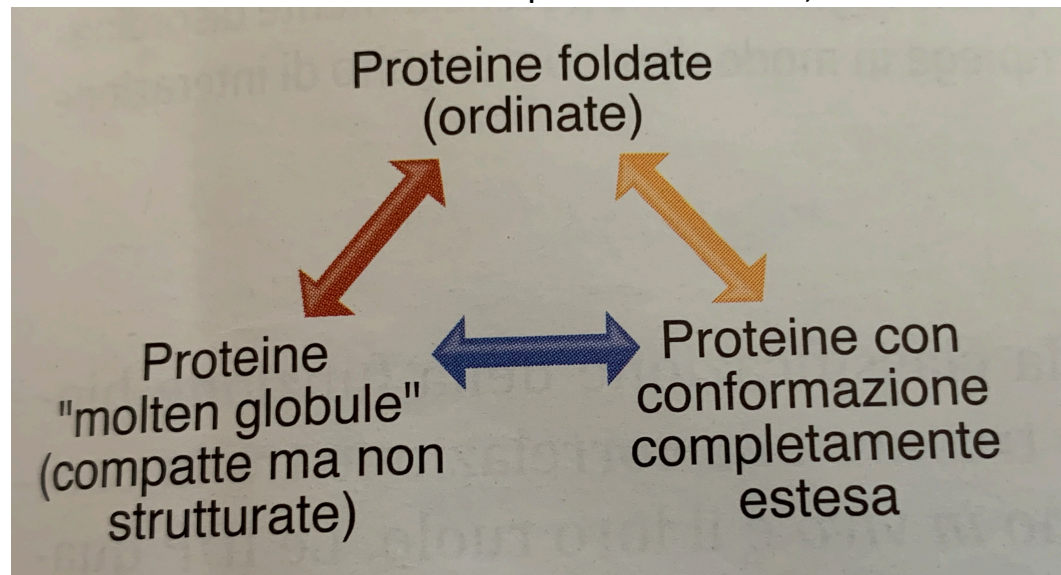
**Bassa idrofobicità media e elevata carica netta sono alla base della mancanza di compattezza della proteina in condizioni fisiologiche perché il ridotto effetto idrofobico non spinge la proteina a compattarsi mentre l'elevato numero di residui polari rende la proteina molto solubile in mezzo acquoso anche se la conformazione non è globulare.**

- Numerose proteine o regioni proteiche disordinate interagiscono con molecole di RNA o DNA e spesso questo legame determina cambiamenti conformazionali che risultano nella transizione tra disordine a ordine.
- L'analisi strutturale cristallografica di numerose proteine che legano acidi nucleici ha mostrato che regioni proteiche disordinate diventano ben strutturate in seguito al legame con l'acido nucleico.
- Due strutture cellulari complesse formate dall'associazione tra RNA e proteine che contengono regioni intrinsecamente disordinate: il ribosoma e lo spliceosoma.
- Le proteine ribosomiali contengono spesso regioni predette di disordine intrinseco che sono conservate evolutivamente e sono coinvolte nell'interazione tra proteine ribosomiali, con l'rRNA e con il resto del macchinario richiesto per la traduzione proteica.
- L'abbondante disordine delle proteine ribosomiali è necessario per la loro funzione.
- Per quanto riguarda lo spliceosoma, informazioni ancora parziali, almeno 100 proteine sono presenti nello spliceosoma e come nel ribosoma sono ricche di regioni intrinsecamente disordinate.



- In condizioni fisiologiche, le IDP non contengono quantità significative di struttura secondaria e terziaria stabile, sono strutture dinamiche che si inter-convertono facilmente.
- Si tratta comunque di una classe eterogenea di proteine che si suddividono in base al loro grado di compattezza in: proteine in conformazione totalmente estesa (random coil) e proteine più compatte ma non strutturate (molten globule)

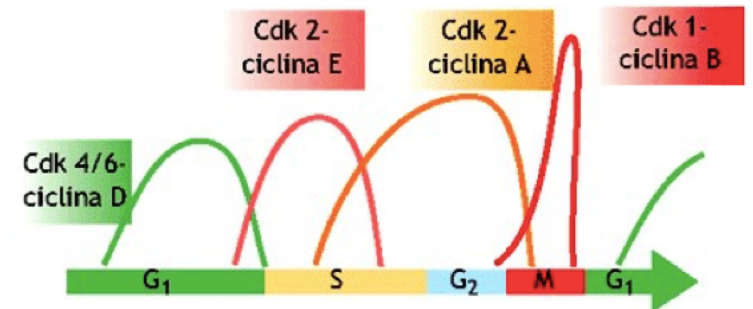
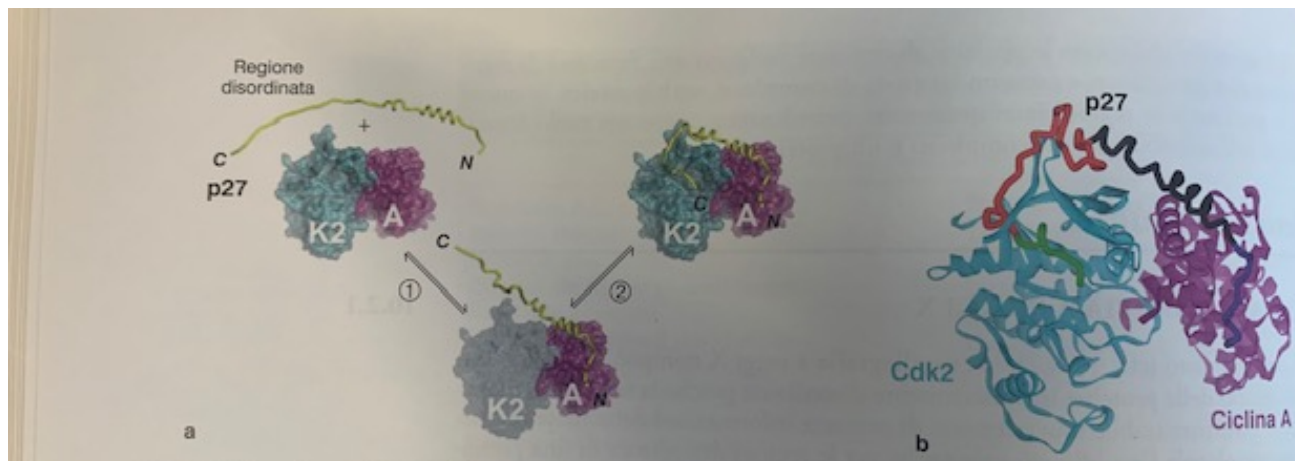
Teoria della trinità delle proteine di Keith Dunker, 2001



**La struttura biologica può derivare da ciascuno di questi stati o da transizioni di essi**

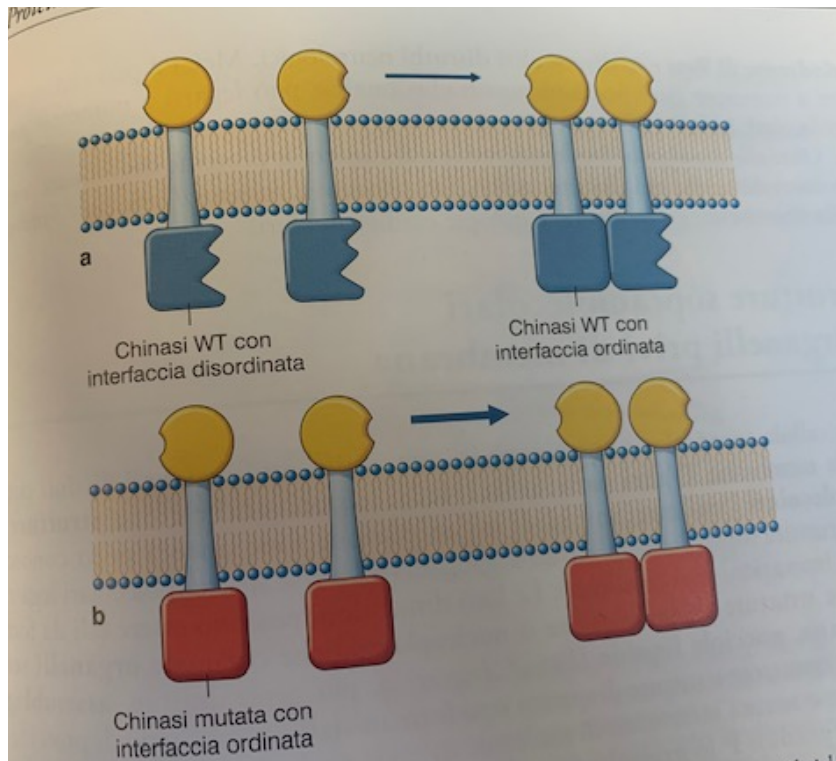
- Grazie alla loro flessibilità strutturale, le IDP sono importanti per la formazione di complessi molecolari che hanno funzioni regolatrici e di segnalazione in diversi processi cellulari.
- La loro capacità di ritornare nello stato disordinato flessibile e la loro propensione ad interagire con partner diversi permette alle IDP di svolgere funzioni diverse in contesti cellulari differenti.
- La flessibilità funzionale richiede che le proteine disordinate e la loro attività siano strettamente controllate per esempio mediante modificazioni post-traduzionali o la regolazione della sintesi/degradazione.
- La loro tendenza a costituire strutture supramolecolari le rende particolarmente propense a formare aggregati non fisiologici che sono causa di malattie da misfolding proteico.
- L'errata conformazione può dipendere dalla presenza di mutazioni, esposizione a tossine, alterazione di modificazioni post-traduzionali (es fosforilazione), alterazione della loro degradazione, danno ossidativo o la perdita di specifici interattori molecolari.
- Fattori genetici (mutazioni, splicing non fisiologico, traslocazione cromosomale, etc) e fattori non genetici (livello di espressione della proteina, regolazione, degradazione, modificazioni post-traduzionali).
- L'interesse verso questi fenomeni di aggregazione è grande per la loro associazione a importanti patologie umane tra cui AD, PD, HD, il diabete di tipo 2.
- Es: AD, aggregati sono costituiti prevalentemente da uno stesso polipetide chiamato A $\beta$  che deriva da una proteina di membrana, precursore del peptide  $\beta$ -amiloide (APP) che, dopo essere stata tagliata da specifiche proteasi, si distacca dalla membrana e si converte in una struttura  $\beta$  e forma aggregati insolubili (placche amiloidi).

