



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**EFFETTI DI AGENTI STABILIZZANTI SULLA DENATURAZIONE
TERMICA E SULLA AGGREGAZIONE AMILOIDE DEL LISOZIMA**

**STABILIZING AGENTS AGAINST LYSOZYME THERMAL UNFOLDING
AND AMYLOID AGGREGATION**

Tesi di Laurea Magistrale
di: Leonardo Mastrella

Relatore:
Prof.ssa Maria Grazia Ortore

Sessione Estiva
Anno accademico 2019/2020

Appendice

4.4 Analisi SAXS	99
------------------------	----

INDICE

Capitolo 1- Introduzione

1.1 Presentazione della Tesi.....	5
1.2 Folding Proteico.....	7
1.3 Processo di aggregazione proteica in Fibre Amiloidi.....	13
1.4 Metodi usati per lo studio di fibrille Amiloidi.....	22
1.5 Osmoliti.....	24
1.6 Ruolo fisiologico della Taurina.....	27

Capitolo 2- Materiali

2.1 Lisozima.....	36
2.2 Congo Red.....	37
2.3 Taurina.....	40
2.4 Zuccheri.....	40

Capitolo 3 -Metodi

3.1 Preparazione del Campione.....	41
------------------------------------	----

3.2 Spettrofotometria.....	42
3.3 Dicroismo Circolare (CD).....	49
3.4 Microscopia a Forza Atomica (AFM)	52
3.5 Small Angle X-Ray Scattering (SAXS).....	56
4 Risultati e Discussioni	
4.1 Analisi al Dicrografo.....	65
4.2 Analisi allo Spettrofotometro.....	79
4.3 Microscopia a Forza Atomica.....	86
5 Conclusioni.....	113
6 Bibliografia.....	116

1 Introduzione

1.1 Presentazione Tesi

Negli ultimi anni la conversione di peptidi o proteine normalmente solubili in aggregati amiloidi insolubili è divenuto un argomento di fondamentale importanza per la ricerca scientifica (dalla fisica alla chimica passando per la biologia e la medicina). L'esplosione di interesse si deve alla moltitudine di malattie associate a disordini molecolari e alla formazione delle placche amiloidi. Sono circa 50 le malattie, con sintomi tra i più disparati, associate al "misfolding" di peptidi e proteine funzionali e alla loro conseguente conversione in aggregati amiloidi. L'esempio tipico sono le "fibrille amiloidi" la cui formazione è associata sia alla perdita di funzionalità della proteina sia alla formazione di intermedi tossici nel processo di autoassemblaggio. Tale aggregazione non è solo un fenomeno raro associato a un certo numero di malattie ma è anche una forma strutturale ben definita della proteina, alternativa dello stato nativo, che può avere funzionalità strutturale vera e propria.

Disease	Aggregating protein or peptide	Polypeptide length (number of residues)	Structure of protein or peptide
Neurodegenerative diseases			
Alzheimer's disease	Amyloid- β peptide	37–43	Intrinsically disordered
Spongiform encephalopathies	Prion protein or its fragments	230	Intrinsically disordered and α -helical
Parkinson's disease	α -synuclein	140	Intrinsically disordered
Amyotrophic lateral sclerosis	Superoxide dismutase 1	153	β -sheet and Ig-like
Huntington's disease	Huntingtin fragments	Variable	Mostly intrinsically disordered
Familial amyloidotic polyneuropathy	Transthyretin mutants	127	β -sheet
Non-neuropathic systemic amyloidosis			
Amyloid light chain (AL) amyloidosis	Immunoglobulin (Ig) light chains or its fragments	~90	β -sheet and Ig-like
Amyloid A (AA) amyloidosis	Serum amyloid A1 protein fragments	76–104	α -helical and unknown fold
Senile systemic amyloidosis	Wild-type transthyretin	127	β -sheet
Haemodialysis-related amyloidosis	β_2 -microglobulin	99	β -sheet and Ig-like
Lysozyme amyloidosis	Lysozyme mutants	130	α -helical and β -sheet
Non-neuropathic localized amyloidosis			
Apolipoprotein A1 (Apo A-1) amyloidosis	Apo A-1 fragments	80–93	Intrinsically disordered
Type II diabetes	Amylin	37	Intrinsically disordered
Injection-localized amyloidosis	Insulin	21 and 30	α -helical and insulin-like

Tabella 1 Elenco malattie legate alla formazione di stati amiloidi.[1]

Le proteine possono esistere sia in forma solubile sia in forma fibrillare (per esempio i complessi fibrillari del citoscheletro o la tela del ragno) [2][3]. In molti casi lo stato nativo di una proteina potrebbe non essere globulare ma bensì disordinato. Ci sono anche proteine funzionalmente attive nello stato globulare che però adottano delle forme intermedie come per passare attraverso il citosol o attraverso la membrana. Inoltre proteine che si sono ripiegate correttamente possono conseguentemente unfoldare per via delle fluttuazioni dinamiche. Stati di ripiegamento parziale possono essere richiesti per ragioni funzionali specifiche come la traslocazione a livello dei mitocondri [4].

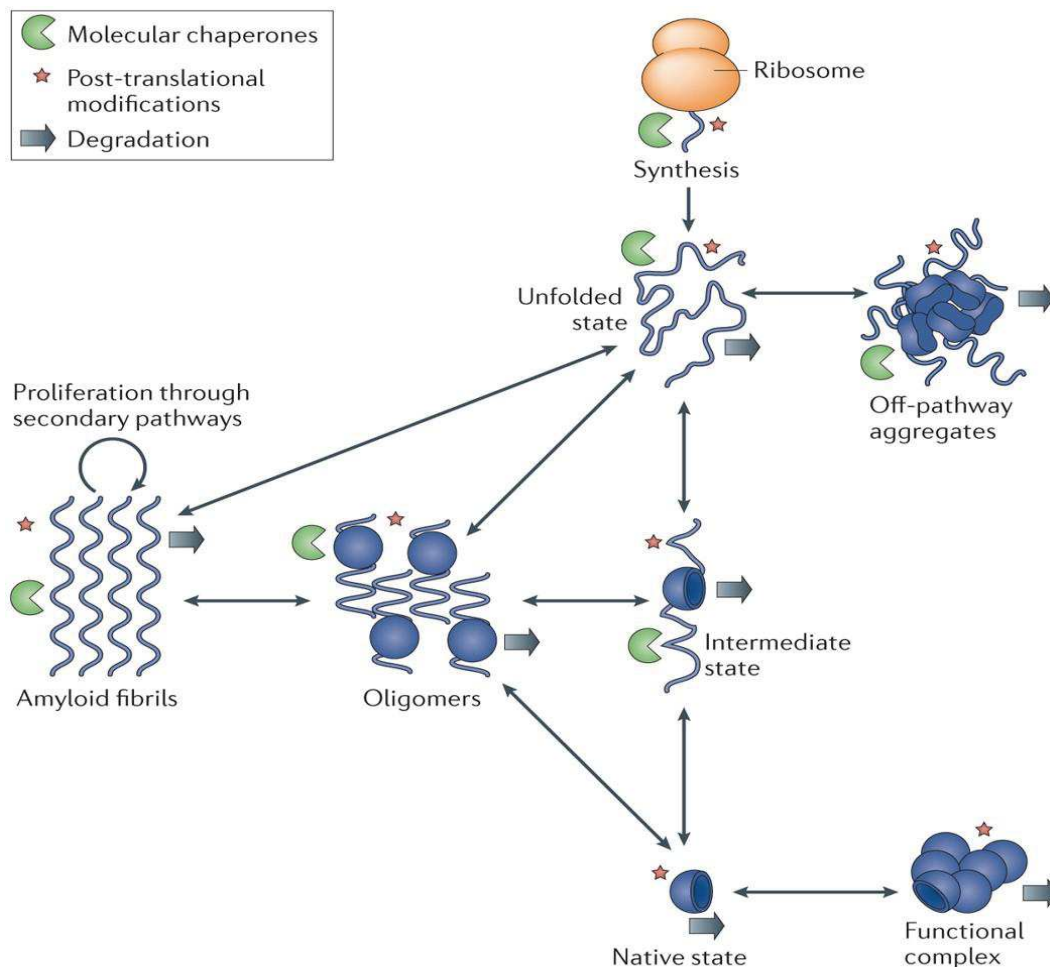


Figura 1 I vari stati delle proteine [1]

1.2 Folding Proteico

I ribosomi sintetizzano le proteine sotto forma di un eteropolimero aminoacidico che costituisce la struttura primaria. Questa contiene l'informazione di base che consente alla proteina di ripiegarsi. Durante la sintesi la catena polipeptidica assume delle strutture secondarie come: α -elica, β -foglietti, random coil, turn. Le strutture secondarie dipendono da legami idrogeno che si instaurano tra l'ossigeno del gruppo carbonilico (-CO-) e l'azoto del gruppo amminico (-NH-) appartenenti ad amminoacidi diversi e impegnati nel legame peptidico che si trovano ad una distanza nell'ordine di 0.3 nm. In particolare l' α -elica è la struttura secondaria più frequentemente assunta dalla catena polipeptidica. Rappresenta un avvolgimento a spirale destrorsa con un passo di 0.54 nm e contiene 3.6 amminoacidi per giro [5].

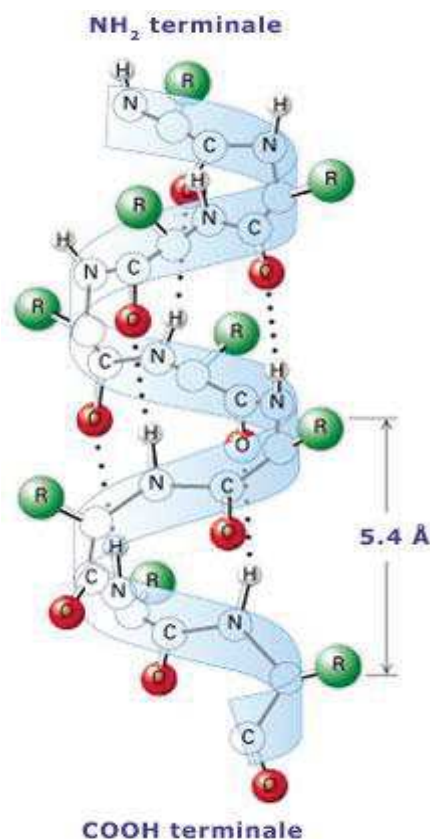


Figura 2 Struttura secondaria tipo α -elica. Sono visibili i legami idrogeno tra gruppo carbonilico e gruppo amminico

La struttura secondaria a foglietti β (β -sheet) è tipica delle proteine fibrose e ne sono ricche le fibrille amiloidi. I filamenti peptidici β (β -strands) si dispongono in maniera adiacente l'un l'altro e istaurano reciprocamente dei legami idrogeno, così da originare una conformazione planare molto compatta definita appunto β -foglietto (β -sheet). La denominazione si deve al tipico aspetto di questa struttura a foglietto pieghettato caratterizzato da una lieve torsione destrorsa. Nel legarsi reciprocamente i 2 filamenti β possono assumere orientazioni contrarie oppure estendersi secondo la medesima orientazione. Nel primo caso si parla di orientazione antiparallela nel secondo caso parallela.

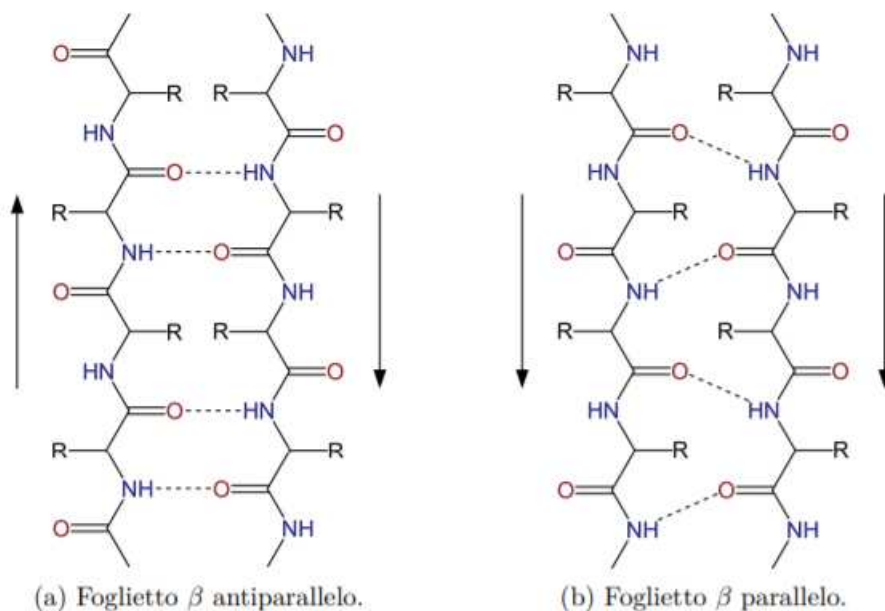


Figura 3 Struttura secondaria a foglietti β con catene antiparallele (a) e catene parallele (b)

I foglietti β si dispongono nello spazio a formare strutture terziarie tridimensionali stabilizzate da forze di legame intramolecolari e da interazioni idrofobiche. Le interazioni idrofobiche inducono gli amminoacidi non polari a rimanere all'interno della struttura proteica così da minimizzare il contatto con l'acqua che sappiamo è

un solvente polare, mentre gli amminoacidi polari e carichi ad rimanere esposti a livello superficiale così da interagire con le molecole di solvente. Le chaperonine invece sono proteine con molteplici funzionalità che interagiscono con la proteina che si sta ripiegando occupano le regioni idrofobiche che sono ancora esposte, così da evitare la formazione di aggregati per interazioni idrofobiche. Una volta favorito il meccanismo di folding, le chaperonine vengono allontanate. Se invece insorgono errori nel ripiegamento il complesso proteina-chaperonina viene degradato dai proteosomi [6]. Qualora questi meccanismi non funzionassero correttamente si andrebbe incontro al ripiegamento errato della proteina (misfolding). Quando più catene polipeptidiche si uniscono per formare un'unica proteina la struttura spaziale che definisce il rapporto tra subunità prende il nome di struttura quaternaria.

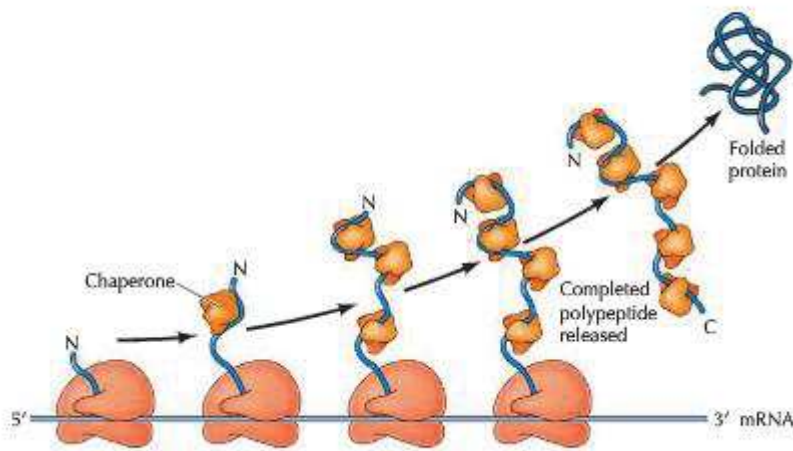


Figura 4 Meccanismo d'azione delle proteine Chaperon

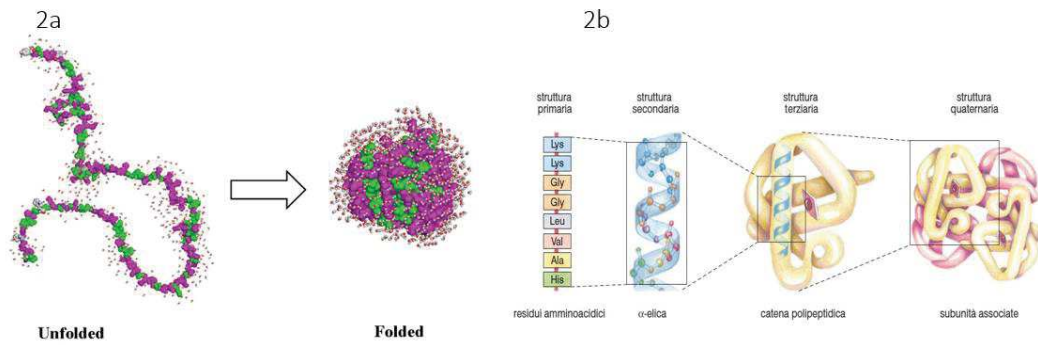


Figura 5 Stato unfoldato e stato foldato della proteina (Figura 2a). Le varie strutture proteiche (figura 2b)

Il folding quindi può essere descritto come la ricerca da parte della proteina della struttura tridimensionale stabile e funzionale, costituita da un minimo di energia libera con la quale poter svolgere la sua funzione fisiologica. L'energia libera dipende da tutta una serie di interazioni relativamente deboli come legami idrogeno, interazioni elettrostatiche, forze di dispersione e interazioni con le molecole di solvente che sono alla base degli effetti idrofobici.

Dal punto di vista Termodinamico:

$$\Delta(G) = \Delta H - T\Delta S$$

$\Delta(G)$ è l'energia libera di superficie

ΔH è la variazione di entalpia

ΔS è la variazione di entropia

T è la temperatura espressa in gradi Kelvin.

Gli stati non strutturati, avendo un numero maggiore di gradi di libertà, dispongono di un numero sconfinato di possibili conformazioni a bassa energia. La proteina

unfoldata è stabilizzata da un elevato valore di entropia (ΔS). La conformazione nativa, essendo quasi unica, per mantenere la propria stabilità deve sopperire al minor contenuto entropico mediante interazioni intercatena. In questo modo la proteina viene a trovarsi in un minimo di energia abbastanza stretto, tale che qualsiasi perturbazione implica un aumento significativo dell'energia libera; Come se una volta raggiunta la conformazione nativa, la proteina cadesse in una buca di potenziale. Per questo motivo il mantenimento della solubilità proteica è l'aspetto centrale in un frangente più generale come "l'omeostasi delle proteine".