# La proteina p27<sup>Kip1</sup>



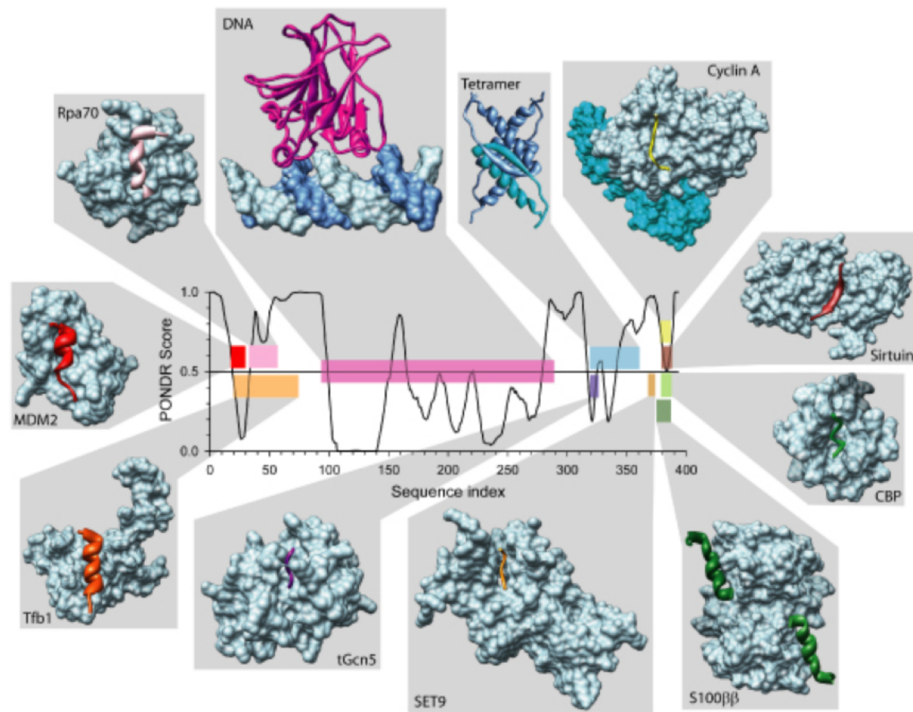
Inibitore dei complessi ciclina A/Cdk2, di cui regola la funzione nel ciclo cellulare. Quando non è associata al complesso ciclina A/Cdk2 presenta una regione C-terminale estesa e disordinata, che cambia conformazione legandosi al complesso ciclina A/Cdk2 di cui regola la funzione. La dissociazione del dominio disordinato dell'inibitore da ciclina A/Cdk2 richiede più eventi che sono forforilazione, ubiquitinazione e degradazione proteolitica

# Recettore del fattore di crescita EGF



- La dimerizzazione del recettore causa la sua attivazione.
- L'interfaccia di dimerizzazione del recettore è intrinsecamente disordinata.
- Durante la dimerizzazione va incontro ad una transizione da disordine ad ordine.
- Alcune mutazioni oncogeniche del dominio chinasi eliminano il disordine dell'interfaccia di dimerizzazione del recettore e ne potenziano in modo anomalo l'attività.

# La proteina p53



- La proteina p53 è un importante soppressore tumorale , può indurre o reprimere l'espressione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nella senescenza e nell'apoptosi.
- Le regioni amino-terminale e carbossi-terminale di p53 sono intrinsecamente disordinate, mentre il resto della proteina include domini strutturati, come il dominio di legame al DNA ed il dominio di tetramerizzazione.
- Le due regioni disordinate possono legare diverse proteine che modulano le funzioni di p53, grazie a queste interazioni p53 può regolare essenziali processi cellulari.

## **Predictor Of Natural Disordered Regions (PONDR)**

### **PONDR® Algorithms**

#### ***Predictor Construction***

PONDR® predicts upon single sequences. PONDRs are typically feedforward neural networks that use sequence attributes taken over windows of 9 to 21 amino acids. These attributes, such as the fractional composition of particular amino acids, hydropathy, or sequence complexity, are averaged over these windows and the values are used to train the neural network during predictor construction. The same values are used as inputs to make predictions.

The neural network predictors (NNPs) were trained on carefully chosen, non-redundant sets of ordered and disordered sequences that help to insure modest predictor biases and to enable the predictors to generalize to new sequences.

**When making predictions, NNP outputs are between 0 and 1 and are then smoothed over a sliding window of 9 amino acids.**

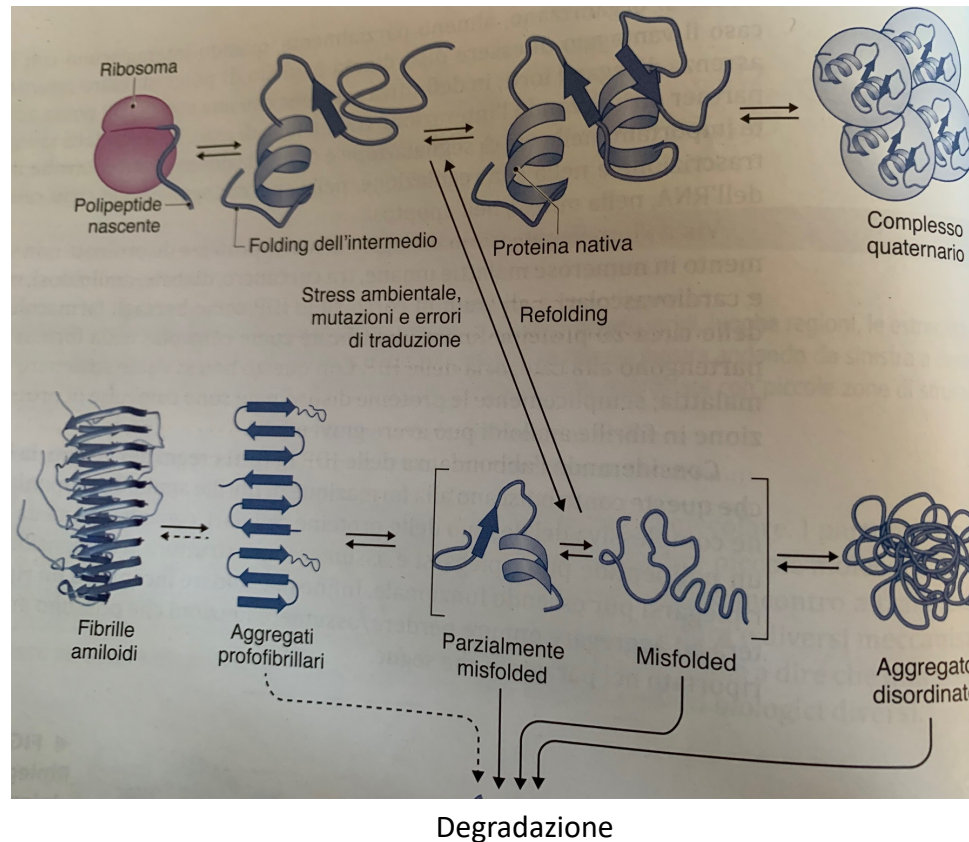
**If a residue value exceeds or matches a threshold of 0.5 the residue is considered disordered.**

- Si ritiene che una stessa IDP possa adattarsi a diverse proteine partner ottimizzando l'interazione con ognuna di esse.
- IDP: vie di trasduzione del segnale, differenziamento, trascrizione e sua regolazione, spermatogenesi, ciclo cellulare e mitosi, processamento dell'RNA, apoptosi.
- Non sorprende il loro coinvolgimento in patologie umane, tra cui cancro, diabete, malattie neurodegenerative e cardiovascolari.
- Studi in corso sulle IDP come bersagli farmacologici.
- Alcune proteine coinvolte nella formazione delle fibrille amiloidi appartengono alla categoria delle IDP.



# Patologie derivanti dal ripiegamento scorretto

- Le proteine possono aggregare in complessi insolubili con diversi tipi di organizzazione strutturale, da completamente amorfi o quasi ad aggregati altamente ordinati come le fibrille amiloidi.
- Le fibrille amiloidi sono strutture altamente ordinate contenenti foglietti  $\beta$  disposti in modo perpendicolare all'asse della fibrilla.



- Le proteine che danno origine a fibrille non sono correlate nella loro sequenza, possono essere proteine globulari con diversa struttura secondaria oppure proteine disordinate.
- Il prerequisito per la formazione di fibrille è rappresentato da forti cambiamenti conformazionali.



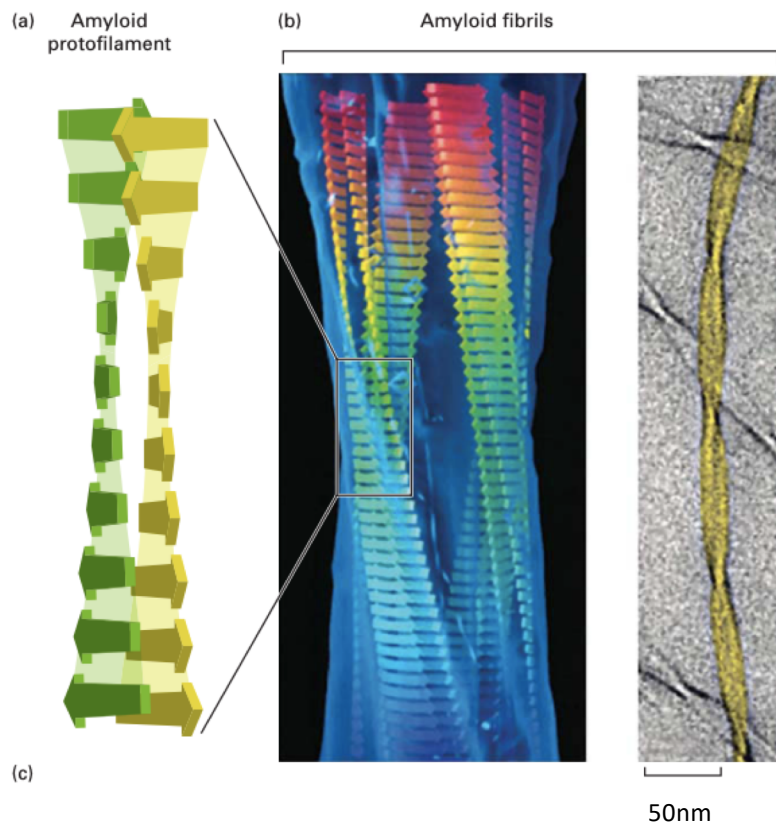
# Gli aggregati amiloidi e le malattie ad essi associati

- Molte proteine vanno incontro a modificazioni conformazionali che le portano a formare **aggregati** denominati **amiloidi**, caratterizzati da notevole citotossicità.
- A livello molecolare, la formazione di tali aggregati può essere favorita da uno o più dei seguenti fattori:
  - 1) mutazioni del gene codificante e conseguente cambiamento della sequenza amminoacidica;
  - 2) concentrazione intracellulare anormalmente elevata della proteina implicata;
  - 3) formazione di prodotti di frammentazione di una proteina a seguito di proteolisi limitata; i peptidi risultanti mostrano generalmente una propensione ad aggregare molto maggiore della proteina da cui derivano;
  - 4) perdita di efficienza del sistema intracellulare di controllo di qualità delle proteine (= chaperoni + proteasoma), tipicamente correlata all'invecchiamento cellulare.

# Aggregazione proteica

- Le proteine «foldate» in modo anomalo possono formare amiloidi che sono implicati nelle malattie. Le proteine in specifiche condizioni passano da una forma solubile ad aggregati fibrillari altamente ordinati.
- Dopo la sua sintesi, una proteina può «foldarsi» in una struttura tridimensionale anomala a causa di mutazioni, modifiche covalenti inadeguate o alterazioni di pH o fisiche (ad es. calore) nel suo ambiente.
- Un'alterazione del «folding» o una denaturazione della proteina può portare a una perdita della normale funzione della proteina che quindi come conseguenza può essere inviata alla sua degradazione proteolitica.
- Quando la degradazione è incompleta o non riesce a tenere il passo con la produzione di proteine mal ripiegate, le proteine non correttamente «foldate» o i suoi frammenti proteolitici possono accumularsi all'interno o all'esterno delle cellule formando degli aggregati o placche, in vari organi (comprese le articolazioni) tra cui il fegato, il miocardio e il cervello.

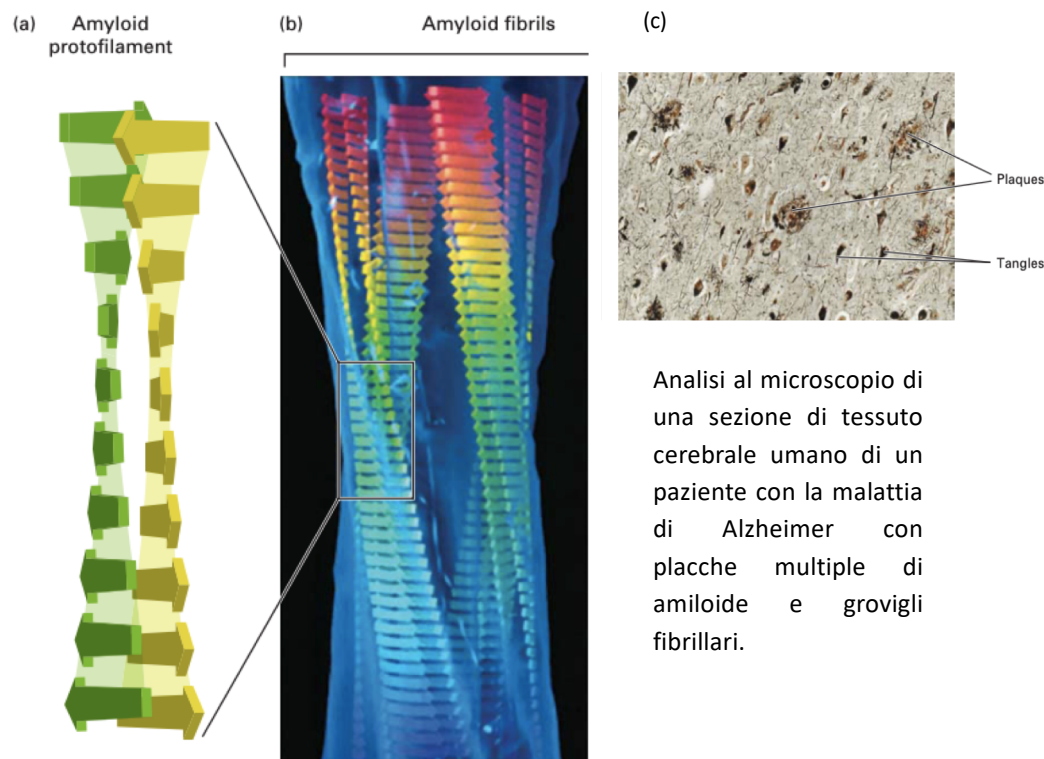
# Le fibrille amiloidi



- Gli aggregati possono essere amorfi o avere una struttura ben organizzata, che è lo stato amiloide.
- Le fibre amiloidi sono strutture altamente ordinate contenenti foglietti  $\beta$  disposti in modo perpendicolare all'asse della fibrilla.
- Le fibrille amiloidi hanno una struttura comune: “**cross- $\beta$ -sheet**”.
- In termini strutturali gli aggregati amiloidi si presentano come assemblaggi di catene polipeptidiche (un numero di protofilamenti) che si associano mediante legami idrogeno tra le catene principali di polipeptidi adiacenti ( $-\text{C}=\text{O}$  di una catena e  $-\text{N}-\text{H}$  della catena adiacente).
- Essi formano **foglietti  $\beta$  intermolecolari** che a causa della loro specifica geometria espongono verso l'esterno le catene laterali.
- L'associazione di molte catene polipeptidiche porta alla formazione di **fibrille** che hanno una struttura chiamata “**cross  $\beta$ -sheet**”. Il termine “cross” sta ad indicare che le catene polipeptidiche attraversano la fibra da un margine all'altro, con un orientamento approssimativamente perpendicolare al suo asse.

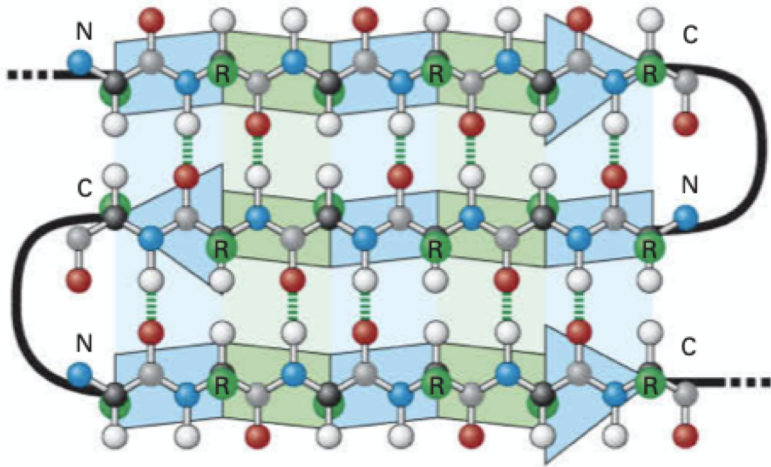
# Struttura degli aggregati amiloidi

- (a) Nei segmenti non «foldati» di proteine e polipeptidi, i segmenti esposti lunghi 6-12 residui (frecche piatte corte) possono assemblarsi in foglietti  $\beta$  in cui ciascun foglietto  $\beta$  è orientato quasi perpendicolarmente all'asse lungo (verticale in questa figura) del risultante proto-filamento e associato mediante legami idrogeno agli «strand» che si trovano sopra e sotto.
- (b) Due foglietti  $\beta$  si impacchettano strettamente e si attorcigliano per formare proto-filamenti amiloidi, che poi si assemblano in filamenti più spessi chiamati fibrille amiloidi. Le fibrille amiloidi possono essere composte da un numero variabile di proto-filamenti.
- (c) Le fibrille possono aggregarsi in placche e grovigli macroscopici che si depositano nei tessuti e, opportunamente colorati, possono essere visibili con la microscopia ottica.

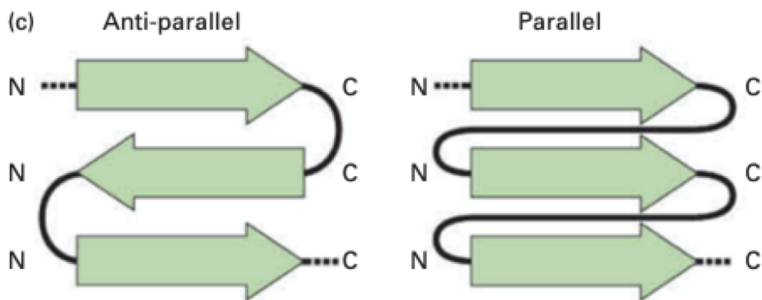
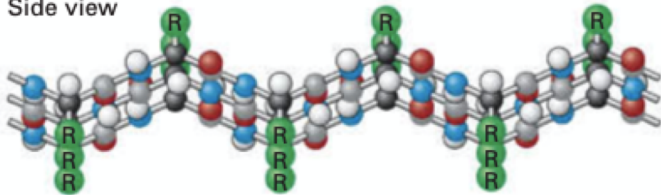


Analisi al microscopio di una sezione di tessuto cerebrale umano di un paziente con la malattia di Alzheimer con placche multiple di amiloide e grovigli fibrillari.

(a) Top view



(b) Side view



## I filamenti spessi sono chiamati fibrille amiloidi

- All'interno di ciascun proto-filamento i foglietti  $\beta$  possono essere paralleli, i cui singoli foglietti (orientamenti da N a C rappresentati da frecce) puntano verso la stessa direzione (a destra), oppure antiparalleli, in cui i foglietti si alternano in direzioni opposte (a sinistra).
- La maggior parte delle amiloidi sono la conseguenza dell'errato ripiegamento delle proteine.
- Gli amiloidi sono stati inizialmente riconosciuti negli aggregati proteici che si depositano nei tessuti, sono resistenti alla degradazione enzimatica e sono associati a malattie, chiamate **amiloidosi** (tra cui morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson nell'uomo e l'encefalopatia spongiforme trasmissibile nelle mucche e negli ovini).

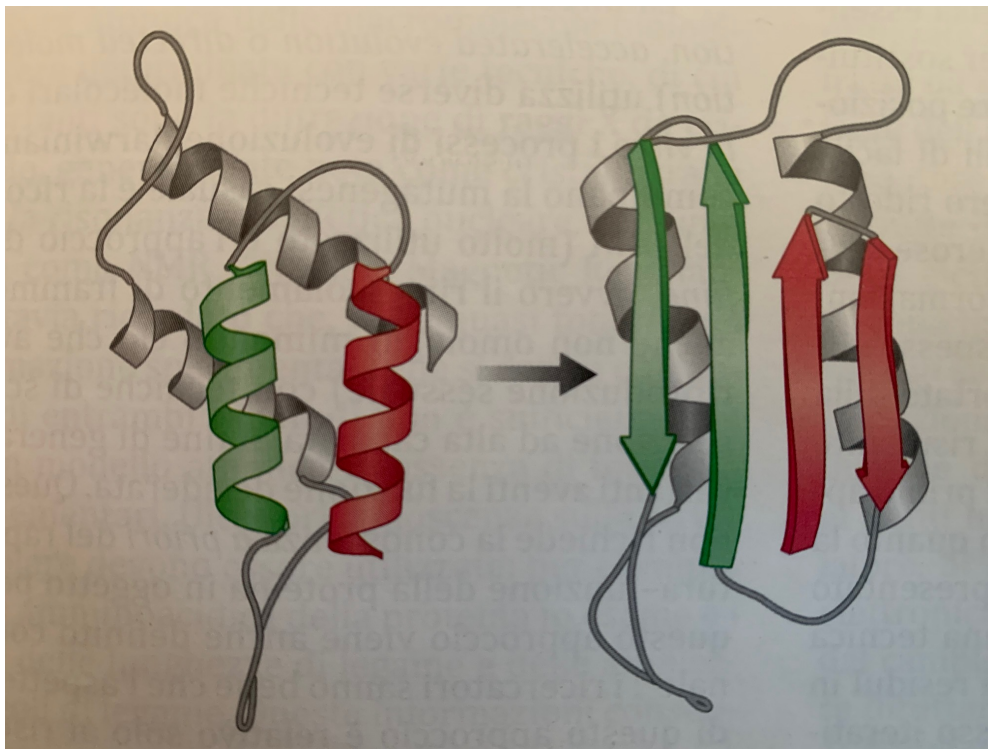
# Le fibrille amiloidi

- Le fibrille amiloidi si verificano più comunemente con l'invecchiamento, tuttavia, mutazioni nei geni che codificano per le proteine possono causare l'aggregazione della proteine e possono provocare una formazione amiloide precoce e l'insorgenza della malattia.
- Nella malattia di Alzheimer, una forma iper-fosforilata della proteina tau, una proteina legante i microtubuli, forma fibre intrecciate chiamate "grovigli". Questi amiloidi, come proto-filamenti relativamente corti e solubili in acqua o come fibrille lunghe e insolubili, sono ritenuti tossici e contribuiscono direttamente allo sviluppo della patologia.
- Nella malattia di Alzheimer gli aggregati sono costituiti da uno stesso polipeptide chiamato A $\beta$ 42. Questo deriva da una normale proteina cellulare di membrana chiamata precursore del peptide  $\beta$ -amiloide (AAP) che, dopo essere stata tagliata da particolari proteasi, si distacca dalla membrana e si converte in una struttura  $\beta$  e forma aggregati insolubili che sono le placche amiloidi.

- L'interesse verso queste forme di aggregazione deriva dalla loro associazione a importanti malattie umane quali Alzheimer, il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington, oltre alle malattie da prioni.
- Un caso particolare è rappresentato dalle malattie da prioni, a questa patologia appartiene anche l'encefalopatia spongiforme bovina («patologia della mucca pazza»). L'agente patologico è una proteina presente nel cervello con una funzione ancora non ben definita, la proteina prionica o PrP.
- La proteina normale è solubile e contiene regioni estese ripiegate ad  $\alpha$ -elica. Nella forma patologica detta PrP<sup>Sc</sup> alcune di queste regioni vanno incontro a un cambiamento conformazionale verso strutture  $\beta$  che tendono ad impacciarsi strettamente e formare degli amiloidi.
- Gli aggregati possono funzionare da centri di nucleazione su cui organizzano aggregati più grandi.
- La malattia può essere trasmessa da un animale all'altro infatti durante l'epidemia della mucca pazza le proteine nella forma patogena furono trasmesse dalle pecore alle mucche tramite mangimi che contenevano materiali derivati da animali ammalati.