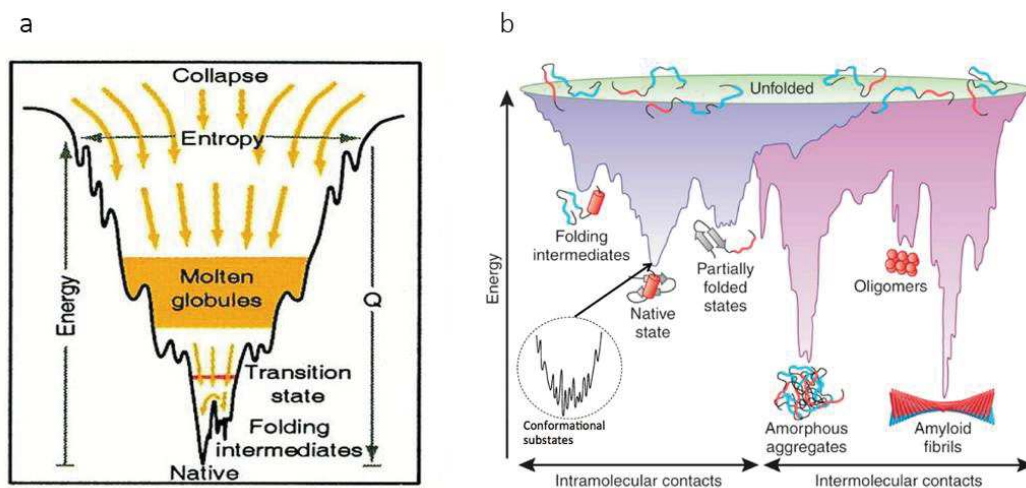


Figura 6 differenze di potenziale tra conformazione unfolded, e nativa Figura a [7] Figura b [8]

Alcune proteine, che vengono definite come intrinsecamente disordinate (IDP:intrinsic disordered protein), hanno spesso ruoli importanti. Non tutte le proteine sono comunque disordinate, sebbene siano invece praticamente tutte inclini all'aggregazione amiloide, sotto l'effetto di opportuni agenti di stress (alte temperature, pH estremi, agitazione). Le loro sequenze per mantenere lo stato solubile che è richiesto per una funzione ottimale contengono delle regioni estese che abbondano di cariche e gruppi polari così da sfavorire l'associazione intermolecolare. Inoltre la barriera cinetica di aggregazione ha un ruolo cruciale per

mantenere sia le proteine globulari sia quelle disordinate allo stato solubile e funzionale. Allo stato nativo la maggior parte delle interazioni tra aminoacidi sono intramolecolari, mentre allo stato amiloide prevalgono le interazioni intermolecolari. Proprio per questo la stabilità dello stato amiloide è dipendente dalla concentrazione proteica mentre lo stato nativo è con buona approssimazione indipendente da questa. Lo stato nativo è termodinamicamente meno stabile rispetto allo stato amiloide. Una proteina non passerà mai spontaneamente da uno stato a minor energia libera verso uno stato ad energia libera più alta. La conversione in stato amiloide sarà quindi possibile solo perché quest'ultimo avrà un'energia libera (ΔG) minore rispetto allo stato nativo. Viene definita una concentrazione critica corrispondente alla concentrazione proteica per la quale la stabilità dello stato amiloide è uguale a quella dello stato nativo. Se la si supera la proteina è più stabile allo stato amiloide. In questa situazione lo stato nativo può persistere solo se ci sono barriere ad alta energia libera che ostacolano la transizione verso la forma amiloide [1]. Alcune prove sperimentali suggeriscono che la concentrazione fisiologica per alcune proteine è maggiore della concentrazione critica. Quindi alcune proteine potrebbero funzionare normalmente a una concentrazione che eccede la definizione convenzionale di stato solubile termodinamicamente stabile. Alle concentrazioni presenti nei sistemi viventi lo stato nativo potrebbe quindi non sempre rappresentare l'energia minima assoluta della catena polipeptidica corrispondente. La forma nativa di una proteina potrebbe essere in certi casi uno stato monomero metastabile, separato dalla sua forma amiloide da una barriera cinetica alta.

Sotto particolari condizioni denaturanti (variazioni di pH, temperatura, stress ossidativo) la proteina può andare incontro al misfolding, assumendo

conformazioni dove la regione idrofobica viene maggiormente esposta al solvente e per questo la proteina diventa in grado di interagire interagisce mediante interazioni idrofobiche con altre proteine dando luogo ad autoaggregazione. Gli aggregati hanno normalmente forma amorfa a livello ultrastrutturale. Tuttavia, ci sono specie auto-associate di peptidi e proteine altamente ordinate come le fibrille amiloidi e gli stati simili a prioni.

1.3 Processo di aggregazione proteica in fibre amiloidi

Il termine “amiloide” venne coniato per la prima volta da Schedlen per via della proprietà simile all’amido di reagire con iodio. Il termine è poi utilizzato da Virchow a metà del XIX secolo, per identificare depositi rinvenuti nel fegato di un paziente soggetto ad autopsia. L’architettura dello stato amiloide è simile per impacchettamento e per alto grado d’ordine allo stato globulare nativo. Differisce per l’abbondanza di β -sheet infatti si assiste a un cambiamento conformazionale che coinvolge la transizione da α -eliche a β -sheet. L’architettura strutturale non dipende dalla sequenza amminoacidica, seppur ne possa essere influenzata. Viene inoltre stabilizzata da legami idrogeno. Questi generano delle placche che precipitano e causano un gruppo di malattie che va sotto il nome di “Amiloidosi” (come riportato nella tabella 1).

Alla fine degli anni novanta del secolo scorso ci si rese conto che la forma amiloide, che fino a quel momento era stata identificata solo nel contesto della categoria patologica sopra riportata, poteva essere assunta da una grande quantità di peptidi e proteine ordinarie (lisozima, mioglobina, insulina ecc), non associate con nessuna malattia legata al misfolding. Questo suggerì che la struttura amiloide può essere adottata da qualsiasi catena polipeptidica [9].

Nel processo di formazione dello stato amiloide possiamo rilevare diversi passaggi microscopici che danno luogo alla formazione di specie intermedie particolarmente tossiche come gli oligomeri o le protofibrille. Possiamo schematizzare l'aggregazione amiloide nei diversi passaggi:

1. Nucleazione e processi di frammentazione: responsabili dell'aumento del numero di aggregati, dipendono dalla concentrazione dei monomeri liberi e degli aggregati già esistenti. In particolare, la "nucleazione primaria" responsabile della reazione di polimerizzazione degli aggregati iniziali a partire da monomeri solubile. La nucleazione primaria è attiva anche durante la biosintesi di filamenti proteici funzionali come "l'actina e la tubulina". Seguono pathway secondari che includono "frammentazione" e "nucleazione secondaria" che hanno un ruolo chiave nei processi di aggregazione e nella formazione di intermedi tossici.
2. Processi di crescita: Gli aggregati, una volta formati per processi di nucleazione crescono attraverso il sequestro di molecole proteiche solubili. L'elongazione di fibre amiloidi dipende dalla concentrazione sia di monomeri, sia di fibrille, suggerendo un meccanismo di crescita che avviene grazie all'aggiunta di monomeri all'estremità delle fibrille già esistenti.
3. Processi di dissociazione: La dissociazione di molecole da aggregati è cruciale per l'equilibrio chimico. Il processo è reversibile e dinamico. Permette un lento turnover tra le popolazioni in soluzione e negli aggregati.

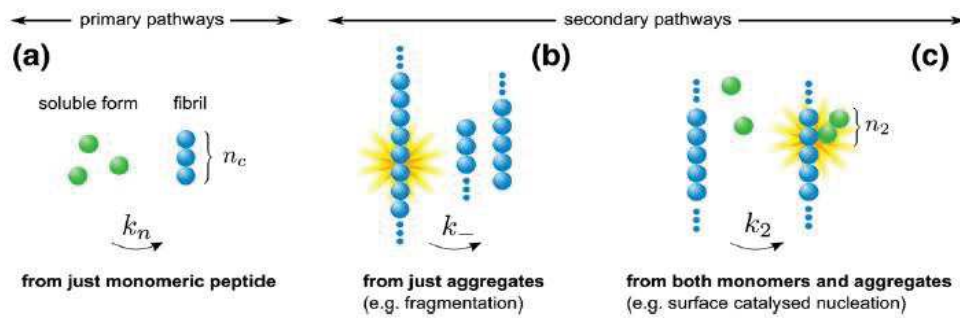


Figura 7 meccanismi alla base del processo di aggregazione e polimerizzazione delle proteine. Pathway primari (Figura a), pathway secondari (Figura b e Figura c) [10].

Cinetica di aggregazione

Le misure cinetiche sono lo strumento principale per capire i meccanismi di aggregazione amiloide. Visto che la velocità di reazione cambia in base alla forma e alla simmetria dei diversi peptidi e proteine coinvolte nel processo, si cerca di generalizzare facendo riferimento ad un andamento nel tempo rappresentato da una curva sigmoideale, caratteristica di tutte le cinetiche di aggregazione nucleazione-dipendenti. Il comportamento sigmoideale è sempre indice della generazione di nuovi aggregati durante il processo di reazione.

Una cinetica di questo tipo dipende dalla velocità di nucleazione e dalla velocità di elongazione degli aggregati fibrillari.

Può essere divisa in 3 fasi: fase lag, fase di crescita esponenziale e fase di equilibrio quando si raggiunge un plateau.

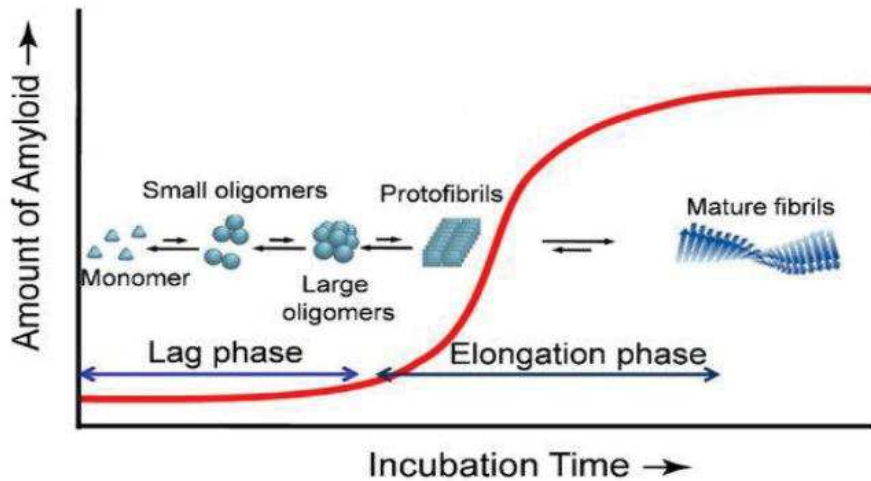


Figura 8 Differenti stadi nel processo di formazione delle fibre amiloidi [11]

Nella fase iniziale (lag phase o fase di nucleazione) ha inizio il processo di associazione dei monomeri liberi in soluzione (nucleazione primaria) che procede fino alla formazione dei “nuclei”, cioè di oligomeri di dimensione variabile che favoriscono il processo di aggregazione [12]. Questi “nuclei” forniscono una sorta di “template” in grado di reclutare ulteriori monomeri, aumentando così le dimensioni degli aggregati in via di formazione. Quando si raggiunge la dimensione critica la cinetica procede in modo più rapido e passa a una fase di crescita esponenziale (nucleazione secondaria), dove si ha la formazione di aggregati metastabili con morfologia fibrillare che prendono il nome di “protofibrille”. L’ultima fase della cinetica di aggregazione (plateau) è caratterizzata dalla formazione delle fibrille mature, molto stabili.

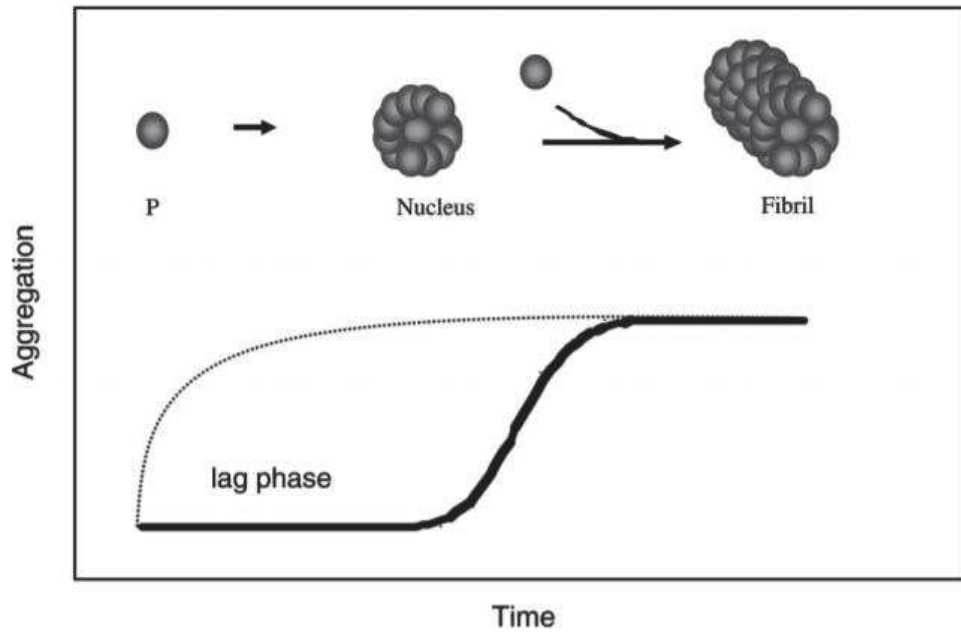


Figura 9 Cinetica di aggregazione del processo fibrillogenico. Andamento Sigmoidale tipico delle polimerizzazioni nucleazioni-dipendenti caratterizzate da una fase di latenza, una di crescita e una di saturazione [12].

La fase lag dura il tempo necessario alla crescita di aggregati sufficientemente grandi. Può essere drasticamente ridotta, o addirittura scomparire in presenza di nuclei pre-aggregati che fungono da feedback positivo per la fase di polimerizzazione (pathway secondari) che rappresenta il punto critico dell'intero processo.

I pathways primari e i secondari esibiscono delle caratteristiche differenti sia in funzione del tempo sia in funzione della concentrazione iniziale dei monomeri. Queste differenze sono osservabili considerando il comportamento del sistema durante le prime fasi prima che una quantità apprezzabile di monomeri venga sequestrata dalla formazione di aggregati. Per quanto riguarda i pathways primari (nucleazione primaria) la velocità di generazione dei nuovi aggregati dipende dalla concentrazione dei monomeri liberi in soluzione ed è indipendente dalla concentrazione delle fibrille esistenti [13]. Si ritiene che la velocità di crescita abbia

un andamento del tipo ($\sim t^m$) dove t è il tempo. Una reazione dominata dalla nucleazione primaria è caratterizzata da una fase lag debole che prevede un aumento repentino in breve tempo seguito da un decadimento della curva lento fino al raggiungimento del “plateau”, quando la concentrazione di monomeri ha raggiunto l’equilibrio (figura B). I pathways secondari invece hanno una velocità di creazione degli aggregati che dipende solo dalle fibrille esistenti come nel caso della frammentazione. La velocità di crescita degli aggregati in una reazione dominata dai pathways secondari è esponenziale ($\sim e^{Kt}$). Si assiste a una fase lag più forte e duratura seguita da una brusca transizione fino al “plateau” (figura C e D).

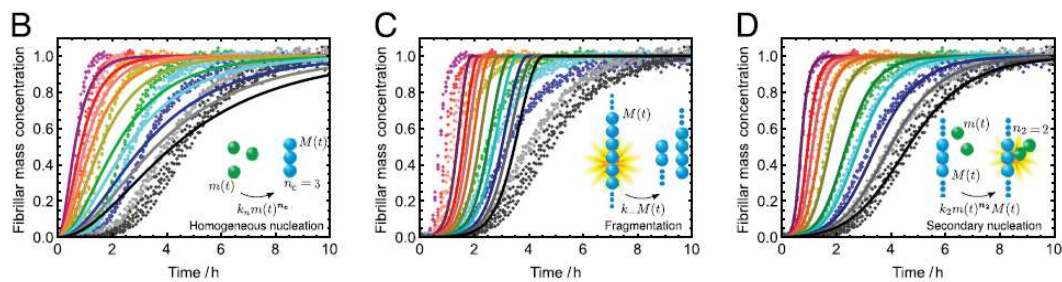


Figura 10 Nucleazione primaria (Figura B). Frammentazione (Figura C). Nucleazione secondaria (Figura D) [1]

È chiaro che non bisogna considerare questi 3 meccanismi (nucleazione primaria, frammentazione e nucleazione secondaria) separati tra loro. Il processo che porta alla formazione di fibrille amiloidi ogni componente è connessa con l’altra per via di meccanismi a cascata. Tutti i meccanismi sono attivi contemporaneamente. Quindi ci sarà sempre un arco temporale, seppur breve, dove domina la reazione di nucleazione primaria. Una volta raggiunta la concentrazione critica di aggregati si attivano i pathway secondari che dominano tutto il processo che porta dagli oligomeri intermedi alla formazione delle fibrille mature. La nucleazione secondaria è il risultato del processo a feedback positivo che si ha a partire dagli aggregati esistenti. Quindi la nucleazione secondaria dipende nelle prime fasi dalla

nucleazione primaria poi diventa la reazione cardine dell'intero processo. Studi recenti provano che l'accumulo di aggregati amiloidi è accoppiato alla formazione di oligomeri intermedi dal basso peso molecolare. Per questo la ricerca si sta muovendo verso metodiche in grado di alterare il processo di nucleazione secondaria [14].