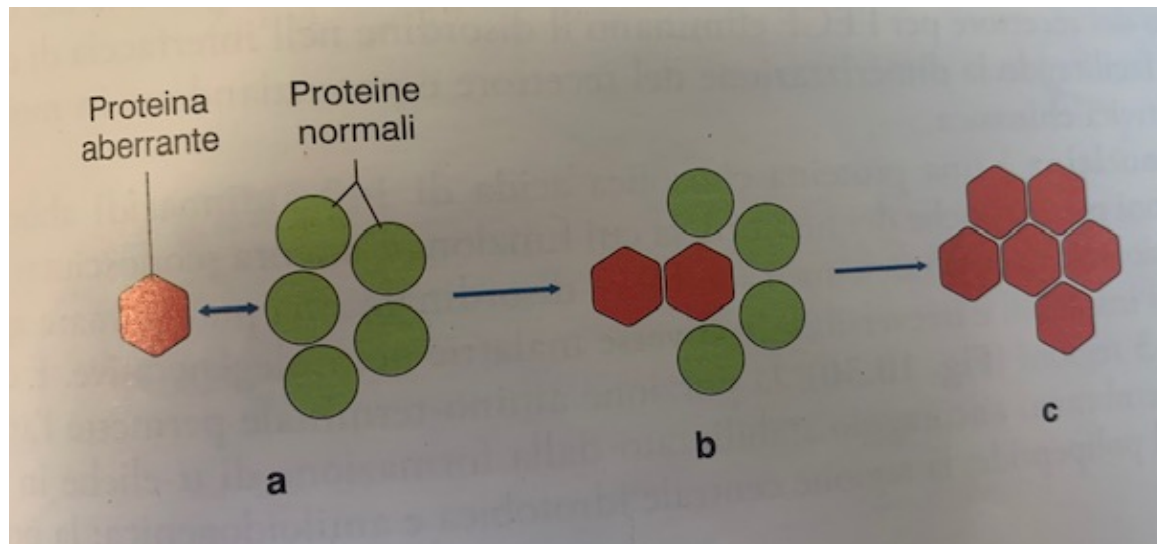
# Encefalopatia spongiforme bovina



- La proteina prionica o PrP nella forma non patologica è solubile e contiene regioni estese ripiegate ad  $\alpha$ -elica.
- Espressione a livello del sistema nervoso centrale (neuroni, cellule della microglia, astrociti, oligodendrociti) e cellule muscolari scheletriche.
- Nella forma patologica, PrP<sup>Sc</sup> alcune di queste regioni vanno incontro ad un cambiamento conformazionale verso strutture  $\beta$  che tendono ad impaccarsi strettamente e formare degli amiloidi.
- Gli aggregati possono funzionare da centri di nucleazione su cui si organizzano aggregati più grandi.
- Durante l'epidemia della mucca pazza l'epidemia si trasmissa dalle pecore alle mucche tramite mangimi che contenevano materiali derivati da animali ammalati.



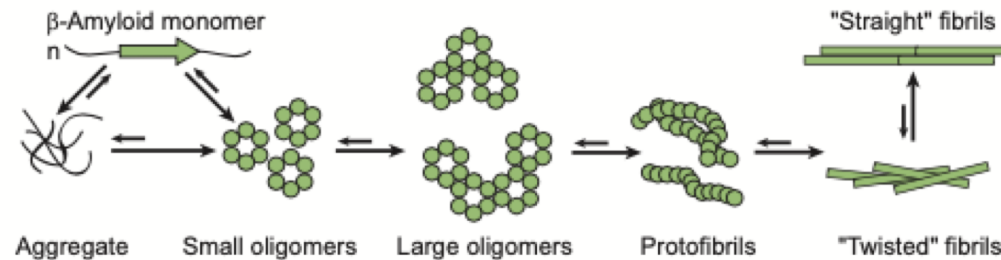
# Modello per la propagazione dei prioni



- La proteina prionica aberrante contatta la proteina normale inducendone un cambiamento conformazionale che la converte nella forma aberrante.
- L'accumulo di proteine aberranti può causare la loro aggregazione patologica

Le proteine prioniche usano un meccanismo di autoassemblaggio e possono essere trasmesse tra individui diversi. Sono proteine che possono assumere strutture diverse e si propagano inducendo un cambio di conformazione in altre molecole della stessa proteina.

# Gli oligomeri

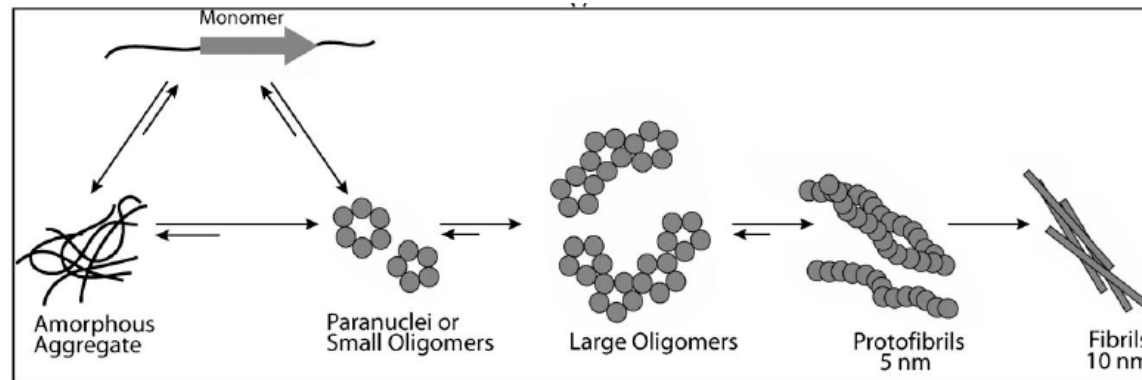


Cliff I. Stains and Indraneel Ghosh, 2007

- La formazione delle fibrille è un processo graduale che prevede inizialmente assemblaggi molto più piccoli detti **oligomeri**, che via via si accrescono a dare aggregati di sempre maggiori dimensioni.
- La formazione di oligomeri proteici è un evento chiave del processo complessivo della formazione della fibrilla amiloide ed è considerata la fase di limitazione della velocità, responsabile della fase di ritardo nella cinetica di aggregazione.
- Si ritiene che gli oligomeri siano le specie patogene associate alla formazione di amiloide nelle malattie.
- Man mano che l'importanza degli oligomeri proteici è stata sempre più rilevata, sono apparsi molti studi con informazioni sul loro meccanismo di formazione e struttura, con l'obiettivo finale di identificare i determinanti strutturali della loro patogenicità, gli eventi molecolari dell'insorgenza della malattia e gli obiettivi molecolari per la terapia intervento.

# I pathway di aggregazione amiloide

Il percorso di aggregazione dell'amiloide è un fenomeno complesso (e ancora solo parzialmente compreso), in cui emergono diversi intermedi durante il processo.



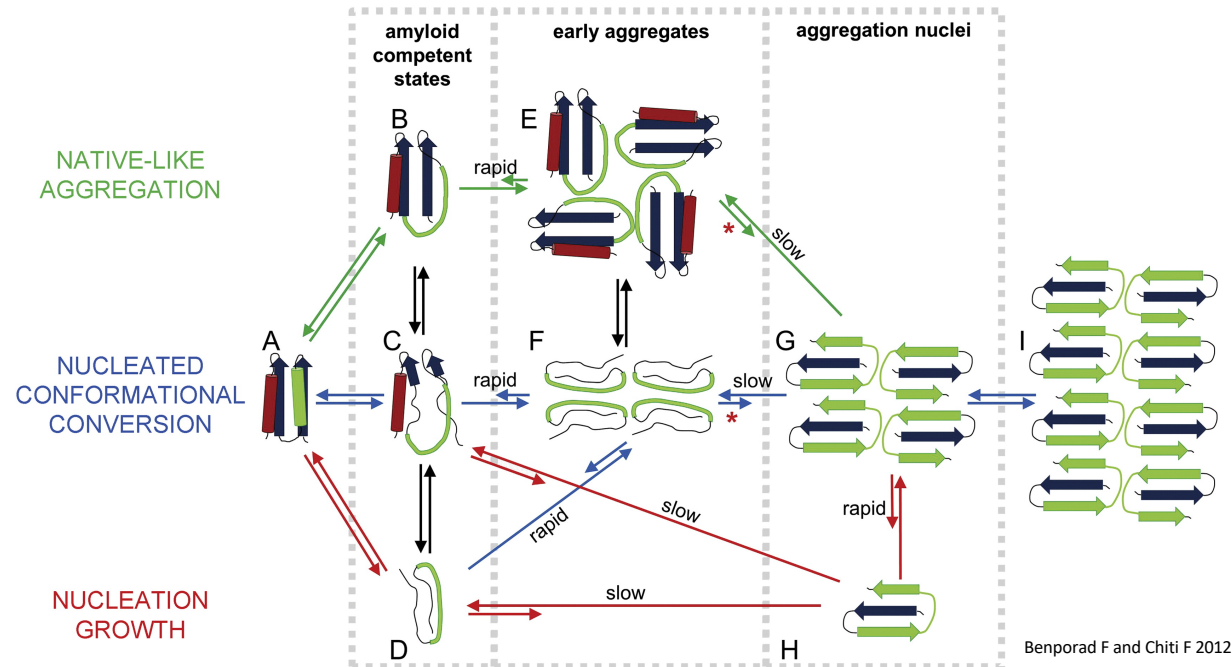
Stains et al (2007) MedChemMed 2, 1674–1692

**Monomeri:** le proteine prima dell'aggregazione amiloide (per lo più mal ripiegata o non correttamente foldate)

**Oligomeri:** una definizione generica di intermedi di aggregazione (includono: oligomeri prefibrillari, oligomeri fibrillari, protofibrille, protofilamenti, ecc.)

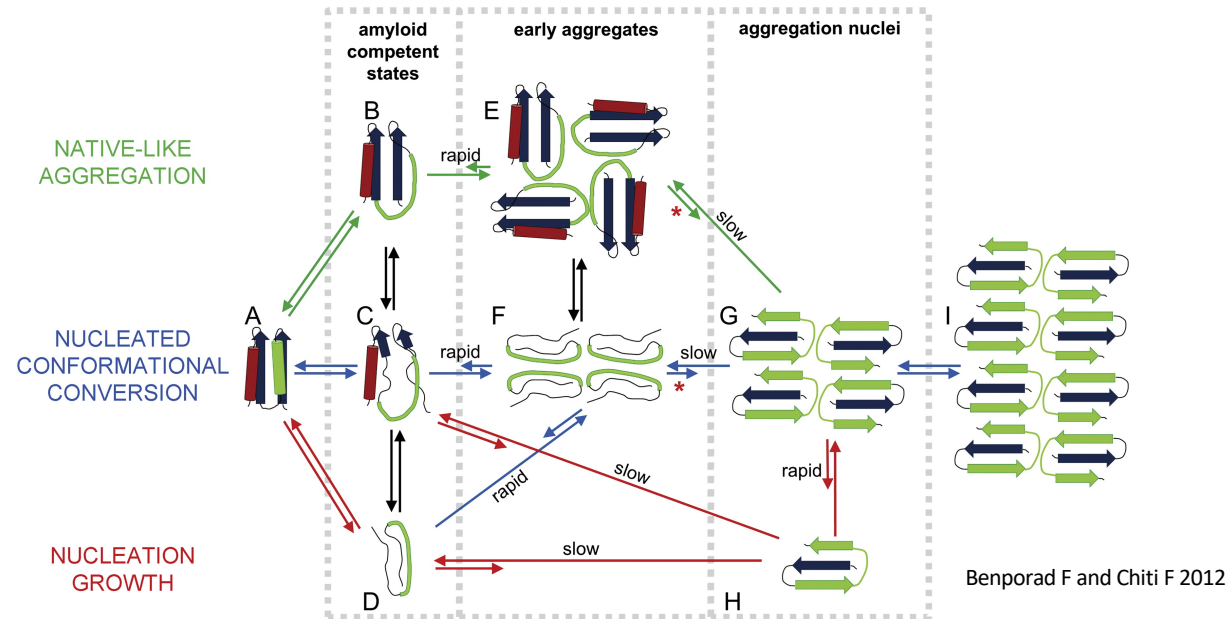
**Fibrille:** prodotti di aggregazione finali, voluminosi, insolubili