Le protofibrille sono intermedi relativamente stabili che hanno origine dai nuclei degli oligomeri e sono le prime particelle di morfologia fibrillare che è possibile individuare. Hanno una lunghezza di circa 200 nm e diametro di 2-5 nm. Sono flessibili e leggermente curve. Rimangono visibili solo in un transiente durante la fibrillogenesi confermando l'ipotesi che possano essere i reali precursori delle fibrille mature.

Per spiegare la transizione da protofibrille a fibrille sono stati proposti diversi meccanismi. Il più semplice dei quali prevede l'associazione delle protofibrille "end-to-end" anche se è assai improbabile che le estremità protofibrillari si incontrino e si allineino sempre correttamente. Risulta invece più probabile che si associno lateralmente a formare "auto-template", ai quali i precursori (monomeri e dimeri) possono legarsi e polimerizzare, oppure l'associazione laterale potrebbe accelerare l'associazione end-to-end che in questo caso sarebbe più plausibile.

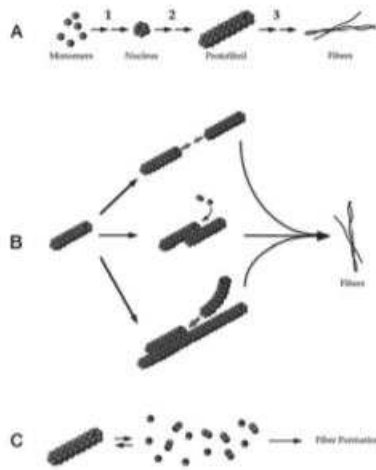


Figura 11 Rappresentazione schematica dei 3 possibili meccanismi di formazione delle fibrille [15]

Le fibrille mature, analizzate al microscopio elettronico, appaiono più rigide rispetto alle protofibrille. Si presentano lunghe, lineari, costituite da 2 a 6 protofilamenti (a seconda del grado di complessità) avvolti su se stessi a formare eliche β di 4-13 nm di diametro.



Studi fatti mediante diffrazione a raggi-X mostrano che tutte le fibre amiloidi hanno una impalcatura comune basata su di un modello cross- β [16]. A comporre questa struttura, molto ordinata, è un insieme di foglietti β (β -sheet) che corrono paralleli

all'asse delle fibrille, con i filamenti (β -strands) orientati perpendicolarmente all'asse stesso. L'architettura delle fibrille si articola su 3 livelli:

1. L'allineamento di molteplici filamenti β (β -strands), in un β -sheet stabilizzato da "legami idrogeno".
2. L'interazione di due β -sheet a formare una coppia, consolidata da interazioni di "Van Der Waals".
3. Interazione tra coppie di β -sheet da cui trae origine la fibrilla.

La formazione di legami idrogeno conferisce stabilità alla fibrilla neoformata.

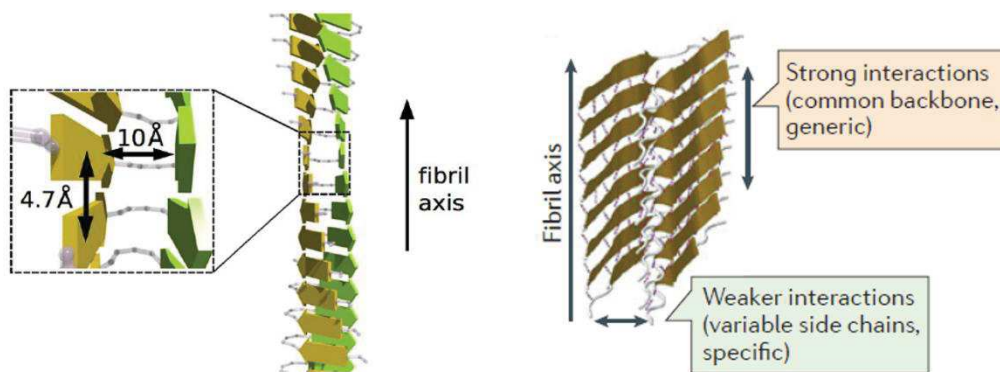


Figura 12 Struttura 3D dei β -sheet di fibre amiloidi [17] [1].

La struttura di base delle fibrille mature è stata caratterizzata anche da altre tecniche quali spettroscopia NMR allo stato solido [18] e la microscopia crioelettronica.

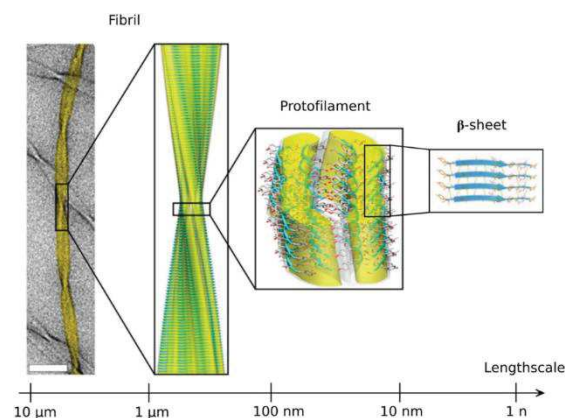


Figura 13 Scala di lunghezza fibrille e protofilamenti [1]

1.4 Metodi usati per lo studio di fibrille Amiloidi

Metodi	Rilevazione strutture amiloidi	Struttura dell'amiloide	Morfologia dell'amiloide	Cinetica di aggregazione
Immunoistochimica/ immunochimica	SI	NO	NO	NO
Congo red	SI	NO	NO	NO
Thioflavina	SI	NO	NO	SI
DC (Dicroismo Circolare)	NO	SI	NO	NO
Spettroscopia (IR)	NO	SI	NO	NO
NMR	NO	SI	SI	SI
DIFFRAZIONE RAGGI-X	NO	SI	NO	NO
SAXS	NO	SI	SI	NO

Microscopia Crioelettrica	NO	SI	SI	NO
Microscopia Elettronica (TEM)	SI	NO	SI	NO
Microscopia a forza atomica	NO	NO	SI	SI
Dispersione dinamica della luce	NO	NO	NO	SI
Spettroscopia a fluorescenza	NO	NO	NO	SI
Cromatografia ad esclusione dimensionale	NO	NO	NO	SI
Ultracentrifugazione analitica	NO	NO	NO	SI

Tabella 2 Tabella delle principali tecniche usate per lo studio delle fibrille Amiloidi in vitro

1.5 Osmoliti

Gli osmoliti o “soluti osmoticamente attivi” o “soluti compatibili”, sono una categoria di composti altamente solubili e a basso peso molecolare che non interferisce con le strutture e le funzioni cellulari. Tra i più noti si citano aminoacidi (prolina, glutammato), polioli, metilamine e zuccheri (trealosio, saccarosio) [19] [20].

Questi composti sono maggiormente sintetizzati e accumulati durante l’esposizione della cellula a vari stress. Tra i possibili meccanismi d’azione troviamo:

- Abbassamento del potenziale dell’acqua
- Abbassamento del punto crioscopico
- Stabilizzazione delle proteine [21]
- Stabilizzazione di struttura della membrana
- Riduzione dei radicali liberi e protezione dai danni ossidativi (inattivazione dei ROS)
- Costituiscono una forma di carbonio, azoto e potere riducente per alimentare il metabolismo in condizioni di stress.

I soluti cosiddetti compatibili e quelli non compatibili sono distinguibili sulla base di due proprietà:

- L’interazione specifica con i ligandi (substrati, cofattori, e modulatori) e i siti attivi. Questo ha come conseguenza la perturbazione della funzione enzimatica.

- L'influenza da parte di soluti compatibili e non compatibili dell'idratazione, la solubilità e l'interazione di carica dei vari gruppi proteici.

Molti soluti perturbanti potrebbero agire sui ligandi piuttosto che influenzare direttamente la struttura proteica, per esempio con l'aumento della costante di Michaelis-Menten (K_m) indotta dal sale. La costante di Michaelis-Menten è l'indice di affinità tra enzima e substrato. Più basso è il valore della costante più bassa sarà la concentrazione di substrato per l'enzima che permette di raggiungere una velocità di reazione pari alla velocità massima. Quindi una bassa K_m è indice di un'alta affinità tra enzima e substrato. Alte concentrazioni dello ione potassio (K^+) aumentano per esempio la K_m del fosfoenolpiruvato (PEP) per l'enzima piruvato chinasi (PK). Sembrerebbe infatti che gli ioni potassio (K^+) formino dei complessi con il PEP rendendolo incapace di legarsi all'enzima. Un meccanismo simile viene adottato dall'arginina nei confronti degli enzimi glicolitici.

Tra gli osmoliti organici più comunemente usati nessuno ha carica positiva da poter formare complessi con i metaboliti cellulari carichi negativamente (-). Solo l'octopina ha carica ma negativa, i polialcoli, urea e il TMAO non sono carichi mentre le metilamine e gli aminoacidi sono zwitterioni a pH fisiologico [22].

Il secondo meccanismo d'azione degli osmoliti è più complesso da capire. Il meccanismo con cui i soluti agiscono direttamente sulla struttura macromolecolare non è del tutto chiaro. Il dubbio sorge tra un'interazione soluto-macromolecola diretta o in alternativa il soluto influenza il solvente (acqua) causando cambiamenti nella sua struttura. Questo influenza la stabilità della macromolecola.

Già a fine del diciannovesimo secolo lo scienziato tedesco Franz Hofmeister individuò una serie di ioni che erano più efficaci di altri in una serie di processi

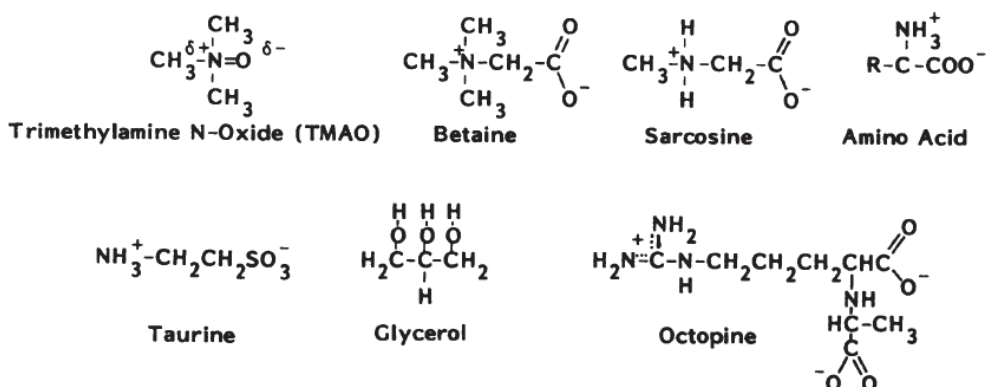
chimici e biologici. Venne poi successivamente confermato che questi anioni e cationi influenzano i cambiamenti conformazionali delle macromolecole (proteine) quali: aggregazione/disgregazione, polimerizzazione e denaturazione.

	Stabilizing (salting-out)				Destabilizing (salting-in)						
Anions	F ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ⁼	CH ₃ COO ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	CNS ⁻			
Cations	(CH ₃) ₄ N ⁺	(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	NH ₄ ⁺		K ⁺	Na ⁺	Cs ⁺	Li ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Ba ²⁺

Figura 14 Le sequenze degli ioni della serie di Hofmeister.[22]

Gli effetti di questi ioni sono inoltre algebricamente additivi. Quindi l'effetto destabilizzanti dell'ione (I⁻) può essere compensato dall'aggiunta di ioni stabilizzanti quali SO₄²⁻ o NH₄. Clark e Zounes furono i primi a sottolineare la similarità tra gli ioni che favoriscono la forma nativa macromolecolare e i gruppi funzionali di molti osmoliti organici che si accumulano durante condizioni di stress osmotico. Amino acidi che agiscono come l'ammonio acetato, la taurina che assomiglia al solfato di ammonio e le metilamine che assomigliano agli ioni ammonio quaternari. Tutti questi composti hanno effetti stabilizzanti sulle macromolecole. Fatte alcune eccezioni, come la prolina, tutti i comuni aminoacidi e le metilamine aumentano la temperatura di melting (T_m) di proteine come la ribonucleasi [22], mentre l'urea e l'arginina sembrerebbero diminuirla.

Nonperturbing or stabilizing



Perturbing

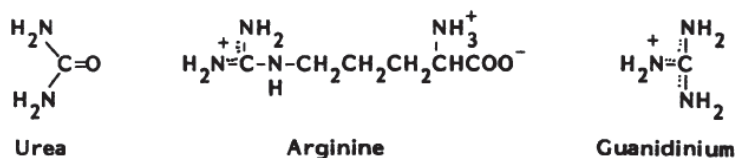


Figura 15 Comuni soluti intracellulari che hanno effetti stabilizzanti e perturbanti sulla struttura e funzione delle macromolecole [22].

La possibilità che un osmolita agisca direttamente su una proteina oppure sulle proprietà del solvente è difficile da distinguere sperimentalmente. Spesso una via non esclude l'altra. In teoria gli osmoliti potrebbero agire sulla carica, sui gruppi polari e non polari di una proteina in modo tale da aumentare o diminuire l'affinità per il relativo solvente [23].

In questo studio si è voluto analizzare l'effetto stabilizzante della taurina e di alcuni zuccheri sul lisozima in condizioni denaturanti.

1.6 Ruolo Fisiologico della Taurina

La Taurina o acido 2-ammino-etanosolfonico ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$) è un osmolita organico impiegato nella regolazione del volume cellulare e come substrato per la formazione dei Sali biliari [24]. Ha un ruolo nella modulazione della concentrazione intracellulare del calcio [25]. È uno dei pochi aminoacidi a non essere incorporato nelle proteine sebbene sia il più abbondante riscontrato nel

cervello, nella retina, nei tessuti muscolari e in altri organi. Svolge una grande quantità di funzioni a livello del sistema nervoso centrale (SNC), dallo sviluppo alla citoprotezione. La deficienza di taurina è associata a diverse condizioni patologiche che includono cardiopatie [26], e disfunzioni renali [27], disfunzioni delle cellule β pancreatiche [28]. Nella retina la concentrazione di taurina è critica per lo sviluppo dei fotorecettori e per la citoprotezione ai danni neuronali.

L'aminoacido taurina è stato identificato e isolato per la prima volta dalla bile di Bue (*Bos Taurus*) dal quale deriva il suo nome. La struttura chimica della taurina rivela il tipico gruppo carbossilico degli altri amminoacidi e in più contiene il gruppo sulfonato. Il principale meccanismo di biosintesi della taurina è a partire dalla metionina e cisteina per via cisteina-acido sulfinico decarbossilasi (CSD), e tipicamente richiede l'ossidazione dell'ipotaurina in taurina come step finale.

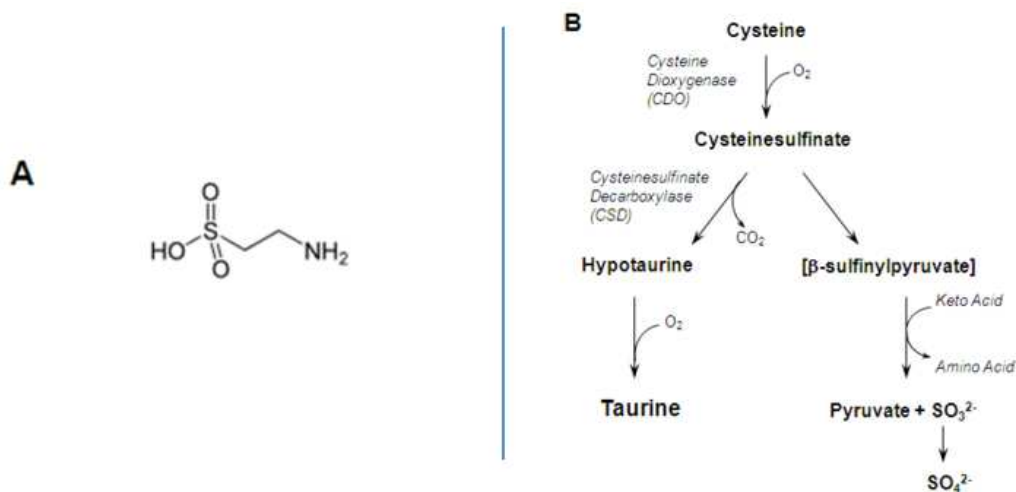


Figura 16 Struttura della Taurina (Figura A). Meccanismo di biosintesi della Taurina (Figura B) [29]

A livello cellulare, il contenuto di taurina è determinato da 3 processi: i) La biosintesi a partire dalla metionina/cisteina, ii) l'assorbimento attivo da parte del suo trasportatore, iii) il suo rilascio [30]. Il principale trasportatore di taurina è il "TauT" ad alta affinità ($K_m = 18 \mu M$). Il trasportatore fa parte della famiglia dei

trasportatori dei neurotrasmettitori che includono quelli per la serotonina, creatina e l'acido gamma ammino-butirrico (GABA). Tutti i membri appartenenti a questa famiglia hanno 12 eliche trans-membrana con l'estremità N-terminale e C-terminale esposte al citosol. Il dominio citosolico contiene diversi residui altamente conservati di serina, tirosina, e treonina che lo rendono fosforilabile. L'assorbimento di una molecola di taurina richiede tre ioni sodio (Na^+) e uno ione cloro (Cl^-) [31]. L'assorbimento di taurina può essere inibito solo dal guanidinoethyl-sulfonato (GES) e da pochi altri analoghi quali GABA e β -alanina.

Essendo uno dei pochi amminoacidi non impiegati nella sintesi proteica spesso viene definito un amminoacido "non essenziale". In realtà per la grande varietà di funzioni che svolge è uno delle sostanze più essenziali del nostro corpo, sebbene il meccanismo d'azione non è ancora del tutto chiarito.

Numerosi studi mostrano un ruolo chiave della taurina nel contrastare il diabete. Nello specifico permette di superare la resistenza all'insulina e altri fattori di rischio in modelli animali di diabete di tipo 1 e tipo 2 [32].

È stato anche trovato ristabilire l'attività dell'enzima che metabolizza il glucosio e migliorare la sensibilità all'insulina mediante la modificazione di eventi post-recettoriali [33].

Tutti i tessuti oculari, sia neuronali sia non neuronali, contengono taurina. Analisi qualitative effettuate su tessuto oculare estratto da cavia, rivelano che la taurina è l'amminoacido più abbondante nella retina, cornea, iris e corpi ciliari [34]. Le analisi quantitative invece confermano che la concentrazione della taurina è maggiore di dieci volte o più quella degli altri amminoacidi [35].

Amino Acids (millimoles per Kg protein)				
Taurine	Glycine	GABA	Glutamate	Alanine
145	37.8	26.6	40.2	8.8
409	17.4	13.6	37.2	5.1
525	8.6	3.6	36.5	2.0

Figura 17 Tabella che mostra le concentrazioni di alcuni aminoacidi nella retina [29]

La diminuzione della concentrazione di taurina endogena mediante il “knockout” genetico del trasportatore “TauT” o mediante l’aggiunta di analoghi come il GES che competono per i trasportatori stessi, provoca la perdita delle cellule gangliari insieme a cambiamenti degenerativi nella retina. Ha un ruolo neuro protettivo e anti-apoptotico. Previene infatti l’effetto citotossico dovuto al rilascio del “Citocromo C” da parte dei mitocondri. Il “Citocromo C” si lega poi al fattore-1 (Apaf-1) che ha attività di proteasi apoptotica con conseguente attivazione della Caspasi-9. La Caspasi-9 tramite reazioni a cascata attiva la caspasi 3 e la caspasi 7 che promuovono la morte della cellula. La taurina sembrerebbe in grado di inibire la formazione del complesso Apaf-1/Caspasi-9 [36], di ridurre l’apertura dei pori mitocondriali che favoriscono il rilascio del citocromo C e modifica il rapporto Bcl-2/Bax in favore di Bcl-2 così da evitare l’apoptosi cellulare. Inoltre, regola l’ingresso di calcio inibendo i canali calcio voltaggio dipendenti.

La taurina è anche un buon antiossidante. La sovrapproduzione di specie reattive all’ossigeno è alla base dello sviluppo di diverse malattie che comprendono disturbi cardiovascolare, diabete fino a disordini del sistema nervoso centrale (CNS). È stato

provato che in casi di diabete quando i livelli di taurina decrescono si ha una disfunzionalità della catena respiratoria mitocondriale [37]. Questo genera l'accumulo dei donatori di elettroni che vengono deviati dalla catena di trasporto all'ossigeno formando anioni superossido durante il processo. Aumentando i livelli di taurina l'attività fisiologica della catena respiratoria mitocondriale viene restaurata così da aumentare la sintesi di ATP a spese della produzione dell'anione superossido.

I disordini neurologici e le malattie neurodegenerative che includono tra le altre "Morbo di Alzheimer", "Morbo di Parkinson" e "Morbo di Huntington" condividono una comune patofisiologia di base: la citotossicità da eccesso di glutammato, l'alterazione del bilancio intracellulare del calcio e lo stress ossidativo che provocano la morte cellulare [38]. La taurina per le ragioni già citate in precedenza è un osmolita in grado di contrastare questi effetti divenendo un agente terapeutico che potrebbe rilevarsi ideale per molti di questi disturbi neurologici.

Il Morbo di Alzheimer (AD) venne caratterizzato per la prima volta da Alois Alzheimer nel 1907. È una malattia che porta a demenza progressiva e deterioramento delle funzioni cognitive. I sintomi sono fortemente correlati alla degenerazione delle sinapsi e alla morte neuronale in strutture limbiche come l'ippocampo (regione del cervello responsabile della memoria a breve e a lungo termine), corteccia basale, amigdala (regione situata nel lobo temporale del cervello deputata alla gestione delle emozioni) e corteccia associata. I sintomi lievi sono perdita della memoria a breve termine, stati confusionali e difficoltà nello svolgere attività complesse. Negli stadi più avanzati della malattia con l'atrofia della

corteccia cerebrale e i danni all'ippocampo si ha difficoltà nel parlare, nel ragionare e nell'elaborazione sensoriale.

La caratteristica distintiva della malattia è la formazione di placche amiloidi da β -amiloide peptide ($A\beta_s$) e di ammassi neurofibrillari intracellulari (NFT_s) dovuti all'iper-fosforilazione della proteina "tau".

Il β -peptide che genera le placche amiloidi deriva dalla scissione di una proteina precursore: APP (AMYLOID PRECURSOR PROTEIN).

APP è una proteina di membrana codificata da un gene situato sul cromosoma 21, la cui funzione è quella di promuovere la crescita cellulare. Più specificamente, è una proteina transmembrana con un estremo N-terminale (*ammino-terminale*) extracellulare ed uno C-terminale (*carbossi-terminale*) citoplasmatico. È espressa in diversi tipi di cellule, in particolare nel cervello, nel cuore, nella milza e nei reni. Ne sono state fino ad ora identificate almeno 10 isoforme derivate da splicing alternativo; le tre più comuni sono chiamate C (presente soprattutto nei neuroni), B (comune nei linfociti T) ed A, e sono composte rispettivamente da 695, 751 e 770 amminoacidi.

Normalmente l'APP viene tagliata da due proteasi:

- α -secretasi (taglia il precursore in corrispondenza dell'amminoacido 697;
- γ -secretasi, che attraverso la proteina presenilina taglia la parte residua all'interno della membrana (nel dominio C-terminale) a livello degli AA 711/713.

ottenendo un prodotto di clivaggio innocuo, chiamato P3.

Se però nel clivaggio di APP interviene in una fase inopportuna la proteasi β -secretasi (BACE, *Beta-Site APP-Cleaving Enzyme*), che si adopera nel cleavage del dominio extracellulare N-terminale di APP, vengono prodotti due frammenti: $A\beta_{42}$ da 42 amminoacidi e $A\beta_{40}$ da 40 amminoacidi. Di questi l' $A\beta_{40}$ è in forma solubile mentre l' $A\beta_{42}$ è la forma insolubile amilodogena. Un aumento del rapporto $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ha come risultato la formazione di aggregati extracellulari insolubili di $A\beta_{42}$ che possono poi crescere in fibrille mature. Come già sottolineato da alcuni autori l'accumulo di intermedi oligomeric non fibrillari di $A\beta$ sembrerebbe correlato alla perdita di funzionalità sinaptica.

Gli ammassi neurofibrillari (NFT_s) sono composti da microtubuli associati alla proteina "tau". Questi sembrerebbero associati più a forme di demenza senile piuttosto che all'AD.

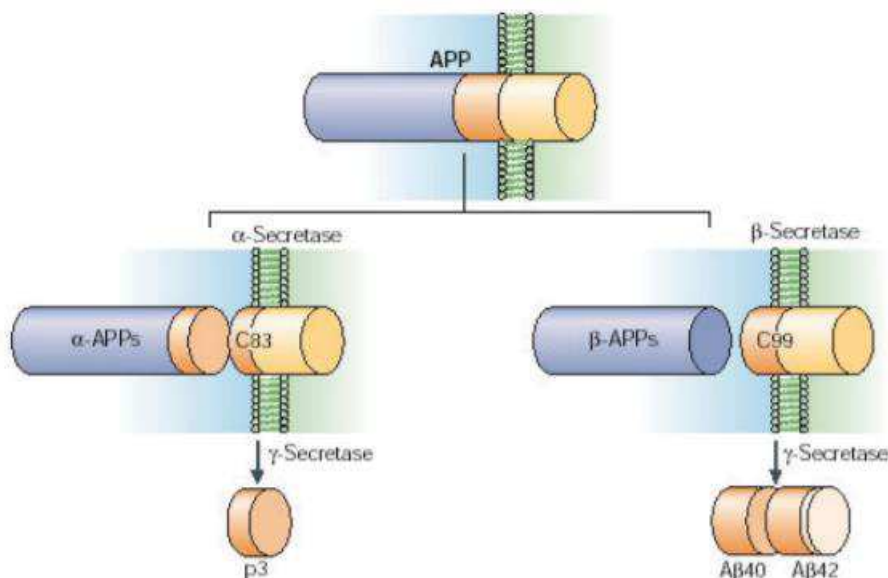


Figura 18 Rappresentazione dei meccanismi di proteolisi dell'APP: via non amilogena (scissione ad opera della α -secretasi) e via amilogena (scissione ad opera della β -secretasi)

Gli $A\beta$ oligomeri disturbano i neurotrasmettitori colinergico e glutammatergico della corteccia basale, entrambi vitali per la cognizione e la formazione della

memoria [39]. Sul sistema colinergico in particolare gli A β oligomeri agiscono su vari livelli riducendo l'attività della "colina acetiltransferasi" (ChAT; l'enzima impiegato nella biosintesi della colina), diminuendo la concentrazione intracellulare della acetilcolina (ACh) e inibendo direttamente il rilascio sinaptico e l'assorbimento di ACh [40]. Gli aggregati A β interagiscono con il recettore permeabile al calcio (Ca²⁺) α 7-nicotina acetilcolina. Questo causa iperattività cellulare.

Il ruolo attribuito recentemente alla taurina sarebbe quello di contrastare lo sviluppo della malattia prevenendo il misfolding e l'aggregazione del β -peptide. Essendo un osmolita interagisce con la struttura (backbone) del peptide e con le catene laterali amminoacidiche.

2 MATERIALI

2.1 Lisozima

Il Lisozima è un enzima con attività batteriolitica che appartiene alla classe delle idrolasi. Ha attività glicosidasi nei confronti del legame β -1,4 glicosidico che si forma tra acido N-acetilmuramico (NAM) e l'acido N-acetilglucosamina (NAG) che sono le unità di base del peptidoglicano (costituente della parete cellulare dei batteri Gram +). Riscontrabile anche l'attività transglicosilica e seppur bassa anche quella di esterasi. È ubiquitario di tutti gli esseri viventi e nell'uomo è stato ritrovato, in forma mutata, in stati patologici quali l'amiloidosi sistemica ereditaria a trasmissione autosomica, che seppur rara vede l'accumulo di depositi amiloidi a livello renale. In vitro la proteina se soggetta a denaturazione può dare aggregati che formano fibre amiloidi.

In questo studio è stata utilizzato lisozima estratto da albume d'uovo (HEWL, hen egg white lysozyme) che è analogo al lisozima umano. La struttura di questa proteina è stata ampiamente risolta mediante analisi di cristallografia ai raggi x. I primi risultati si ebbero nel 1962 a una risoluzione di 6 Å a questo segue un lavoro del 1965 di David Chilton Phillips a risoluzione di 2 Å [41]. Ad oggi la caratterizzazione della struttura di questa enzima a più bassa risoluzione, risale al 2006, ed è di 0.65 Å misurata usando la radiazione del sincrotrone a 100 k [42].

Allo stato nativo si presenta in forma globulare, è costituita da 129 aminoacidi e il suo peso è di 14.4 kilodalton. Il suo punto isoelettrico è circa 11.2. Ha una conformazione $\alpha+\beta$, con un 40 % degli aminoacidi coinvolti in strutture α -eliche e

il 10 % in strutture β -foglietto. Il lisozima è una proteina molto stabile, anche grazie alla presenza di 4 ponti disolfuro.

Il lisozima HEWL è stato ampiamente caratterizzato e studiato in letteratura, questo lo rende una buona proteina modello per lo studio della fibrillazione in vitro. Sembrerebbe che una regione specifica sia coinvolta nel processo di auto-aggregazione. Una parte della catena di circa 9 aminoacidi (GILQINSRW) che occupano le posizioni dalla 54 alla 62. Viene indentificato come K-peptide, situato in una tasca interna a livello della giunzione che connette il dominio α con il dominio β [43]. In condizioni denaturanti a pH acido (2 e 4) questo frammento peptidico viene a trovarsi esposto sulla superficie e sembra convertirsi in un core di aggregazione per dar luogo a fibrillazione e amiloidosi. La sua capacità auto-aggregante sembrerebbe dipendere dalla lunghezza del frammento e dalla presenza di aminoacidi idrofobici. Nello specifico risulterebbe cruciale, nella formazione delle fibrille amiloidi, il ruolo del Triptofano in posizione 62.

2.2 Congo red

La colorazione mediante Congo red (CR) è un metodo qualitativo per l'individuazione di fibre amieloidi in vitro e in sezioni di tessuto. Il Congo red è un composto organico, potenzialmente tossico, con elevata affinità per i β -foglietti e con proprietà ottiche che conferiscono birifrangenza, se sottoposte al materiale a cui si legano se sottoposte a luce polarizzata. Dal punto di vista chimico è un sale di sodio dell'acido BENZIDINEDIAZO-BIS-1-NAPHTYLAMINA-4-SOLFONICO (Formula Bruta: $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$) con peso molecolare (MW) di

696.60 g/ml e diametro molecolare di circa 21 Å. Ha una struttura lineare simmetrica, il centro idrofobico è costituito da due anelli fenilici, legati mediante ponti diazoici a due metà terminali cariche. Queste metà terminali contengono acido solfonico e gruppi amminici.

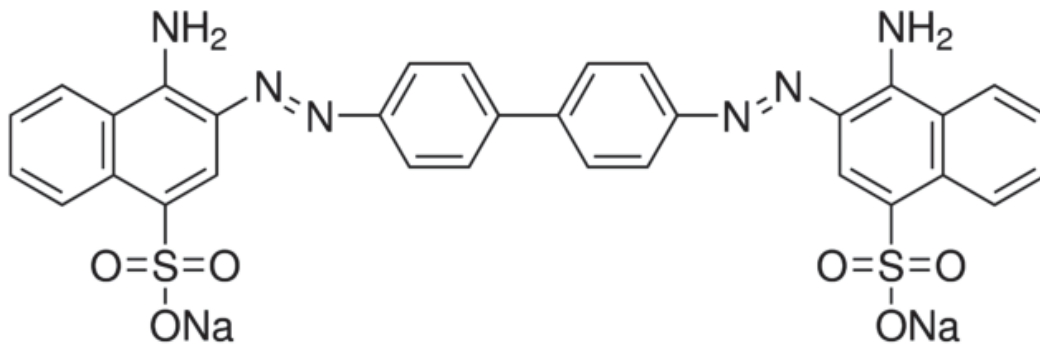


Figura 19 Struttura Chimica del Congo Red

Il CR venne scoperto nel 1883 dal chimico Paul Bottiger che cercava di sintetizzare una sostanza che poteva essere utilizzata come indicatore di pH. Infatti in condizioni alcaline o in soluzioni debolmente acide si trova in forma di chinone e produce un colore rosso, mentre in condizioni acide si trova in forma di solfonato e da colorazione blu/violetta.

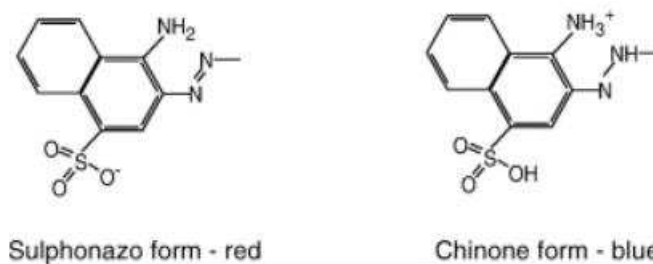


Figura 20 unità terminali del Congo red: forma solfonata a pH acido e forma chinonica a pH basico

Solo successivamente venne utilizzato per l'individuazione di strutture amieloidi per via della sua affinità con la conformazione a foglietto β delle proteine fibrillate. I tessuti che presentano aggregati amiloidi, dopo essere stati trattati con soluzione alcalina di CR, assumono un intenso colore rosso alla luce bianca.

Il meccanismo d'interazione del Congo red con le fibre amiloidi non è ancora del tutto chiaro. In principio si pensava che si instaurassero dei legami idrogeno.

In seguito, studi strutturali e simulazioni di docking molecolare suggerirono una interazione polare tra i gruppi solfonati carichi negativamente (-) e i residui aminoacidici carichi positivamente (+) [44].

Sono stati sviluppati due modelli corrispondenti a due siti di legame che sono stati individuati: BS2 e BS4 [45].

BS2 sembrerebbe condiviso con un altro colorante, la thioflavina (THF). È un sito ad alta densità ed è presente ogni 3 $\alpha\beta$ monomeri. Questo sembrerebbe favorire un legame parallelo all'asse fibrillare e quindi antiparallelo rispetto i β -foglietti. Questo modello si basa sul fatto che la lunghezza della molecola di Congo red è circa 19 Å; La distanza tra due $\alpha\beta$ monomeri è stimata intorno ai 4.8 Å, quindi ogni cinque $\alpha\beta$ monomeri abbiamo una distanza di circa 19 Å che corrisponde con la molecola di colorante.

BS4 invece è un sito di legame a bassa densità ed è situato a una estremità della protofibrilla. Conferisce una orientazione antiparallela rispetto all'asse fibrillare e parallela rispetto ai β -sheet. Il Congo red sembrerebbe legare preferenzialmente i siti di legame BS2 e disporsi in modo antiparallelo rispetto i β -sheet, quando però quest'ultimi sono saturati allora si posiziona in modo parallelo rispetto i β -sheet inibendo anche l'elongazione.