# Meccanismi che portano la formazione degli oligomeri



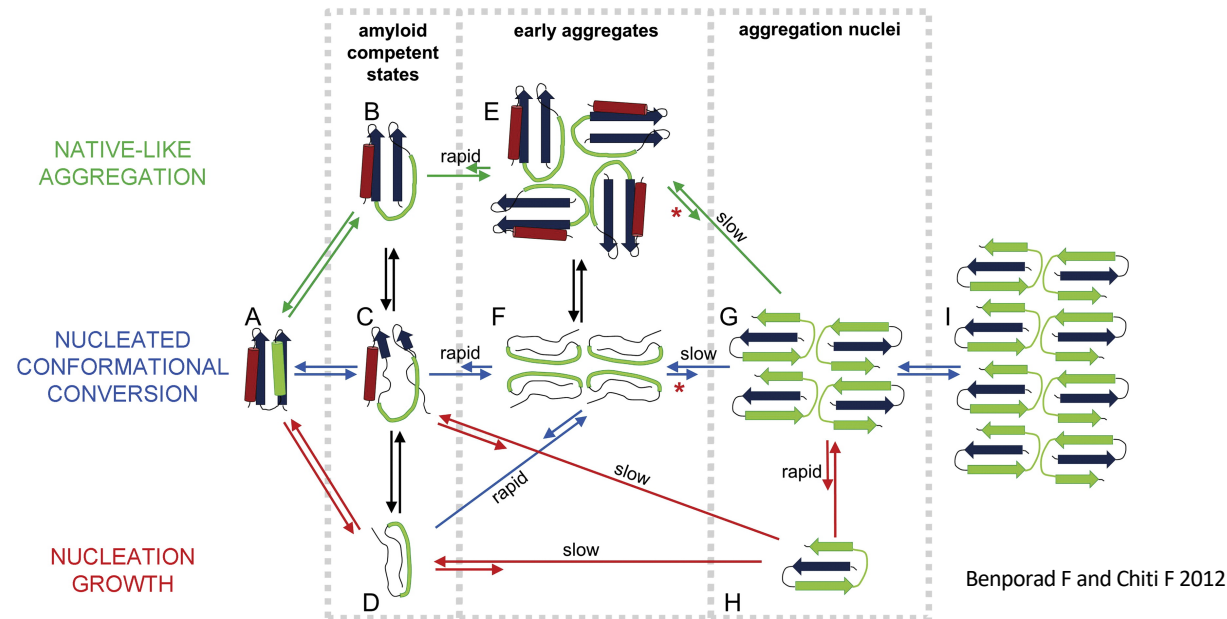
- Le proteine inizialmente popolano una **conformazione nativa (A)** in cui i segmenti pronti alla formazione di amiloidi (in verde) sono strutturati/nascosti ed incapaci di iniziare la polimerizzazione.
- Gli stati nativi possono convertire, in certe condizioni, in stati pronti all'aggregazione: **(B) aggregazione native-like; (C) stato parzialmente foldato; (D) monomero non foldato.**

# Meccanismi che portano la formazione degli oligomeri



- In queste conformazioni (**B**, **C**, **D**), i segmenti pronti all'aggregazione sono esposti al solvente, si realizzano delle interazioni intermolecolari con la formazione di aggregati precoci (percorso **B** → **E**) o aggregati di monomeri non foldati (**F**).
- Gli aggregati precoci si convertono successivamente in oligomeri amiloidogenici competenti per la formazione di fibrille (**E** → **G**).
- Il pathway che transita attraverso lo stato **native-like** (**A** → **B** → **E** → **G**; **frecche verdi**) prende il nome di **aggregazione native-like**.

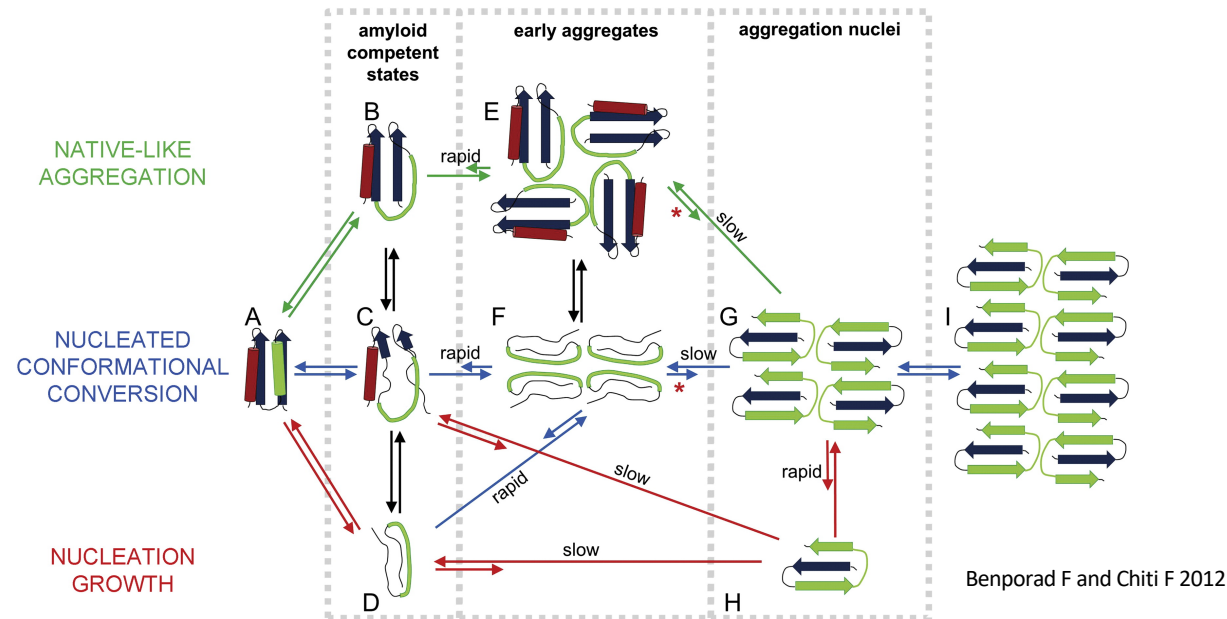
# Meccanismi che portano la formazione degli oligomeri



Uno dei meccanismi più ampiamente accettati proposti per l'assemblaggio di monomeri negli oligomeri è il meccanismo di **crescita di nucleazione**.

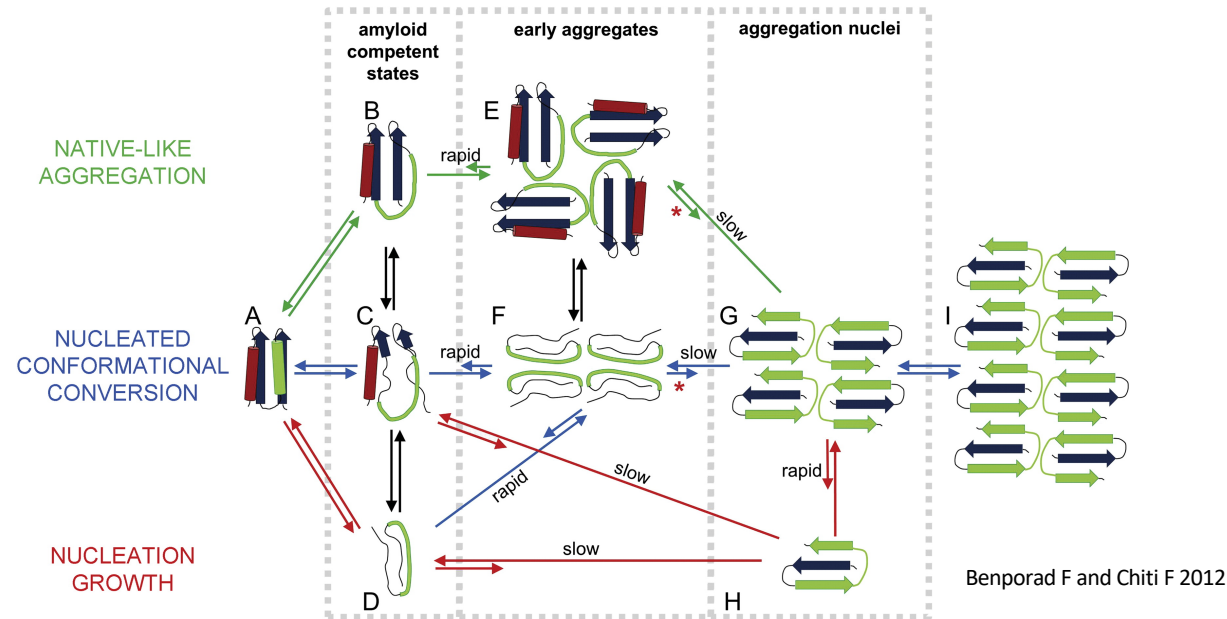
- I monomeri si convertono in un nucleo attraverso un processo termodinamicamente sfavorevole che si svolge nella fase di ritardo della cinetica di aggregazione amiloide ( $A \rightarrow D \rightarrow H \rightarrow G$ ; **freccie rosse**). Il nucleo è la specie termodinamicamente meno stabile in soluzione.
- Il nucleo funge da modello per la rapida crescita dell'aggregato amiloide attraverso l'associazione di ulteriori monomeri ( $H \rightarrow G \rightarrow I$ )

# Meccanismi che portano la formazione degli oligomeri



- I monomeri nativi inizialmente si convertono in conformazioni mal ripiegate, che avviano l'autoassemblaggio con la formazione di un oligomero fuso privo di struttura persistente ( $A \rightarrow C / D \rightarrow F$ ; **frecce blu-chiaro, nucleated conformational conversion**).
- Questa specie aggregata subisce quindi una riorganizzazione strutturale in un oligomero simile all'amiloide, che funge da nucleo ( $F \rightarrow G$ ).
- Il nucleo innesca rapidamente l'aggregazione quando altri oligomeri fusi acquisiscono la conformazione amiloide. Ciò porta alla formazione di oligomeri di ordine superiore e infine di fibrille ( $G \rightarrow I$ ).