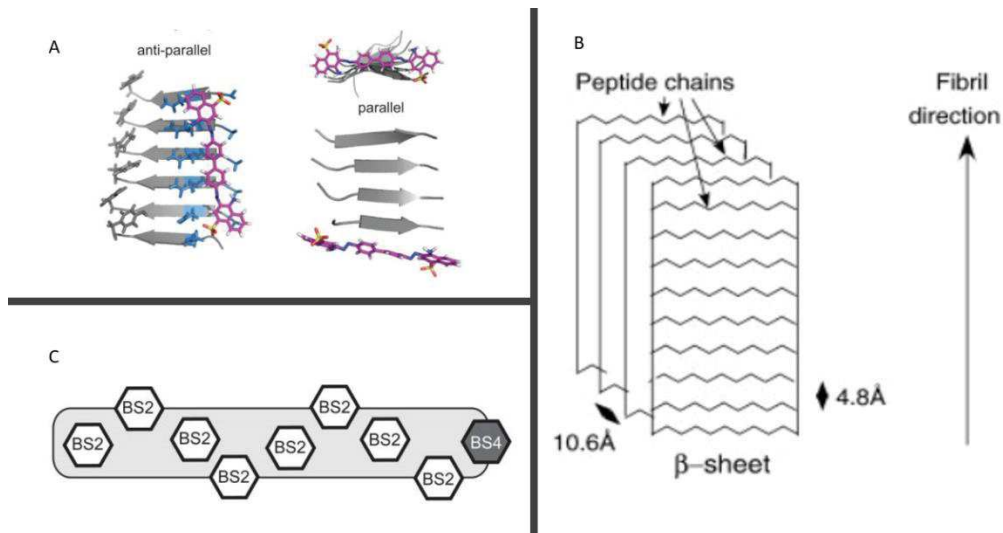


Figura 21 Rappresentazione schematica del legame del Congo red con i β -sheet in modo antiparallelo e parallelo (Figura A) [45]. Rappresentazione schematica dei β -sheet organizzati in fibre amiloidi (Figura B). Rappresentazione schematica dei due siti di legame per il Congo red alla fibrille: il sito BS2 ad alta densità e il sito BS4 a bassa densità (Figura C) [45].

2.3 Taurina

In questo studio è stata utilizzata la Taurina ($C_2H_7NO_3S$) per vedere i potenziali effetti stabilizzanti su proteine modello. La taurina è un aminoacido che ha un ruolo fisiologico importante nell'organismo umano (come già trattato nel capitolo 1). Dal punto di vista strutturale è quella di un'ammina con gruppo funzionale l'acido. Ha un peso molare 125.15 g/mol.

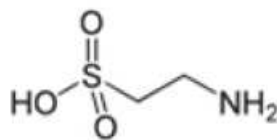


Figura 22 Struttura della taurina [29]

In questo lavoro è stata utilizzata taurina cristallizzata (Sigma Aldrich):

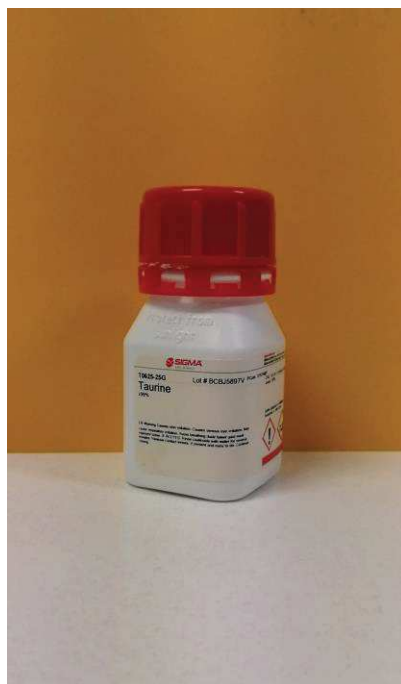


Figura 23 Contenitore di Taurina (Sigma Aldrich) in dotazione del DISVA

Questa molecola è stata testata in soluzione con lisozima (HEWL 3 mg/ml), in presenza e assenza di forza ionica (NaCl) su buffer di soluzione acido (pH 2.3) come verrà poi spiegato nel capitolo 3 (Metodi). Le concentrazioni analizzate sono state diverse da 0mM fino ai 600mM (Come verrà riportato in seguito).

2.4 Zuccheri

In questo lavoro di tesi sono stati anche analizzati 5 zuccheri neosintetizzati (EC312, EC101, EC311, EC202, EC212). Mediante la tecnica del “Small Angle Scattering”, tramite la linea “SAXS” del sincrotrone di Trieste. Gli zuccheri sono stati ideati e realizzati da uno spin-off portoghese a scopi farmacologici (per mantenere inalterati farmaci e proteine durante il trasporto) e sono attualmente sotto brevetto [46] per questo motivo in questo lavoro non è possibile riportare le strutture.

3. METODI

3.1 Preparazione del campione

Il protocollo utilizzato per la preparazione del campione è stato ottimizzato a partire da un lavoro pubblicato in letteratura. È stato utilizzato lisozima da albume d'uovo liofilizzato (Sigma Aldrich) a una concentrazione di 3 mg/ml, sciolto in un buffer di Glicina 70 mM, a pH 2.3.

Sono stati preparati 3 campioni per ciascun esperimento, ognuno dei quali conteneva un volume di 3ml di buffer, così da poter testare la riproducibilità. Il processo di fibrillazione è stato studiato al variare di forza ionica e della concentrazione di Taurina. Per la cinetica di aggregazione il lisozima è stato pesato e poi sciolto in una vials contenente 5 ml del buffer Glicina pH 2.3 e lasciato incubare overnight a 4° C. Dopo 12 h di incubazione la soluzione proteica veniva ulteriormente diluita sempre con altrettanto buffer di glicina acido a concentrazioni diversi di NaCl e Taurina per arrivare alla concentrazione finale desiderata di sale e cosoluto. La cinetica di fibrillazione è stata avviata dislocando i 3 campione alla temperatura di 65° C, in costante agitazione mediante un magnete, per circa 6 ore. Le condizioni investigate interessavano buffer glicina acido (pH 2.3) alle seguenti condizioni:

- Al variare di forza ionica (NaCl)
- Al variare di forza ionica (NaCl) e Taurina

	[NaCl] (mM)	[Taurina] (mM)
Lisozima 3 mg/ml	5	0
	25	0
	50	0
	5	25
	5	50
	5	100
	25	25
	5	400

Figura 24 Parametri applicati per lo studio allo spettrofotometro

Per ogni esperimento veniva prelevata una aliquota di 100µl da ognuno dei 3 campioni in agitazione, ad intervalli di tempo di circa 30 min., che venivano poi diluiti con 350 µl di buffer Glicina basico pH 9.62 e 50µl di colorante (Congo Red) e inseriti in una cuvetta in quarzo di spessore 1 cm per la misura allo spettroscopio.

3.2 Spettrofotometria

La spettrofotometria è una tecnica analitica quantitativa e qualitativa che permette il riconoscimento di una sostanza in base al suo spettro di assorbimento [47]. Ogni sostanza ha uno spettro caratteristico di assorbimento ciò permette di fare analisi sulla struttura e anche sulla dinamica biomolecolare. Le onde elettromagnetiche si propagano nel vuoto alla velocità c , ma ciò che differisce tra le diverse onde è la frequenza di oscillazione [48].

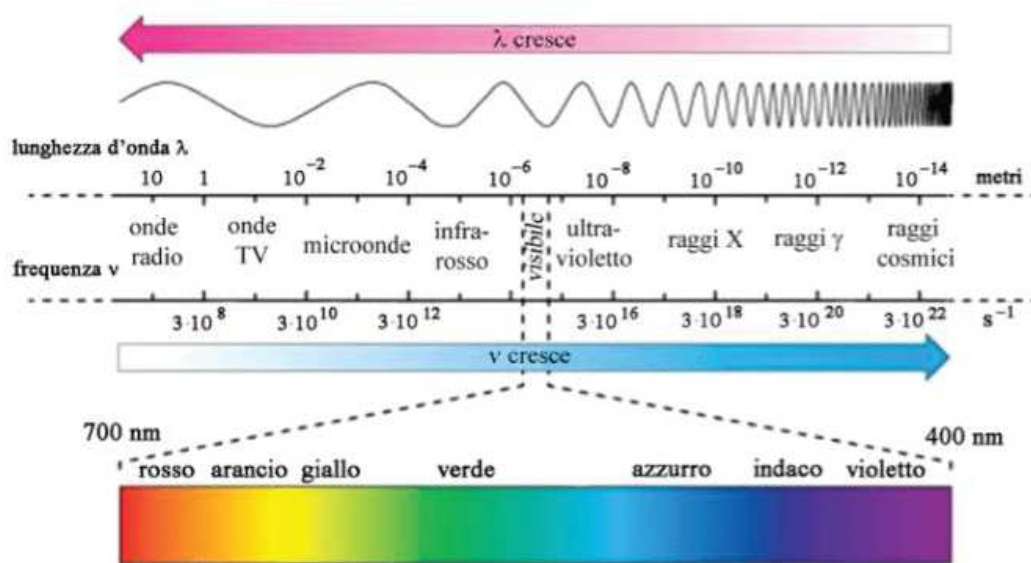


Figura 25 Spettro di assorbimento delle radiazioni elettromagnetiche

Con questo strumento è possibile analizzare l'interazione delle biomolecole e radiazioni di lunghezza d'onda (λ) compresa tra 10 nm e 780 nm, divisibili in:

- UV lontano 10-200 nm
- UV vicino 200-380 nm
- Visibile 380-780 nm

Alcuni di questi strumenti operano anche nella regione vicino all'infrarosso (spettrometri IR). Le regioni più utilizzate per lo studio delle macromolecole biologiche sono il vicino UV e il visibile [49].

Uno spettrofotometro è costituito da una sorgente luminosa, un collimatore (una lente) che trasmette il raggio luminoso il quale passa in un monocromatore (prisma) che divide il raggio nelle diverse lunghezze d'onda dello spettro elettromagnetico, la lunghezza d'onda desiderata verrà poi selezionata da un selettore di lunghezze d'onda, un' apposita cuvetta di quarzo che contiene il campione da misurare ed

infine un rivelatore che converte l'intensità della luce in uscita in intensità di corrente elettrica.

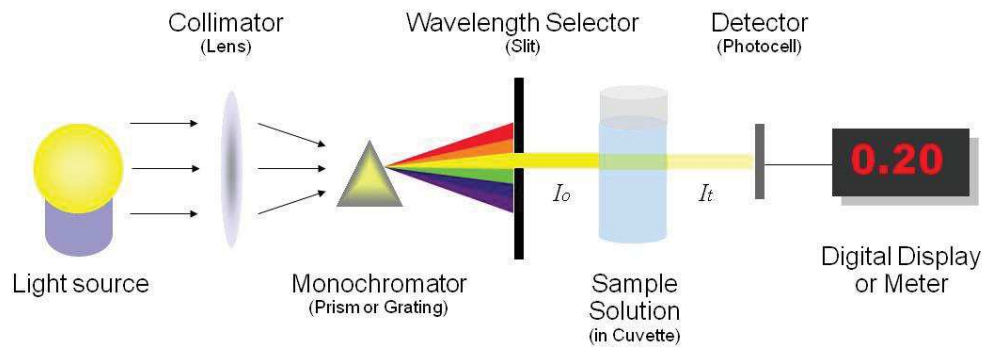


Figura 26 Rappresentazione schematica di uno spettrofotometro [50]

Gli spettrofotometri possono essere a singolo oppure a doppio raggio. In quelli a singolo raggio viene utilizzato uno standard di riferimento per misurare l'intensità della luce prima e dopo il caricamento del campione. Negli spettrofotometri a doppio raggio sono presenti un raggio che passa attraverso lo standard e un altro che attraversa il campione al fine di confrontare l'intensità. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato uno spettrofotometro a singolo raggio.

Una volta che il raggio incidente raggiunge il campione, la quantità di fotoni in grado di attraversare la cuvetta e di raggiungere il rivelatore dipende dallo spessore della cuvetta, dalla tipologia e dalla concentrazione del campione. Nelle analisi mediante spettrofotometria la grandezza fondamentale è la trasmittanza (T). La trasmittanza viene definita come il rapporto tra l'intensità di luce in uscita dalla cuvetta (I) e l'intensità della luce incidente (I_0):

$$T = I/I_0$$

La trasmittanza può assumere tutti i valori compresi tra 0 e 1. Se si conosce la trasmittanza posso calcolarmi l'assorbanza (A), definita dalla seguente equazione:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Se $I=I_0$ l'assorbanza avrà un valore pari a 0, questo significa che le molecole in soluzione non assorbono affatto la radiazione incidente.

Se $I < I_0$ l'assorbanza presenta un valore maggiore di 0 e minore di 1, questo significa che le molecole in soluzione assorbono in parte o tutta la radiazione incidente.

L'assorbanza può anche essere scritta in funzione della concentrazione del campione secondo la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon l c$$

Dove

ϵ coefficiente di assorbimento molare.

l è il cammino ottico della cuvetta. Si intende lo spessore di quest'ultima

c è la concentrazione della molecola in soluzione mol/l.

ϵ , coefficiente di assorbimento molare, dipende dalla natura chimica della sostanza in esame, dalla lunghezza d'onda della radiazione assorbita e dal solvente utilizzato.

Viene solitamente espresso in $M^{-1} cm^{-1}$.

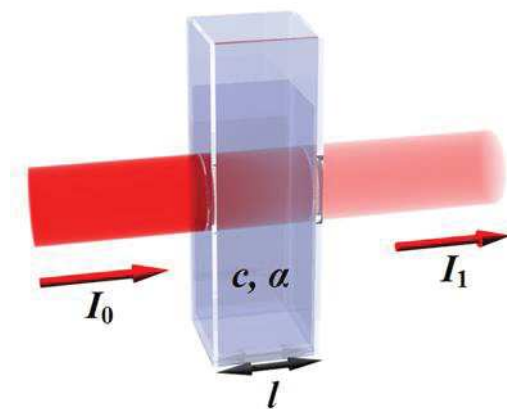


Figura 27 Rappresentazione della legge di Lambert-Beer

Gli aminoacidi proteici hanno un range di assorbimento nel vicino UV tra 180-230 nm. Fanno eccezione gli aminoacidi aromatici come il triptofano, fenilalanina e tirosina, i quali assorbono nell'intervallo 240-300 nm e hanno un picco di assorbimento a 280 nm.

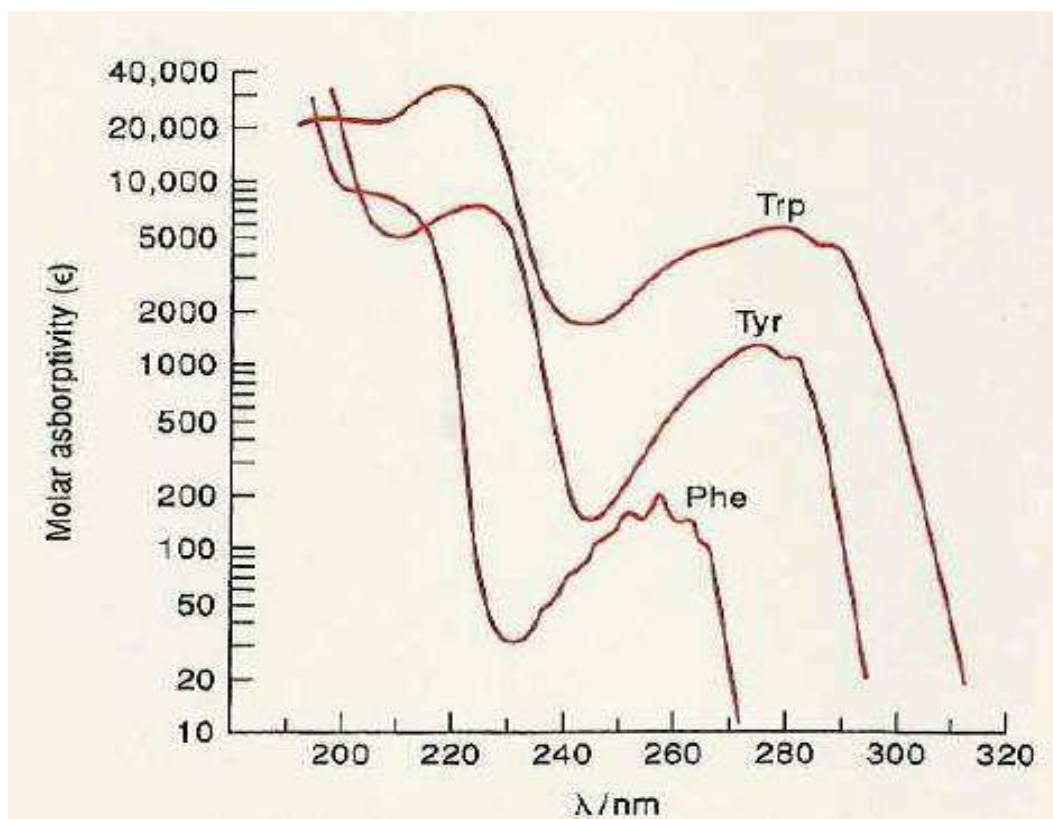


Figura 28 Spettri di assorbimento di tre aminoacidi aromatici: triptofano (Trp), Tirosina (Tyr) e Fenilalanina (Phe) [51]

L'assorbimento del triptofano è circa 5 volte quello della tirosina e circa 50 volte quello della fenilalanina.

Le proteine rispetto ad altre biomolecole hanno un picco di assorbimento a 280nm quasi interamente dipendente dalle proprietà di assorbimento degli aminoacidi aromatici visti sopra.

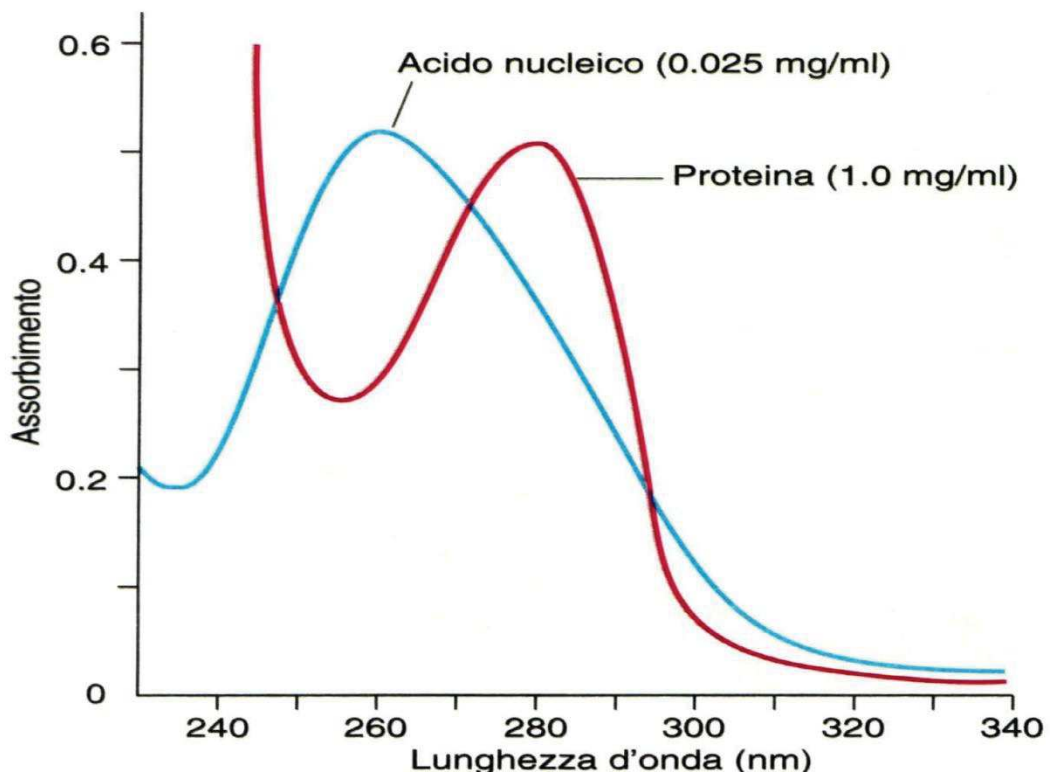


Figura 29 Curve di assorbimento proteine (in rosso) e acido nucleico (in azzurro)[52]

In questo studio la spettrofotometria è stata utilizzata per valutare i cambiamenti strutturali delle proteine in soluzione, andando a monitorare la cinetica di aggregazione da proteine monomeriche a fibre amiloidi. Affinché possa essere valutata la formazione delle strutture β delle fibre amiloidi si è utilizzato il colorante

Congo Red che in soluzione ha un picco di assorbimento a 490 nm. Tuttavia, in presenza di strutture β si lega ad esse e il picco di assorbimento si sposta verso lunghezze d'onda maggiori.

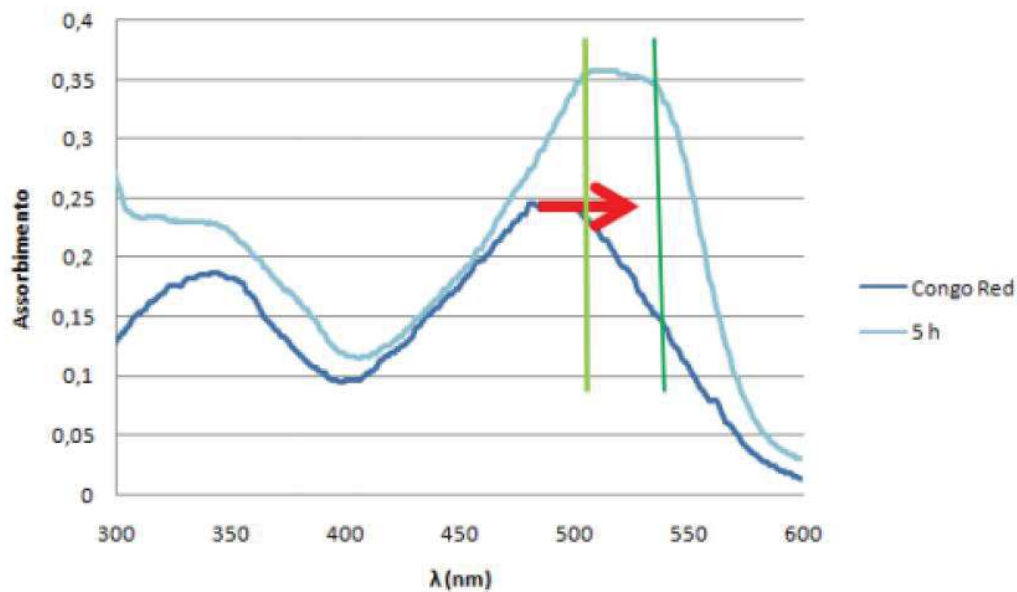


Figura 30 Spettri di assorbimento: Congo Red (in blu) e Congo red interagendo con i β -sheet (in azzurro). Visibile lo spostamento verso lunghezze d'onda λ maggiori da parte del Congo red in seguito al legame con i β -sheet

L'analisi quantitativa è stata svolta valutando il rapporto tra il valore di assorbimento del picco a 538 nm e il valore del picco a 505 nm. I due picchi rappresentano rispettivamente lo spostamento massimo ottenuto a fine cinetica di aggregazione e l'assorbimento del Congo Red in soluzione al tempo zero.

In questo modo otteniamo un'analisi quantitativa della frazione del CR legato alle strutture β , normalizzato rispetto alla frazione di CR libero in soluzione.

PREPARAZIONE CONGO RED

È stata preparata una falcon dal volume di 50 ml con 80 % di etanolo (40ml) e 20 % di acqua (10ml), il tutto portato a saturazione con NaCl. Successivamente il

congo red in polvere è stato sciolto (sotto cappa) portando la soluzione a saturazione e filtrando con apposito filtro da 100nm.

3.3 Dicroismo Circolare

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica mediante la quale si studia il fenomeno fisico dell'assorbimento da parte di una molecola chirale delle due componenti, destra e sinistra, della luce polarizzata circolare. Una molecola viene definita chirale quando è sovrapponibile alla sua immagine speculare. Le immagini speculari di una molecola o enantiomeri hanno proprietà fisiche identiche fatta eccezione della loro interazione con la luce polarizzata.

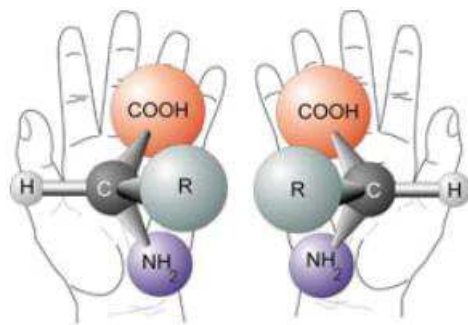


Figura 31 Immagine speculare di una molecola

La luce piano-polarizzata può essere descritta in termini di due componenti circolarmente polarizzate: la luce polarizzata destra (L-CPD) e la luce polarizzata sinistra (R-CPD). Il vettore campo magnetico associato a questi due tipi di luce polarizzata descrive in entrambi i casi un andamento elicoidale, in un caso destrorso nell'altro sinistrorso [53]. Queste due componenti della luce piano-polarizzata

corrono a velocità differenti in un mezzo chirale e da questo deriva l'attività ottica delle sostanze chirali, in particolare la rotazione nel piano della luce polarizzata.

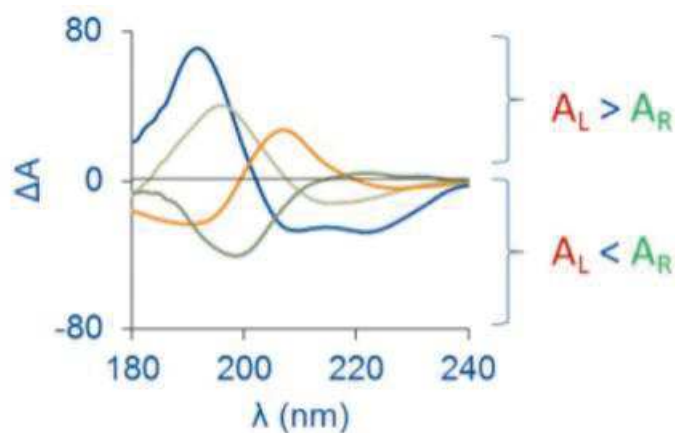
Il dicroismo circolare (CD) misura in funzione della lunghezza d'onda proprio la differenza nell'assorbimento tra la componente destra e la componente sinistra di una molecola chirale. Questo ha come conseguenza che la luce è sovrapposta e non polarizza linearmente ma in modo ellittico. L'ellitticità è proporzionale alla concentrazione della sostanza in esame.

In una macromolecola l'aspetto sinergico di tutti gli elementi chirali che la compongono genera uno spettro CD tipico che rappresenta "l'impronta digitale" della molecola stessa. Uno spettro CD può essere usato per identificare elementi strutturali di una macromolecola e seguirne i cambiamenti strutturali. Le variazioni nello spettro CD sono indicativi di alterazioni della struttura terziaria e secondaria.

Segnale CD = $A_L - A_R$

Se $L-CLP > R-CLP$ il segnale è positivo (+)

Se $L-CLP < R-CLP$ il segnale è negativo (-)



A parità di lunghezza d'onda, un segnale CD può essere positivo o negativo, a seconda che la componente sinistra L-CLP sia assorbita di più o di meno rispetto alla componente destra R-CLP.

Nel caso specifico delle proteine, 19 degli amminoacidi (AA) maggiormente presenti nelle proteine sono chirali (fa eccezione la glicina). È possibile quindi seguire l'alterazione della struttura secondaria e terziaria di una proteina a determinate condizioni. Nel nostro caso abbiamo seguito la denaturazione del lisozima aumentando la temperatura del campione mediante l'utilizzo di un termostato collegato al dicrografo. Sono state preparate soluzioni da 3 mg/ml di lisozima disciolto in un buffer glicina acido (70mM, pH 2.3). Tramite apposita pipetta è stata riempita una cuvetta di quarzo dal diametro di 0,01 cm. Il termostato è stato programmato per portare la cuvetta, collegata con appositi tubi al liquido di riscaldamento, a temperature gradualmente più alte fino a un massimo di 90 ° C. Dello spettro CD, la parte più importante per gli esperimenti effettuati, era quella relativa ai valori prossimi a 223 nm, che è la lunghezza d'onda (λ) relativa al minimo corrispondente all' α -elica, che dovrebbe diminuire in intensità nel caso di unfolding [54].

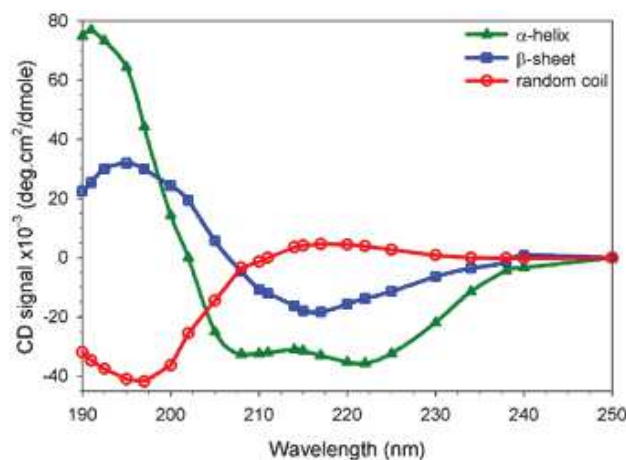


Figura 32 Segnale CD caratteristico per le diverse strutture secondarie: α -elica, β -sheet e random coil

STRUTTURA DICROGRAFO:

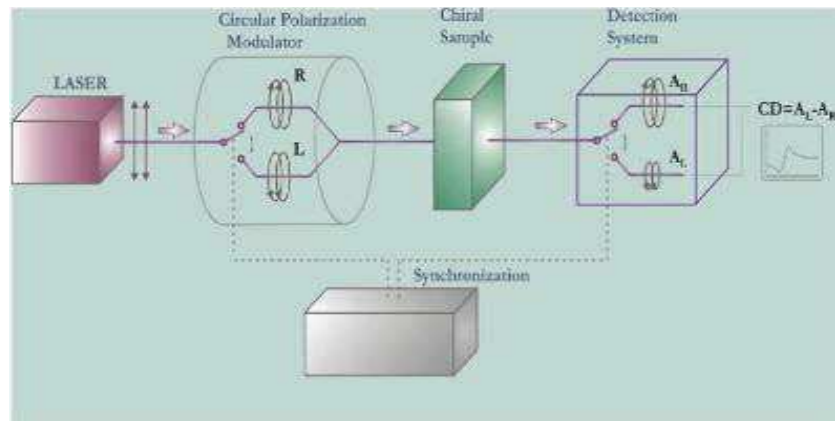


Figura 33 Rappresentazione schematica della struttura di un dicrografo

Il Dicrografo è costituito da una lampada a Xeno che produce una radiazione polarizzata. Questa luce polarizzata viene fatta passare all'interno di un monocromatore in modo da selezionare la lunghezza d'onda scelta. La componente fondamentale è un modulatore ottico costituito da un cristallo in grado di far passare in modo alternativo la componente destra e la componente sinistra della luce polarizzata, in base a un campo elettrico applicato. In questo modo il campione è attraversato in modo alternativo dalle due componenti. Se le due componenti sono assorbite in maniera diversa il rilevatore origina un segnale di intensità oscillante. L'ampiezza di questa oscillazione permette di misurare il dicroismo circolare.

3.4 Microscopia a forza atomica (AFM)

Il microscopio a forza atomica (Atomic Force Microscopy, AFM) è un microscopio con sonda a scansione (SPM), inventato da Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber nel 1986 [55]. È una tecnica topografica tridimensionale con un'alta risoluzione atomica per misurare le superfici di un campione ma anche per studiarne

le caratteristiche fisiche. Tramite AFM è possibile analizzare diversi tipi di campioni come polimeri, materiale biologico, polveri, fibre e Hydrogel [56].

Il microscopio a forza atomica non fa uso di lenti per formare l'immagine, ma si avvale di una sottilissima punta metallica di silicio posizionata all'estremità di una leva flessibile (cantilever) eseguendo così una scansione sulla superficie del campione [57]. Durante la scansione si stabiliscono deboli forze di interazione tra punta e campione che determinano una flessione della leva ed una conseguente rilevazione della topografia del campione stesso.

Il sistema ottico è invece costituito da un laser e da un fotodiodo: il laser viene riflesso dal retro del cantilever verso il fotomoltiplicatore che converte l'energia luminosa in energia elettrica e amplifica il segnale in entrata.

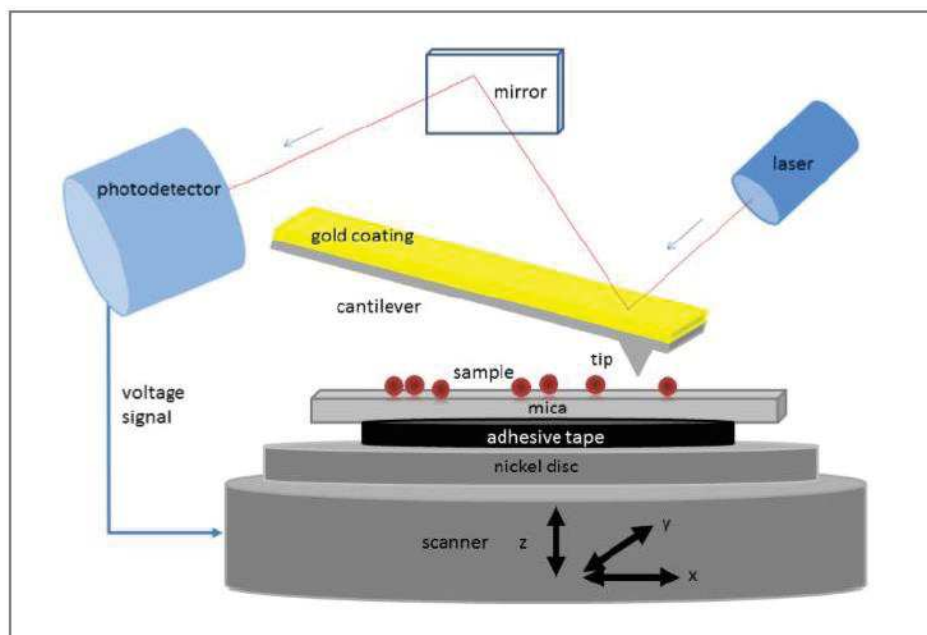


Figura 34 Principio di funzionamento AFM [58]

Esistono varie modalità con cui può funzionare lo strumento. Le più importanti non contact mode, contact mode e tapping mode [59]. Nel primo caso la punta si trova

in risonanza con la superficie del campione con il quale interagisce elettrostaticamente. Modulazioni nella superficie del campione produrranno cambiamenti nei legami stabiliti fra la punta e il campione. La punta per mantenere la stessa risonanza sarà costretta a modificare la distanza dal campione. Questi spostamenti sono registrati e utilizzati per la ricostruzione dell'immagine della superficie del campione. Nel secondo modo la punta si trova in continuo contatto con la superficie del campione sulla quale si muove strisciando, mentre nel terzo caso, la leva viene fatta oscillare ad una frequenza di qualche centinaio di kHz in modo da stabilire un contatto intermittente.

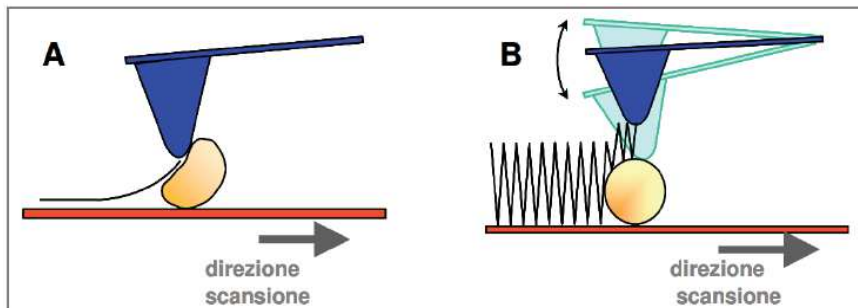


Figura 35 Modalità di scansione del campione: contact mode (A) e tapping mode (B)

I risultati ottenuti da questo strumento si presentano sotto forma di immagini. Queste possono mostrare l'immagine in funzione della magnitudo registrata dallo strumento, dell'altezza relativa al campione, e in base ad altre caratteristiche.

Nel caso specifico di questo lavoro abbiamo usufruito delle prestazioni del microscopio AFM-RAMAN (Horiba Scientific) di cui il DISVA è dotato.