## Meccanismi che portano la formazione degli oligomeri

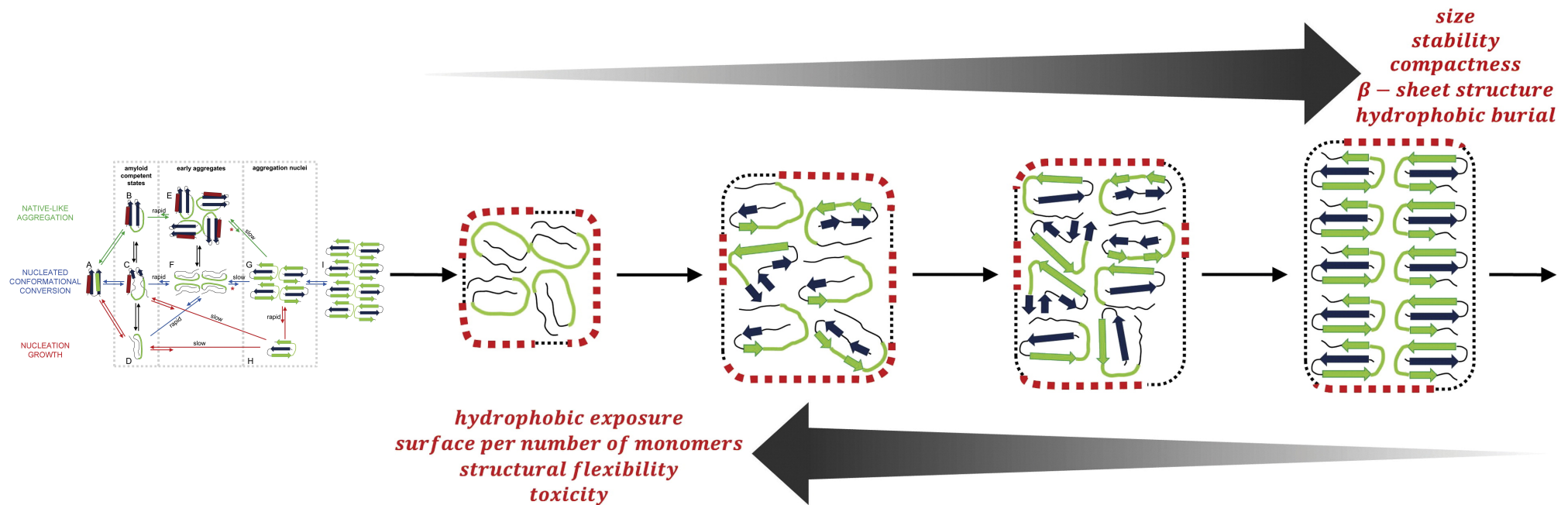


- La fase di limitazione della velocità è rappresentata dalla formazione del nucleo (**C/D → H**).
- Nel passaggio **A → G**, gli oligomeri si formano rapidamente e la fase di limitazione della velocità è la conversione dell'oligomero ripiegato male nell'oligomero amiloide (**F → G**).
- Gli asterischi rossi indicano i due step (**E → G**, **F → G**) la cui rimozione impedisce la formazione di fibrille amiloidi.



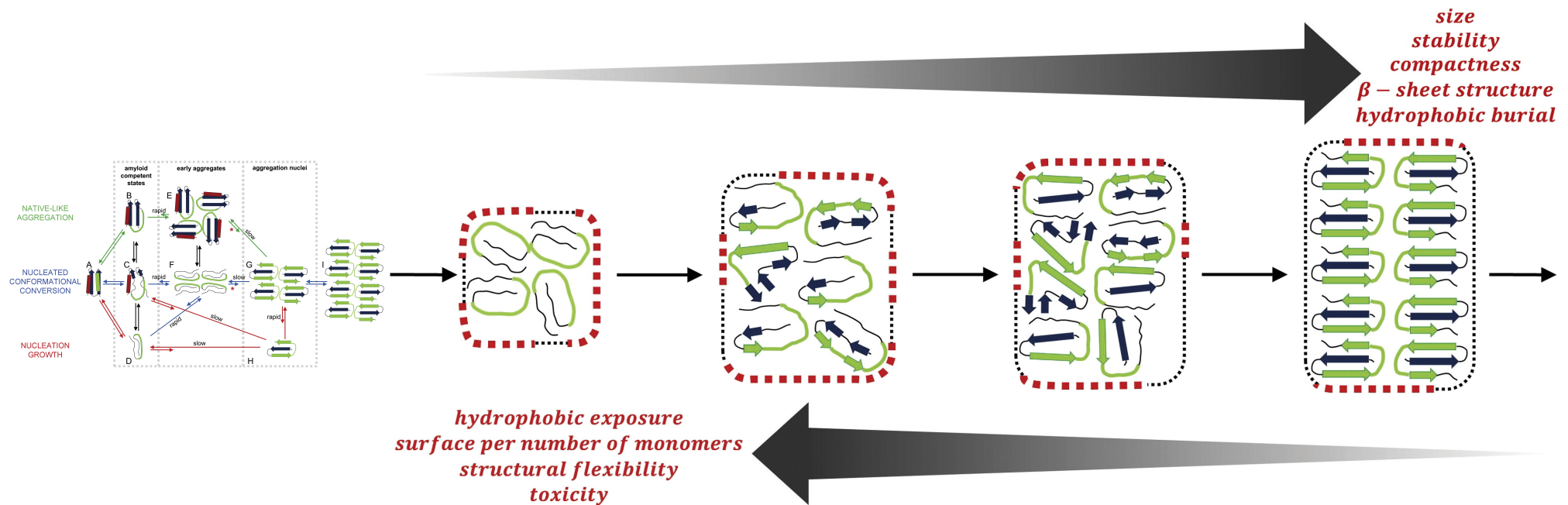
- E' stato osservato mediante esperimenti *in vitro* che la formazione di oligomeri da parte di una proteina può avvenire attraverso percorsi diversi.
- Un determinato percorso può essere facilitato da cambiamenti nei parametri della soluzione come pH e concentrazione proteica o introducendo mutazioni geniche. L'aggregazione può procedere anche attraverso percorsi concorrenti che si verificano contemporaneamente nello stesso campione.
- La cosa importante è che le differenze nei percorsi implicano differenze nella morfologia, dimensioni e compattezza degli oligomeri risultanti.
- Percorsi alternativi differiscono per lo stadio in cui si verifica la conversione da una conformazione non amiloide a una amiloide.
- I modelli descritti potrebbero essere i casi limite di uno scenario più complicato in cui più percorsi sono accessibili e selezionati a seconda delle condizioni.

# Riarrangiamenti strutturali durante la formazione degli oligomeri



- Mentre l'aggregazione procede hanno luogo una serie di riarrangiamenti strutturali.
- All'inizio alta esposizione di segmenti idrofobici per numero di monomeri, flessibilità strutturale e tossicità.
- Il legame dei monomeri a formare i primi oligomeri può avvenire in tutte le direzioni, mentre gli oligomeri tardivi possono legarsi solo ai monomeri che si trovano ai bordi.
- Alla fine del processo si formano le fibrille amiloidi con strutture  $\beta$ -sheet.

# Riarrangiamenti strutturali durante la formazione degli oligomeri



1. Mentre l'aggregazione procede gli oligomeri subiscono un riarrangiamento continuo della struttura.
2. Questa riorganizzazione comporta un aumento di dimensioni, compattezza e regolarità della struttura dei foglietti  $\beta$ . Anche una diminuzione delle fluttuazioni dinamiche, dell'esposizione di cluster idrofobici per numero di monomeri.

## La tossicità degli oligomeri

- L'esposizione idrofobica sulla superficie dell'aggregato sembra essere un importante fattore determinante della tossicità mediata dagli oligomeri.
- **La tossicità è dovuta alla esposizione delle catene laterali idrofobiche.** Proprio per questa loro caratteristica, *gli assemblaggi più tossici sono quelli oligomerici, di piccole dimensioni, in quanto a parità di massa hanno una maggiore superficie esposta*
- Le fibrille amiloidi sono invece relativamente prive di tossicità, per la minore superficie esposta a parità di massa, e probabilmente anche in quanto formano grossi ammassi incapaci di diffondere e di raggiungere i siti dove le superfici idrofobiche esposte possono esercitare i loro effetti citotossici.

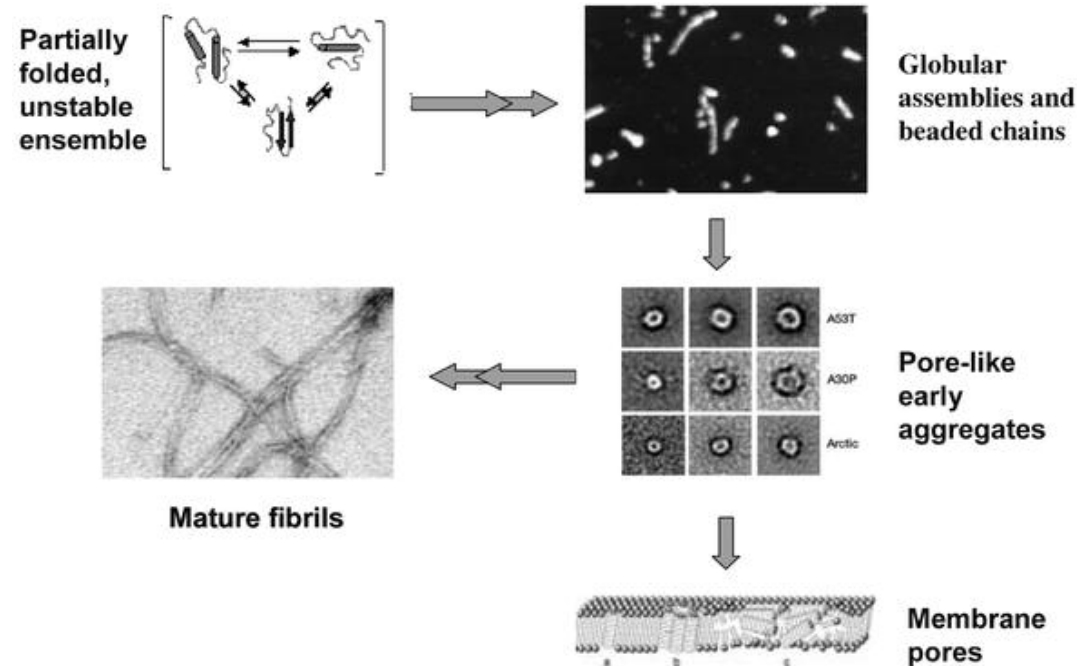
# La tossicità degli oligomeri

## Quali sono i meccanismi che causano citotossicità?

- 1) Stimolazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Si considera che gli aggregati modifichino lo stato redox intracellulare ed una modifica dello stato redox intracellulare è associata ad un forte aumento della quantità di ROS (specie reattive dell'ossigeno) (è stato anche dimostrato che le cellule possono essere protette dalla tossicità degli aggregati mediante il trattamento con antiossidanti come tocoferolo, acido lipoico e glutathione ridotto).
- 2) perturbazione delle funzioni delle proteine associate a membrane e della permeabilità delle membrane. Lo stress ossidativo intracellulare potrebbe essere correlato alla destabilizzazione delle membrane cellulari da parte di specie tossiche che porta ad una mancata regolazione delle proteine della membrana plasmatica come recettori e pompe ioniche e/o alla compromissione della funzione mitocondriale.

- 3) Secondo l'Ipotesi canale", gli aggregati oligomerici tossici formerebbero "pori" aspecifici nelle membrane delle cellule bersaglio, con profondi squilibri nell'omeostasi ionica (soprattutto del calcio), che condurrebbero le cellule a morte. I mitocondri svolgono un ruolo ben riconosciuto nello stress ossidativo e nell'apoptosi; un fattore chiave nella neurotossicità del peptide A $\beta$ 42 (AD) potrebbe essere l'apertura dei pori mitocondriali, l'ingresso di Ca<sup>2+</sup> nei mitocondri neuronali seguito dal rilascio di citocromo c, un forte induttore dell'apoptosi.
- 4) L'intero processo potrebbe essere amplificato dallo stress ossidativo in quanto quest'ultimo provoca danni alle pompe ioniche di membrana. Inoltre, lo stress ossidativo può essere esso stesso citotossico in quanto provoca danni alle proteine, portando così alla condizione nota come "sovraccarico di chaperone".