Figura 36 Microscopio a Forza Atomica (Horiba) [60]

Per effettuare le analisi sono stati diluiti i campioni con lo stesso buffer glicina (70mM) a pH acido (2.3). La diluzione scelta era 500 μ l:500 μ l.

Sono stati poi prelevati 15 μ l da ogni campione e posizionati su di un portacampione rivestito di mica in maniera omogenea.



Figura 37 Portacampioni rivestiti con Mica per le analisi all'AFM

La mica su cui sono stati posti i campioni è alluminio-silicato e struttura lamellare. Come supporto dei dischetti magnetici (diametro:15mm, altezza:3mm).

I campioni sono stati fissati per 15 minuti, sono stati soggetti a lavaggio con acqua milliq per rimuovere la presenza di eventuali aggregati e in seguito asciugati tramite flussaggio con azoto.

3.5 Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)

Lo Small Angle X-ray Scattering è uno strumento potente per determinare le caratteristiche strutturali di molecole in soluzione, quindi nelle condizioni più vicine a quelle naturali. Dà informazioni a bassa risoluzione sulla struttura terziaria e quaternaria delle proteine e consente di individuare le conformazioni intermedie assunte da un polipeptide durante il folding proteico.

Dal punto di vista fisico i raggi X sono delle onde elettromagnetiche con lunghezza d'onda (λ) compresa tra 0.1 e 100 Å, mentre, da un punto di vista quantistico sono fotoni con energia $E = h\nu = hc/\lambda$, compresa tra 0.1 e 100 Kev (1 keV = $1.6 \cdot 10^{-16}$ J) [48].

L'onda elettromagnetica viene rappresentata da un campo elettrico (\vec{E}) e da un campo magnetico (\vec{B}) che oscillano perpendicolarmente tra loro e in fase (ossia i massimi e i minimi dei due campi si trovano nelle stesse posizioni sull'asse delle x).

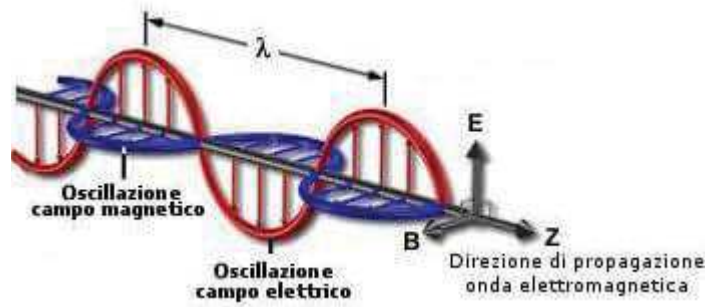


Figura 38 Rappresentazione schematica di un'onda elettromagnetica: oscillazione del campo elettrico (in rosso) e del campo magnetico (in blu).

Nel vuoto tutte le onde elettromagnetiche si propagano alla velocità $c=1/\sqrt{\epsilon\mu}$. Ciò che differisce tra le diverse onde è la loro frequenza di oscillazione. Si chiama spettro elettromagnetico l'insieme delle frequenze delle onde elettromagnetiche.

In una misurazione SAXS il fascio di raggi X proveniente, come in questo caso, da un sincrotrone passa attraverso un monocromatore che seleziona una finestra di lunghezza d'onda abbastanza stretta. Il raggio incidente indicato dal vettore onda \vec{K}_i procede attraverso un dispositivo di collimazione per poi incidere nel campione da analizzare. La radiazione verrà poi parzialmente diffusa e/o assorbita da uno beam posizionato davanti al detector che ne evita il danneggiamento. L'intero cammino che compie la radiazione è mantenuto sottovuoto spinto così che l'aria non interferisca con la misurazione. Il raggio diffuso colpirà il detector in una certa posizione che dipende dall'angolo di scattering (2θ) che definisce il vettore di scattering \vec{q} [61].

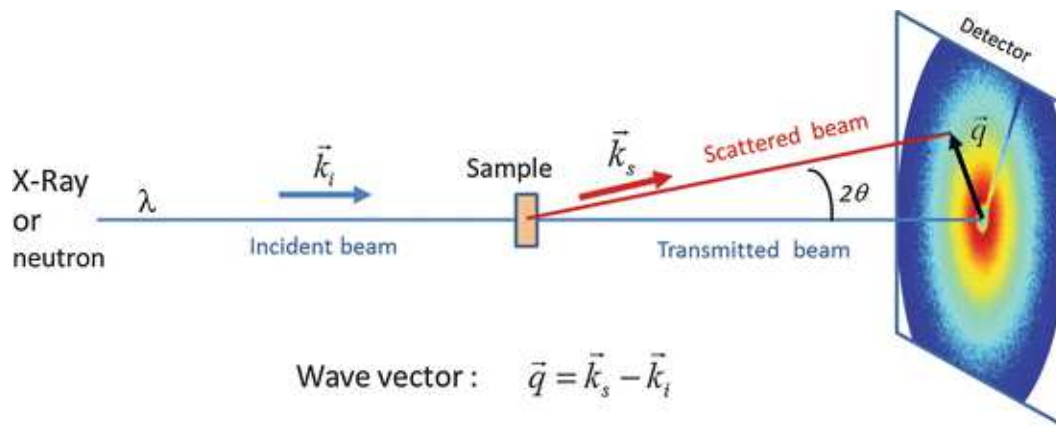


Figura 39 Rappresentazione schematica di scattering a piccolo angolo

Maggiore è la dimensione della particella analizzata, minore sarà l'angolo di scattering.

Quando un fascio collimato di raggi X viene ad interferire con un elettrone si possono provocare diversi tipi di scattering, il più semplice dei quali è lo scattering elastico. In questo caso la radiazione non perde energia dopo essere stata deviata, dal momento che la frequenza della radiazione incidente è molto maggiore rispetto alla frequenza di vibrazione propria dell'elettrone. Perciò l'elettrone colpito dal raggio inizia a vibrare alla stessa frequenza d'onda della radiazione elettromagnetica incidente. L'elettrone vibra statisticamente in ogni direzione quindi l'onda prodotta è di forma sferica. Per questo motivo in qualsiasi angolazione si localizzi il detector si otterrà un segnale [62].

Scattering Elastico:

$$|K_S| = |K_i| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad \vec{q} = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$$

Lo scattering elastico è valido anche se si considera un sistema con più elettroni. Considerando un sistema con due elettroni assumendo che la distanza tra i due sia molto inferiore a quella tra sorgente ed elettroni e anche a quella tra elettroni e

detector, è possibile considerare paralleli sia i vettori unitari \hat{S}_0 (ovvero il fascio incidente) sia l'asse di propagazione delle onde secondarie prodotte dall'interazione degli elettroni col fascio di raggi X.

Le onde secondarie prodotte hanno stessa lunghezza d'onda e la stessa frequenza dell'onda incidente, ma diversa fase.

La differenza di fase è data da:

$$\delta = \frac{1}{\lambda} r (\hat{S} - \hat{S}_0)$$

quindi il vettore di scattering \vec{q} viene definito come:

$$\vec{q} = \frac{2\pi}{\lambda} (\hat{S} - \hat{S}_0)$$

La lunghezza d'onda della radiazione incidente è confrontabile con le distanze tra gli elettroni.

Attraverso la tecnica SAXS si può misurare la sezione d'urto differenziale macroscopica, che corrisponde dal punto di vista matematico al quadrato della trasformata di Fourier della distribuzione della densità riguardante il volume del campione irradiato, corrispondente alla seguente formula:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V} \langle | \int d^3r \rho(r) e^{iQr} |^2 \rangle$$

Dove:

V è il volume del campione irradiato

r è il vettore posizione

ρ è la densità elettronica

Q è il vettore di scattering

Le parentesi indicano che la sezione d'urto è mediata su tutte le possibili configurazioni del sistema.

La formula appena riportata può anche più semplicisticamente essere riferita all'intensità di scattering $I(q)$.

Nel caso di studi SAXS sulle proteine in soluzione ci si può rapportare ad un modello a due fasi [62]. In questo caso la proteina può essere trattata come particella a scattering omogeneo avente densità elettronica degli aminoacidi costante (ρ_{Prot}) mentre il buffer come un mezzo continuo e omogeneo con densità elettronica ben definita, ρ_{sol} che in assenza o in presenza di una piccola quantità di sale è 0.334 e/. Quindi con soluzione di buffer omogeneo (o acquoso) come nel nostro caso avremo:

$$\Delta\rho = \rho_{prot} - \rho_{sol}$$

In un sistema isotropico, mono disperso (una sola componente in soluzione) e a simmetria sferica l'equazione si riduce alla seguente:

$$I(\vec{q}) = P_{eff}(q) S_{eff}(q)$$

Dove P_{eff} è il fattore forma effettivo:

$$P_{eff}(q) = n(\Delta\rho)^2 V_p^2 P(q)$$

Mentre I_{eff} è l'interazione particella-particella che in campioni molto diluiti può essere trascurata.

Quindi se $I_{eff} = 1$

$$I(q) = n(\Delta\rho)^2 V_p^2 P(q)$$

Dove $P(q)$ è il fattore forma, definito come la media su tutte le orientazioni della particella del quadrato della sua ampiezza di scattering:

$$P(q) = \langle F^2(Q) \rangle_{\omega Q}$$

Deduciamo che l'intensità di scattering è direttamente proporzionale alla concentrazione della proteina (n)

Il fattore di forma è uno dei parametri che ricaviamo dalla elaborazione delle curve SAXS. L'andamento del fattore di forma, in funzione dell'angolo di scattering, è caratteristico della geometria della molecola analizzata.

Un altro parametro che ricaviamo dall'analisi delle curve di SAXS è il raggio di girazione che fornisce indicazioni sulle dimensioni medie della particella ed è il raggio d'ingombro medio della stessa. Viene rappresentato dalla legge di Guinier:

$$R_g^2 = \frac{\int r^2 \delta\rho(r) dr}{\int \delta\rho(r) dr}$$

La Caratterizzazione della struttura proteica tramite SAXS è piuttosto impegnativa. Si possono intraprendere metodi indiretti e diretti. I metodi indiretti si basano sulla interpretazione di un dato sperimentale con un fattore forma calcolato da un modello che può variare da una semplice forma geometrica a un complesso eterogeneo o essere basato su coordinate cristallografiche. I metodi diretti si basano

sulla rappresentazione grafica: Kratky plot o approssimazioni come quelle elaborate da Guinier, forniscono informazioni a bassa risoluzione sulla specie in soluzione senza necessità di avere un modello imposto dalle indagini di partenza.

Kratky Plot:

il plot di Kratky viene definito come la rappresentazione dell'intensità di scattering moltiplicata per il vettore Q elevato al quadrato $q^2I(q)$, in funzione di q .

Ci da informazioni tra la forma compatta o uno stato unfoldato della proteina o riguardo la presenza di intermedi. Per la proteina nativa il plot di kratky è caratterizzato dalla presenza di un picco largo a campana. La cui posizione dipende dalla grandezza media della proteina es. dal raggio di girazione. Quando la proteina assume uno stato completamente unfoldato la curva $q^2I(q)$ subisce un aumento continuo in funzione di q . Per proteine semi flessibili il plot mostra un picco abbastanza largo che tende leggermente ad aumentare con q -range più alti.

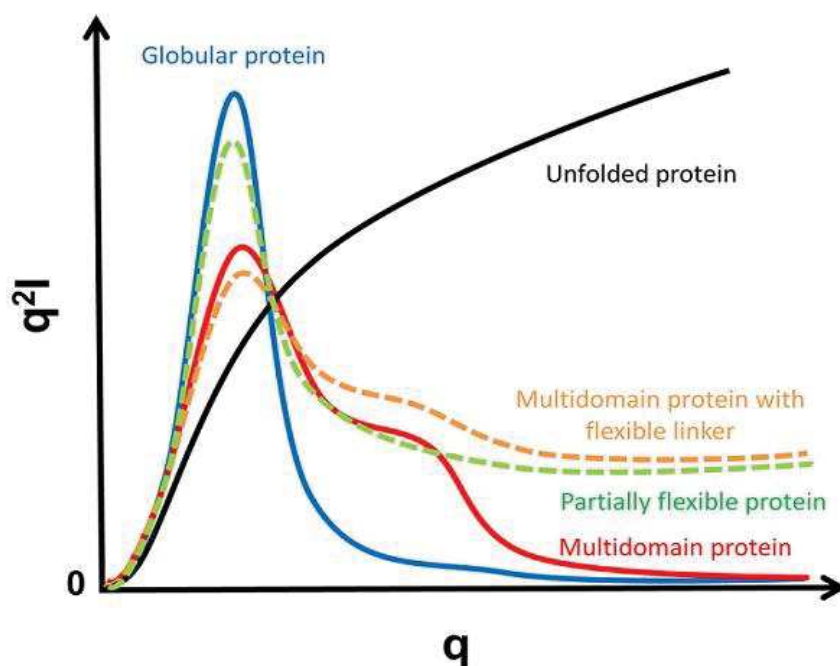


Figura 40 Rappresentazione schematica del plot di kratky

APPROSSIMAZIONE DI GUINIER

La legge di Guinier si basa sull'approssimazione del fattore di forma a basso Q. Per Q piccoli la funzione P(q) è approssimabile a:

$$I(q \rightarrow 0) \cong I(0)e^{-\frac{R_g^2 q^2}{3}}$$

Dove R_g è il raggio di girazione

$I(0)$ come riportato dall'equazione vista prima è misura o della concentrazione della proteina, se l'aggregazione è ostacolata e la relazione tra scattering di contrasto e volume proteico è stabilito, oppure misura il peso molecolare di una particella in soluzione, attraverso la concentrazione nominale del campione e lo scattering di contrasto per unità di massa molare.

Questa equazione può essere poi linearizzata nel plot di Guinier $\ln I(q)$ su q^2 , solitamente utilizzato per analizzare curve di scattering di particelle monodisperse di qualsiasi forma a patto che sussiste la condizione che $Q_{max} R_g \leq 1.3$, dove Q_{max} rappresenta il massimo valore di Q dove è corretto fare l'analisi di Guinier.

PLOT DI GUINIER ROD-LIKE

L'approssimazione di Guinier cambia quando si vanno a misurare particelle che hanno una forma molto allungata, ovvero l'intensità di scattering risulta meglio approssimabile con la funzione seguente:

$$I(Q) = \frac{I(0)}{Q} \exp \frac{Q^2 R_c^2}{2}$$

Dove R_c è il raggio della particella cilindrica in soluzione.

La sorgente di raggi X utilizzata per questo studio è quella di Elettra -Sincrotrone di Trieste. Elettra è una sorgente di luce di sincrotrone di terza generazione. È costituita da un anello di accumulazione il cui raggio è pari a 260 metri in cui gli elettroni dotati di elevatissima energia e velocità prossima a quella della luce vengono fatti circolare e forzati a seguire traiettorie ondulatorie. Questo li induce a rilasciare energia sotto forma di luce di sincrotrone con una lunghezza d'onda (λ) variabile fra l'infrarosso e i raggi x e dotata di un'elevatissima brillantezza (cioè caratterizzata da grande intensità e bassa divergenza). Questa luce costituisce un potente strumento di indagine dei materiali, solidi, liquidi e gassosi: infatti, può interagire con i suoi atomi in diversi modi e venire in parte trasmessa, in parte assorbita e in parte riflessa. Ogni interazione è in grado di fornire informazioni fondamentali sulla natura del materiale: la composizione chimica, i tipi di legami esistenti, la struttura microscopica.

In questo studio, nello specifico, è stata utilizzata la luce del sincrotrone, nel range di lunghezza d'onda dei raggi x, per studiare la stabilità termica del lisozima (all'interno di un progetto più ampio che comprendeva anche mioglobina e insulina) in presenza di zuccheri neosintetizzati, per testarne la capacità di proteggere la proteina dalle condizioni denaturanti. L'idea era di derivare le proprietà termodinamiche che regolano le modifiche che i nuovi composti apportano sul guscio di solvatazione delle proteine.

Gli esperimenti al SAXS sono stati effettuati su lisozima alle concentrazioni di 2 g/l e 10 g/l sciolti su buffer con acqua, acido fosforico (H_3PO_4) e NaOH a 1 M, pH 3 e 5, mentre gli zuccheri venivano valutati a 4 concentrazioni differenti per ogni

zucchero: 0 M, 0.05 M, 0.10 M e 0.25 M. Le temperature selezionate da 25 a 60 C°.

Sulla base della taglia delle proteine investigate il range ottimale del modulo del vettore di scattering q è da 0.01 a 0.6 Å⁻¹.

4 RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Analisi al Dicrografo:

Lo scopo di questo studio era valutare gli effetti dell'osmolita taurina nei confronti della struttura del lisozima in condizioni denaturanti a temperatura crescente.

Lo strumento è stato settato (impostato) in modo tale da misurare uno spettro che andava dai 260 ai 180 nm, con una velocità di 20 nm al minuto. Dello spettro CD ci interessavano soprattutto i valori prossimi a 223 nm, che era la lunghezza d'onda (λ) relativa al minimo corrispondente all' α -elica che dovrebbe diminuire in modulo nel caso di unfolding e denaturazione.

Le analisi sono state svolte su lisozima a concentrazione di 3mg/ml in buffer di glicina (70 Mm) acido a pH 2.3 (come riportato nel capitolo 3 "Metodi"). È stato valutato:

- il lisozima da solo
- il lisozima in presenza di taurina a diverse concentrazioni
- il lisozima in presenza di taurina e forza ionica (NaCl)

Lisozima 3 mg/ml	[Taurina] (mM)	Lisozima 3 mg/ml	[Taurina] (mM)	[NaCl] (mM)
	0		400	0
	50		400	50
	100		400	150
	200			
	300			
	400			
	600			

Tabella 3 Condizioni sperimentali investigate.