**La maggior parte dei meccanismi suggeriti sono correlati alle interazioni idrofobiche degli oligomeri con le membrane cellulari**



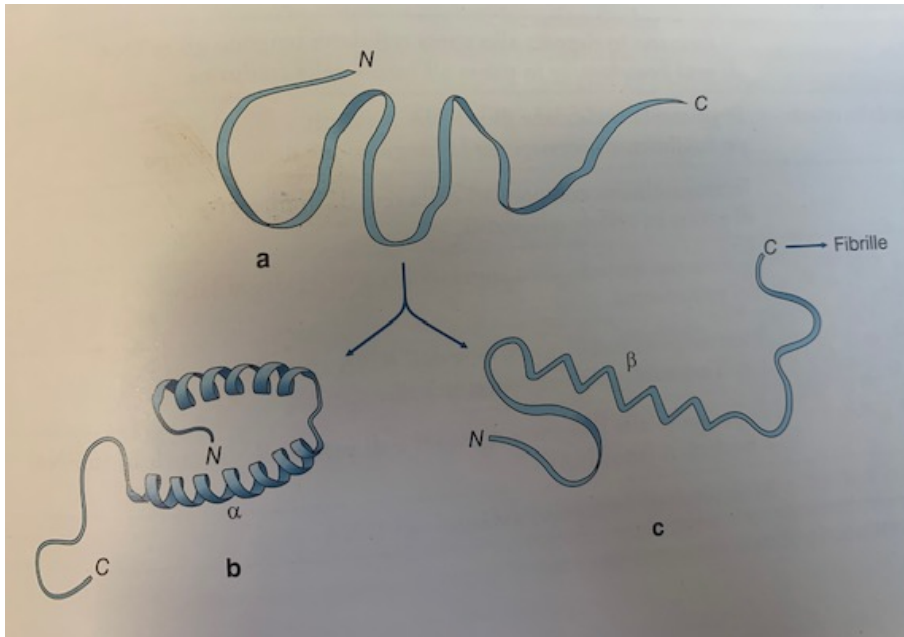
Alcuni peptidi/proteine legati all'amiloide formano i primi aggregati globulari che si organizzano ulteriormente in catene globulari che infine danno protofilamenti e fibrille mature. Gli aggregati pre-fibrillari possono interagire con le membrane cellulari dove formano canali aspecifici (pori) che interrompono l'omeostasi cellulare.

## Aggregati amiloidi associati a malattie neurodegenerative

Disease	Main aggregate component
Alzheimer's disease	A $\beta$ peptides (plaques); tau protein (tangles)
Spongiform encephalopathies	Prion (whole or fragments)
Parkinson's disease	$\alpha$ -synuclein (wt or mutant)
Primary systemic amyloidosis	Ig light chains (whole or fragments)
Secondary systemic amyloidosis	Serum amyloid A (whole or 76-residue fragment)
Fronto-temporal dementias	Tau (wt or mutant)
Senile systemic amyloidosis	Transthyretin (whole or fragments)
Familial amyloid polyneuropathy I	Transthyretin (over 45 mutants)
Hereditary cerebral amyloid angiopathy	Cystatin C (minus a 10-residue fragment)
Haemodialysis-related amyloidosis	$\beta_2$ -microglobulin
Familial amyloid polyneuropathy III	Apolipoprotein AI (fragments)
Finnish hereditary systemic amyloidosis	Gelsolin (71 amino acid fragment)
Type II diabetes	Amylin (fragment)
Medullary carcinoma of the thyroid	Calcitonin (fragment)
Atrial amyloidosis	Atrial natriuretic factor
Hereditary non-neuropathic systemic amyloidosis	Lysozyme (whole or fragments)
Injection-localised amyloidosis	Insulin
Hereditary renal amyloidosis	Fibrinogen $\alpha$ -A chain, transthyretin, apolipoprotein AI, apolipoprotein AII, lysozyme, gelsolin, cystatin C
Amyotrophic lateral sclerosis	Superoxide dismutase 1 (wt or mutant)
Huntington's disease	Huntingtin
Spinal and bulbar muscular atrophy	Androgen receptor [whole or poly(Q) fragments]
Spinocerebellar ataxias	Ataxins [whole or poly(Q) fragments]
Spinocerebellar ataxia 17	TATA box-binding protein [whole or poly(Q) fragments]



# $\alpha$ -sinucleina



La struttura di  $\alpha$ -sinucleina è sensibile a variazioni di condizioni ambientali o a mutazioni che facilitano la formazione di aggregati. Proteina «camaleonte» che assume diverse conformazioni tridimensionali molto differenti tra loro che includono uno stato disordinato di base, una conformazione amiloidogena parzialmente strutturata e diversi tipi di strutture con elementi ad  $\alpha$ -elica o di tipo  $\beta$ , sia in forma monomerica sia oligomerica.

- $\alpha$ -sinucleina è una proteina di 140 aa, abbondante nelle regioni presinaptiche dei neuroni (coinvolta probabilmente nella trasmissione dei segnali ma la funzione esatta è ancora sconosciuta).
- In condizioni fisiologiche è solubile e disordinata ma può formare aggregati amiloidi insolubili e irreversibili che causano neurodegenerazione (PD).
- E' caratterizzata da tre regioni: la porzione ammino-terminale che permette l'ancoraggio alla membrana, stabilizzato dalla formazione di  $\alpha$ -eliche; la regione centrale idrofobica e amiloidogena; la porzione carbossi-terminale che inibisce la formazione di strutture amiloidi da parte di questa proteina.

**Forforilazione di S129 determina l'aggregazione**

## La tossicità degli oligomeri

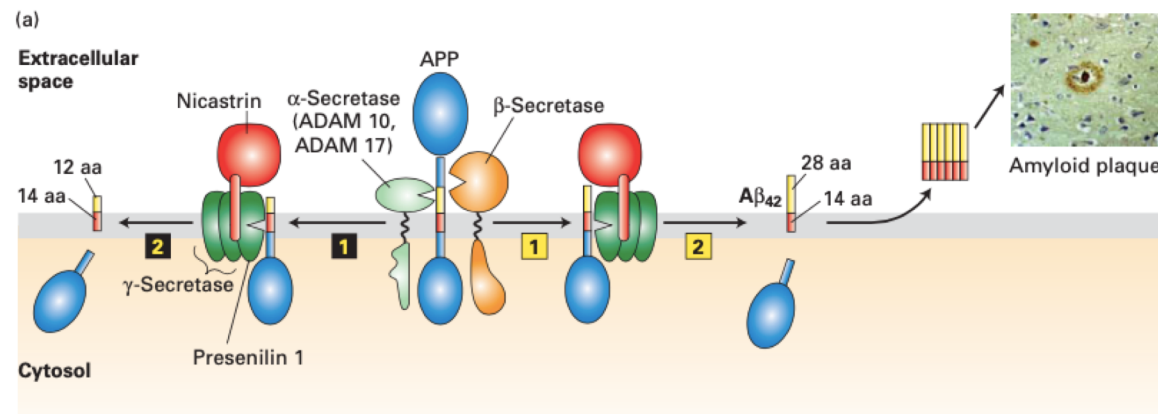
- Per la  $\alpha$ -sinucleina, che causa la malattia di Parkinson, è stato recentemente proposto che gli oligomeri sferici che crescono sul bordo della membrana catturano i lipidi dalla membrana, causando un'interruzione della membrana.
- La formazione di canali porta necessariamente al livellamento almeno parziale dei gradienti ionici in corrispondenza delle membrane. Questo fenomeno ha un rilievo particolare nel caso degli **ioni calcio** (concentrazioni 0.1-1  $\mu\text{M}$  intracellulare; concentrazioni dell'ordine del mM extracellulare). Alte concentrazioni intracellulari di tale ione hanno un marcato effetto citotossico, in quanto il calcio è un forte precipitante delle proteine.

# La malattia di Alzheimer (AD)

- La malattia di Alzheimer è stata descritta per la prima volta nel 1906 dal neuropatologo Alois Alzheimer (1863-1915) che osservò, in un paziente relativamente giovane affetto da demenza senile, grumi anomali nella corteccia, che chiamò placche di amiloide (cioè simili all'amido). Tali depositi si sono dimostrati successivamente essere **proteici**.
- Nel 1910 la malattia ebbe un nome, quando Emil Kraepelin, il più famoso psichiatra di lingua tedesca dell'epoca, pubblicò il suo trattato "**Psichiatria**", nel quale definiva una nuova forma di demenza scoperta da Alzheimer, chiamandola **malattia di Alzheimer**.
- In Europa si stima che la demenza di Alzheimer (DA) rappresenti il 54% di tutte le demenze con una prevalenza nella popolazione ultrasessantacinquenne del 4,4%. La prevalenza di questa patologia aumenta con l'età e risulta maggiore nelle donne.
- Oltre gli 80 anni, la patologia colpisce 1 individuo su 4. Questi numeri sono destinati a crescere drammaticamente a causa del progressivo aumento della durata della vita.

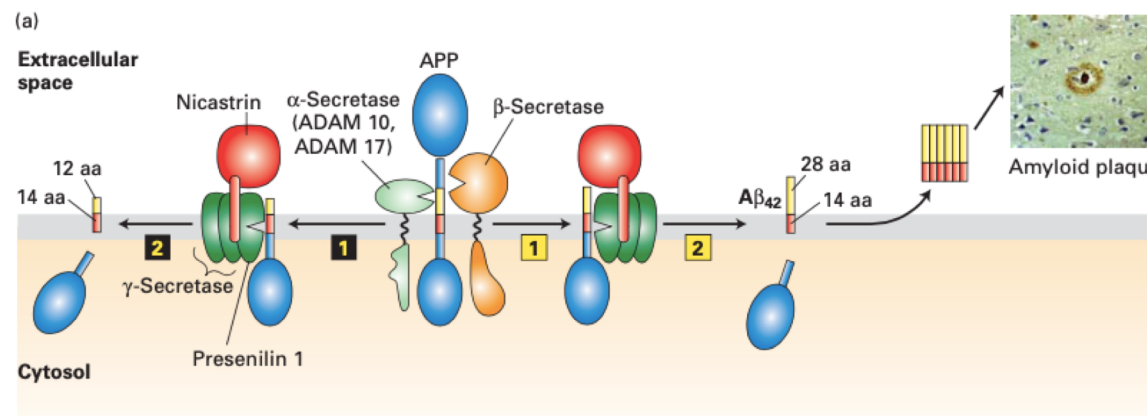
# Accumulo di placche amiloidi

- Un importante cambiamento patologico associato alla malattia di Alzheimer è l'accumulo nel cervello di placche amiloidi contenenti aggregati di un piccolo peptide di 42 aminoacidi chiamato peptide beta amiloide ( $A\beta_{42}$ ).
- Questo peptide è derivato dalla scissione proteolitica della proteina precursore dell'amiloide (APP), una proteina transmembrana della superficie cellulare.
- La proteina precursore della beta-amiloide (APP) è una proteina complessa che svolge diverse funzioni. Non si trova solo a livello dei neuroni ma anche a livello della membrana di cellule presenti in tutto il corpo.
- La proteina intera è un recettore coinvolto nella trasduzione del segnale mediata da proteine G.
- E' in grado di legarsi a molte molecole strutturali che si trovano sulla superficie delle cellule, come eparina e laminina, e quindi può giocare un ruolo nell'adesione cellulare.

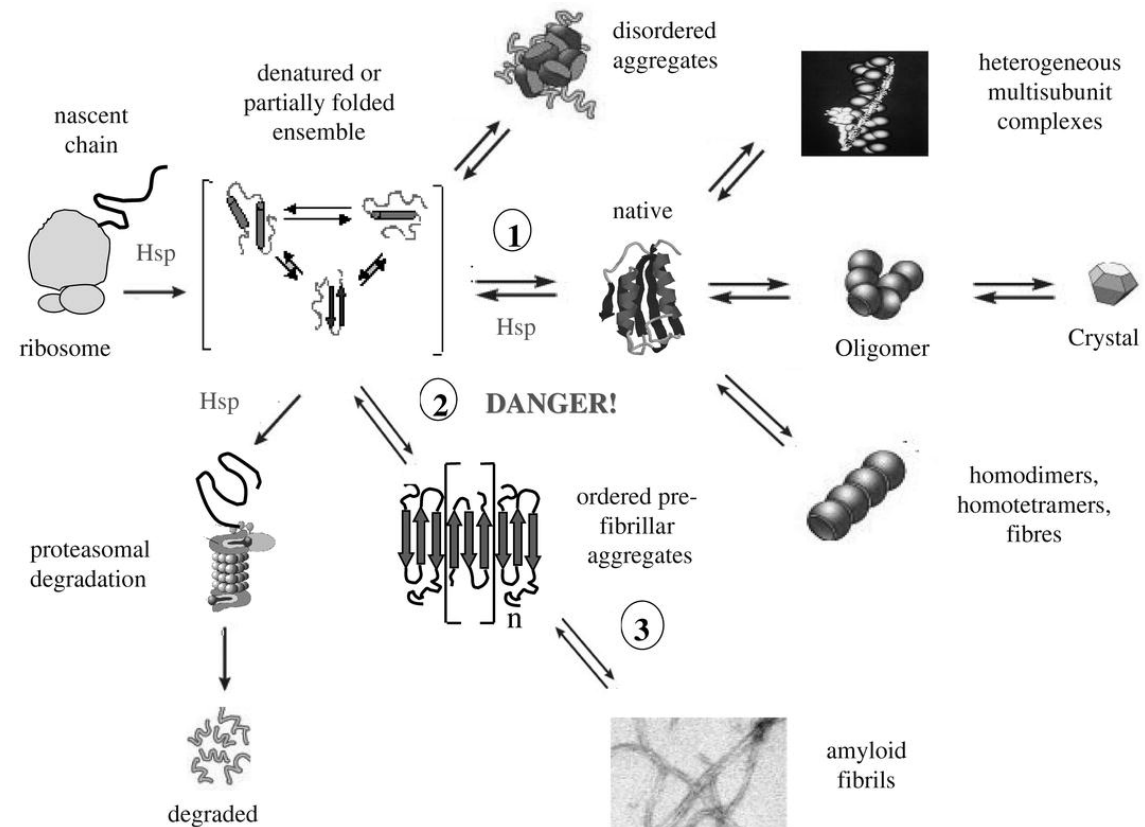


# Accumulo di placche amiloidi

- La scissione proteolitica sequenziale di  $\alpha$ -secretasi (ADAM 10 o ADAM 17) e  $\gamma$ -secretasi produce un peptide innocuo incorporato nella membrana di 26 amminoacidi, che non è associato alla malattia di Alzheimer.
- La scissione nel dominio extracellulare di APP da parte della  $\beta$ -secretasi seguita dalla scissione all'interno della membrana da parte della  $\gamma$ -secretasi genera il peptide 42-amminoacidi (peptide beta-amiloide  $A\beta_{42}$ ) che forma spontaneamente gli oligomeri e le grandi placche amiloidi presenti nel cervello dei pazienti con malattia di Alzheimer.
- Alcuni casi di malattia familiare di Alzheimer coinvolgono mutazioni missenso nella presenilina 1, la subunità catalitica della  $\gamma$ -secretasi, con conseguente aumento della formazione del peptide  $A\beta_{42}$ , portando alla formazione di placche e infine alla morte dei neuroni.

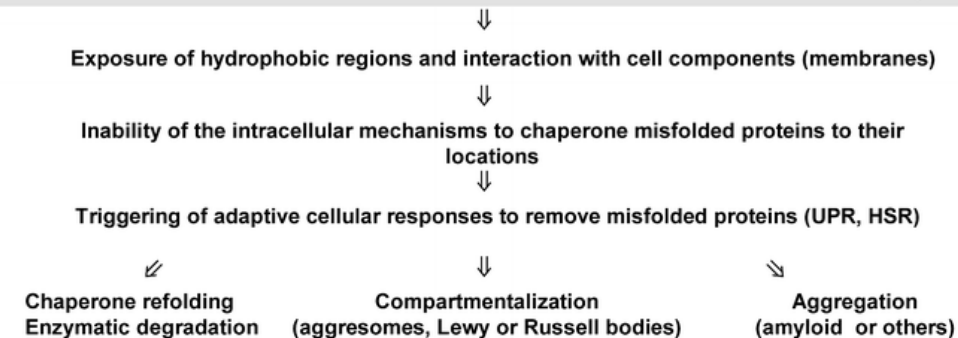


# Protein aggregation in the physiological context

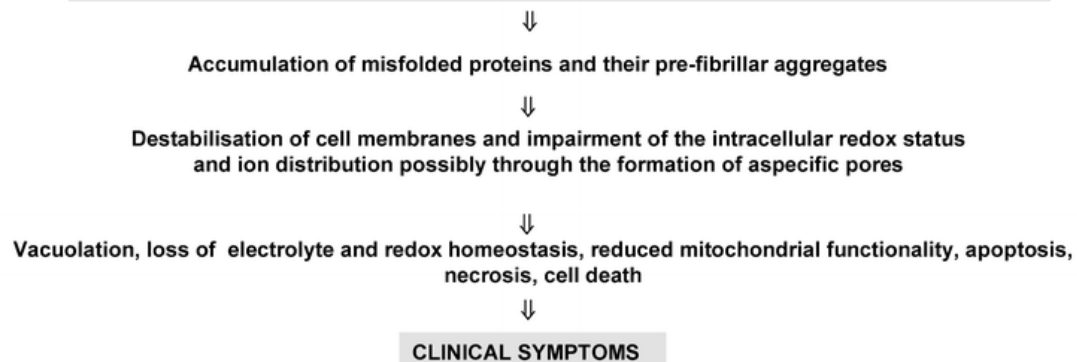


Stefani, M. & Dobson, C.M. (2003) *J. Mol. Med.* 81, 678-699.

**PRODUCTION OF MISFOLDED PROTEINS OR PEPTIDES DUE TO GENETIC VARIANTS, MUTATIONS AND/OR CHANGES OF THE INTRACELLULAR CONDITIONS (AGEING)**

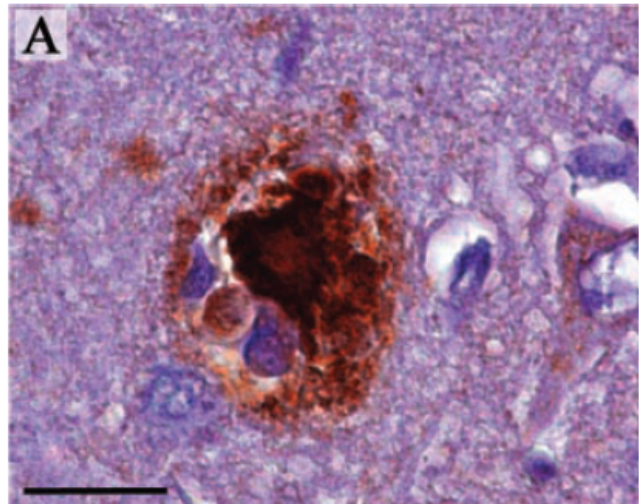


### IMPAIRMENT OF THESE MECHANISMS, CHAPERONE OVERLOAD



- La presenza di proteine non foldate a causa di mutazioni o perturbazioni delle condizioni intracellulari aumenta durante la senescenza cellulare.
- Un accumulo di aggregati amiloidi nella forma di aggregati prefibrillari determina la destabilizzazione delle membrane cellulari a causa dell'esposizione di domini idrofobici e della loro interazione con le membrane cellulari.
- Conseguente alterazione dell'omeostasi redox e formazione di canali aspecifici di membrana con riduzione della funzionalità mitocondriale e morte cellulare.

# Depositi amiloidi

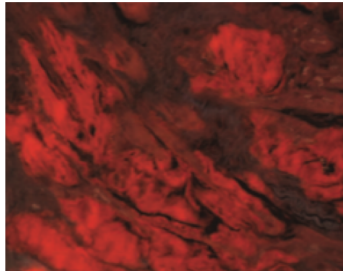


Aguzzi, A. & Haass, C (2003) *Science* 302, 815-818.

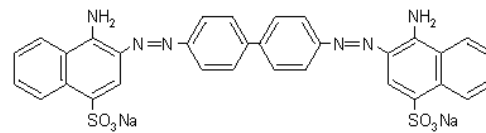


# Come si riconoscono gli aggregati amiloidi

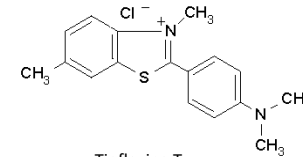
Congo red stain under light microscopy



Siegismund et al 2017



Congo red

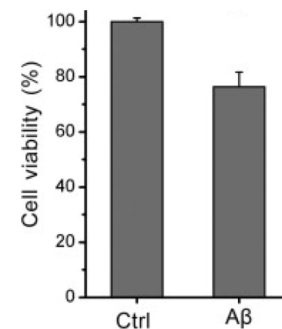
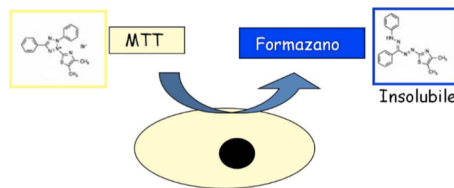


Tioflavina T

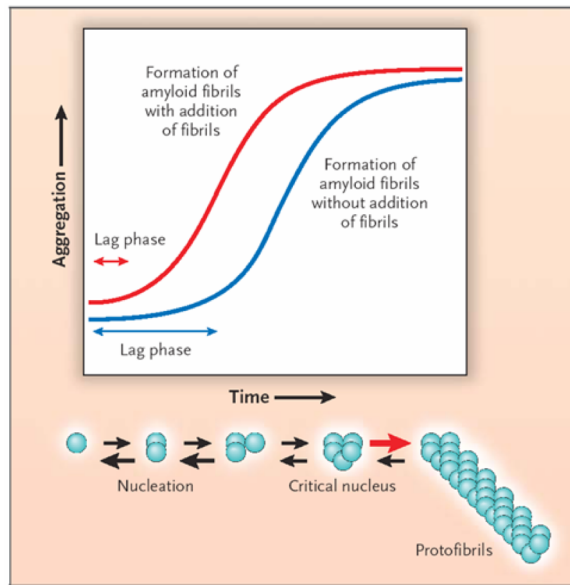
Sotto il profilo chimico, gli aggregati amiloidi possono essere riconosciuti mediante varie metodiche analitiche che si fondano su diversi criteri, come l'identificazione diretta delle caratteristiche strutturali mediante analisi di diffrazione ai raggi X delle fibre, microscopia elettronica, oppure approcci più empirici come la colorazione con il Congo Red o la fluorescenza della Tioflavina T (un fluoroforo che varia in modo caratteristico il suo spettro di emissione quando si lega a foglietti  $\beta$ , excit. 445 nm; emiss. 535 nm).

## La tossicità degli oligomeri *in vitro*

- Il peptide  $\beta$ -amiloide, è noto assemblarsi a formare oligomeri tossici che sono cruciali per l'inizio della patologia neurodegenerativa del morbo di Alzheimer (AD).
- Cellule di neuroblastoma (SK-N-SH cells) vengono trattate con 10  $\mu$ M A $\beta$  per 48 h.
- Per testare la tossicità del peptide  $\beta$ -amiloide, che è noto indurre tossicità cellulare in seguito ad interazione, destabilizzazione e permeabilizzazione della membrana plasmatica, viene effettuato il saggio MTT.
- MTT è un sale tetrazolico di colore giallo che penetra nelle cellule e viene ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali, sviluppando una colorazione blu-violetta la cui intensità è proporzionale al numero di cellule vive ed è misurabile mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm.



# Cinetica di formazione degli aggregati *in vitro*



Fase lag di nucleazione: una fase lenta iniziale seguita da una successiva crescita esponenziale fino a includere negli aggregati tutte le proteine capaci di aggregare presenti nella soluzione. La fase lag sembrerebbe essere dovuta a una minore stabilizzazione energetica dei “nuclei” iniziali rispetto a quella che si verifica quando le fibrille sono già formate. Si ipotizza anche che tale andamento potrebbe giustificare la tipica progressione di molte malattie neurodegenerative, che è inizialmente molto lenta, ma successivamente va incontro a una fase di rapido aggravamento. Si considera che *in vivo* molti altri fattori possono contribuire a tale cinetica (es.: perdita di efficienza degli chaperoni durante l'invecchiamento).