Sul lisozima nativo il ciclo di denaturazione è stato effettuato a partire dai 20°C fino ai 90 °C con le misurazioni prese a intervalli di 5 °C. Successivamente il procedimento è stato perfezionato a partire dai 5 °C con misurazioni prese sempre a intervalli di 5 °C. Lo strumento è stato impostato con tre accumulazioni per temperatura (per ogni temperatura il campione veniva analizzato tre volte e poi veniva automaticamente fatta una media delle tre misure). I risultati raccolti sono stati rielaborati mediante il software “Gnuplot” che permette di fittare le curve. La funzione utilizzata per fittare le curve è la seguente:

$$f(x) = \frac{(a1 + a2)}{(1 + \exp(\left(\frac{x - x_0}{d}\right)) + a2}$$

Dove:

a1 sarebbe l'ellitticità alla temperatura iniziale (dove inizia la curva)

a2 sarebbe l'ellitticità alla temperatura finale (dove finisce la curva)

x0 sarebbe la temperatura di melting, ovvero la temperatura a cui metà della quantità totale di proteina è ancora nativa e metà invece denaturata.

	a1	a2	X0	d
Liso nat	-21.0 +/- 0.1	-12.0 +/- 0.2	60.0 +/- 0.1	4.0 +/- 0.5
Liso/tau 50mM	-21.3 +/- 0.1	-12.7 +/- 0.2	62.3 +/- 0.5	3.5 +/- 0.4
Liso/tau 100mM	-22.9 +/- 0.2	-12.1 +/- 0.3	59.2 +/- 0.6	4.2 +/- 0.5
Liso/tau 200mM	-19.9 +/- 0.2	-11.5 +/- 0.2	60.9 +/- 0.6	2.8 +/- 0.5
Liso/ tau 300mM	-18.2 +/- 0.1	-10.2 +/- 0.2	60.1 +/- 0.6	4.1 +/- 0.5
Liso/ tau 400mM	-17,4 +/- 0.2	-9.5 +/- 0.2	65.2 +/- 0.6	3.5 +/- 0.5
Liso/ tau 600mM	-18,5 +/- 0.2	-8.9 +/- 0.4	61.7 +/- 1.0	5.4 +/- 0.9
Liso/tau 400mM/ 50mM NaCl	-19.9 +/- 0.2	-10.7 +/- 0.3	60.7 +/- 0.9	6.3 +/- 0.8
Liso/ tau400mM/ 150mM NaCl	-21.2 +/- 0.2	-11.40 +/- 0.35	61.8 +/- 0.8	3.6 +/- 0.7

Tabella 4 Risultati ottenuti dall'analisi dei dati CD.

Per prima cosa è stato effettuato un ciclo di denaturazione su un campione di lisozima allo stato nativo senza taurina (0mM).

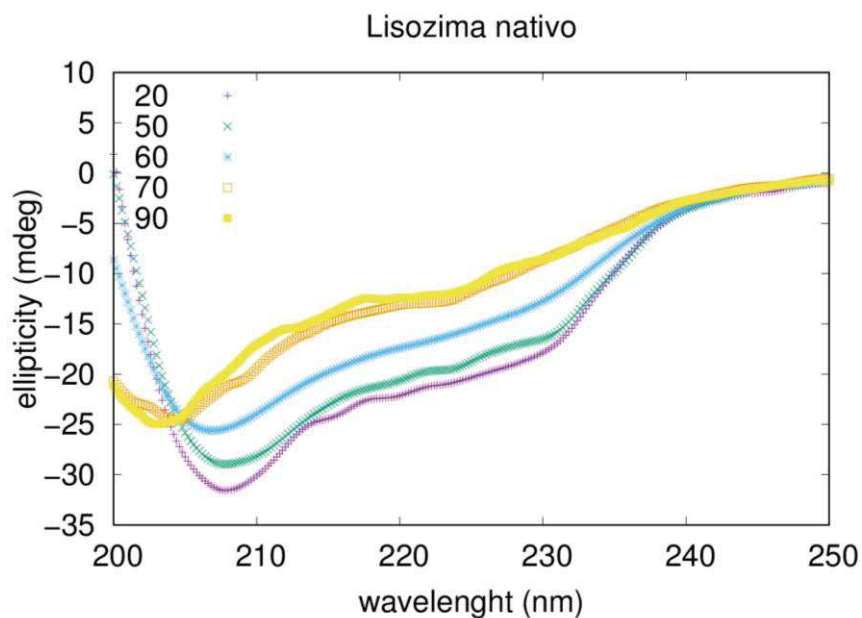


Figura 41 Spettro CD ottenuto in seguito al ciclo denaturante del lisozima all'aumentare della temperatura, come indicato dalla legenda in figura.

In particolare, i dati a 223nm sono stati rielaborati e fittati mediante gnuplot come mostrato in figura 42.

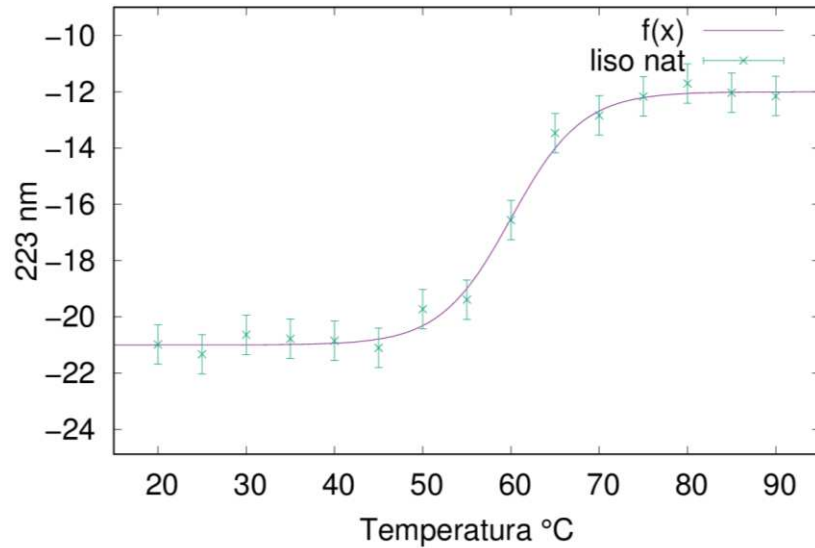


Figura 42 Segnale CD a 223 nm in funzione della temperatura per il lisozima nativo soggetto a ciclo di denaturazione. La curva rappresenta il fit teorico dei dati sperimentali.

Lo spettro CD del campione senza taurina è stato messo a confronto con lo spettro CD fatto su di un campione con taurina a concentrazione di 50mM (vedi grafico figura 45).

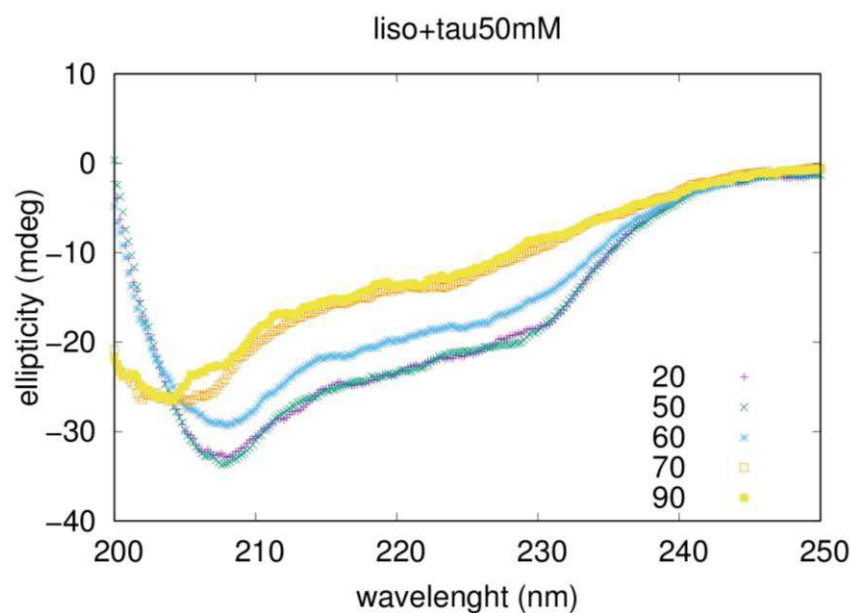


Figura 43 Spettro CD ottenuto in seguito al ciclo denaturante del lisozima in presenza di 50mM di taurina all'aumentare della temperatura

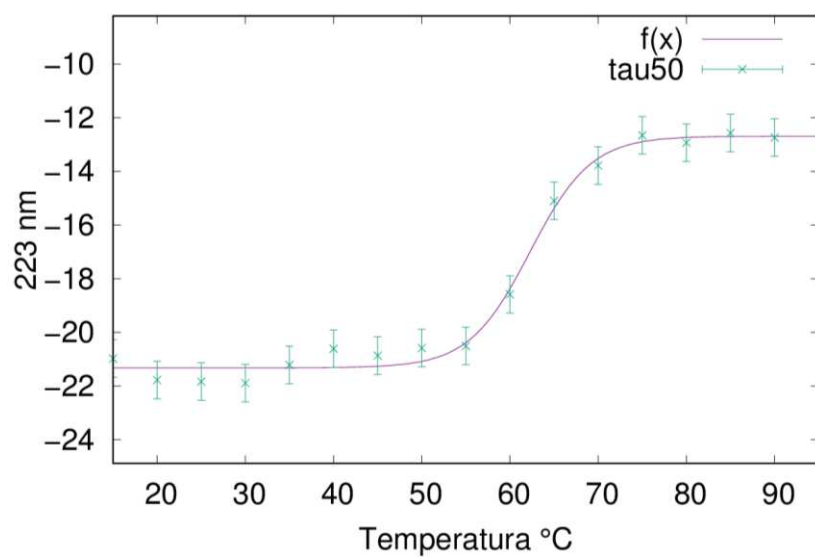


Figura 44 Segnale CD a 223 nm in funzione della temperatura per il lisozima con 50mM di taurina soggetto a ciclo di denaturazione. La curva rappresenta il fit teorico dei dati sperimentali.

I risultati ottenuti a concentrazione di 50mM mostrano uno spostamento della curva e un aumento della temperatura di melting. Dimostrano che l'aggiunta di taurina rallenti in qualche modo la denaturazione.

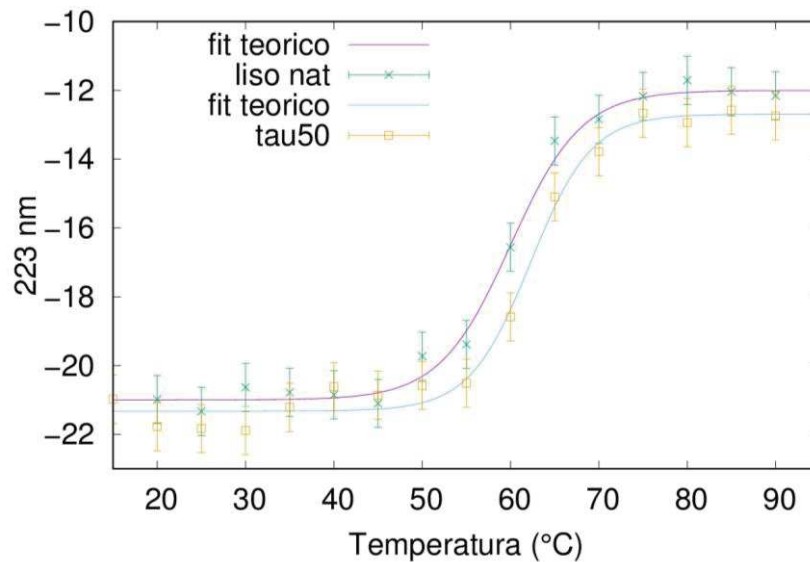


Figura 45 Segnale CD a 223 nm in funzione della temperatura per il lisozima senza taurina e con 50mM di taurina soggetto a ciclo di denaturazione. La curva rappresenta il fit teorico dei dati sperimentali

Nella tabella 4 sono riportati i valori delle temperature di melting dei vari campioni. A concentrazione di 50mM di taurina la temperatura di melting con buona approssimazione aumenta fino a ~ 62.3 °C rispetto ai ~ 60 °C del lisozima allo stato nativo in assenza di taurina.

È stata poi condotta una misura con taurina a concentrazione raddoppiata (100 mM), iniziando il ciclo di denaturazione a partire dai 20°C. Per cercare di capire che cosa avvenisse alla temperatura critica di melting della proteina (intorno ai ~ 60 °C) le misurazioni sono state condotte a intervalli più stretti ogni $\sim 2/3$ °C a partire dalla temperatura di 50 °C fino a 70 °C.

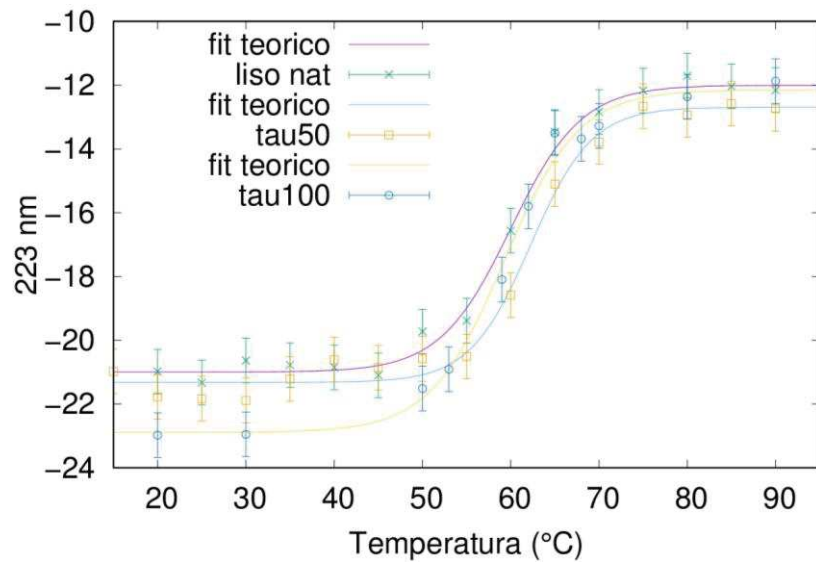


Figura 46 Segnale CD a 223nm in funzione della temperatura. Confronto dei fit teorici dei dati sperimentali: liso nat, tau 50, tau 100

Il raddoppio della concentrazione di Taurina fino a 100mM non sembra modificare il quadro precedente, sembrerebbe quasi inefficace. Infatti, dai valori riportati in tabella 4 la temperatura di melting a concentrazione di 100mM è intorno ai ~ 60°C.

La concentrazione di taurina è stata poi portata a 400 mM. Sono stati messi a confronto gli spettri (CD):

- in assenza di taurina
- a concentrazione 50 mM di taurina
- a concentrazione di 400 mM di taurina.

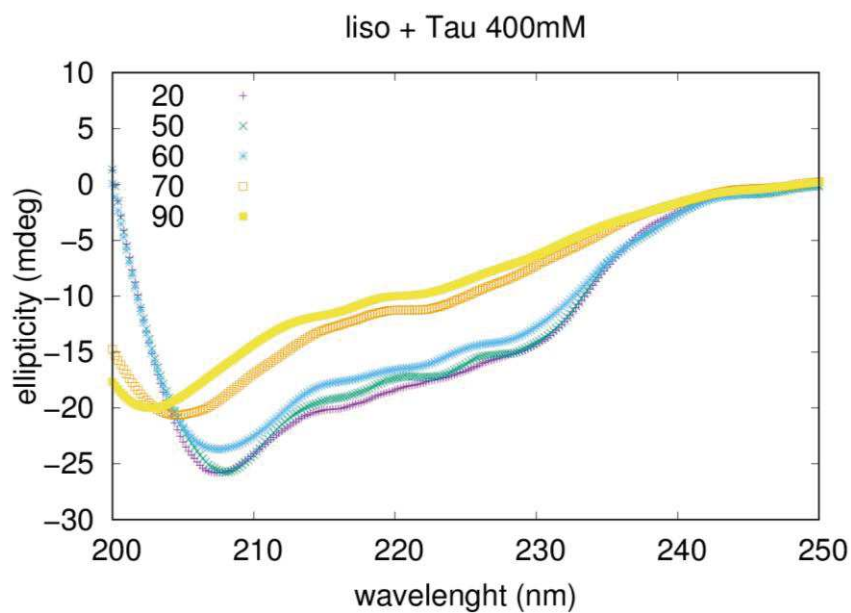


Figura 47 Spettro CD ottenuto in seguito al ciclo denaturante del lisozima in presenza di 400 mM di taurina all'aumentare della temperatura

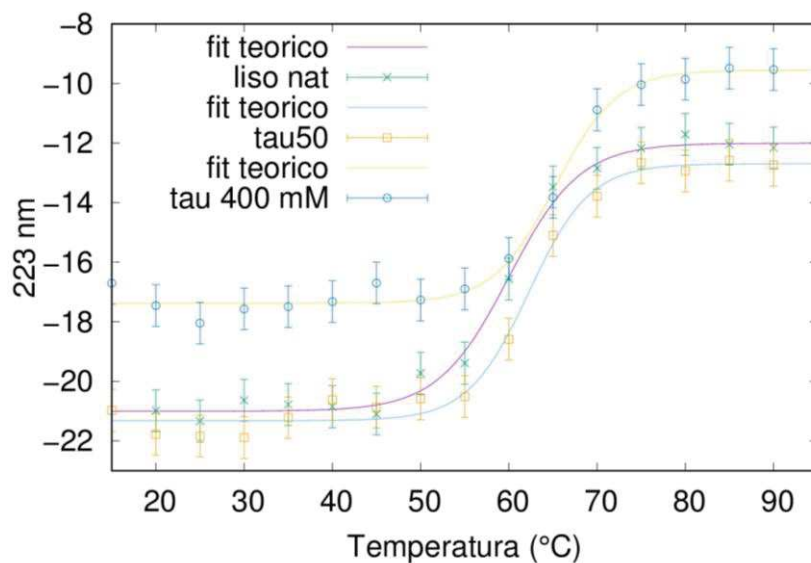


Figura 48 Segnale CD a 223 nm in funzione della temperatura: Confronto tra curve che rappresentano il fit teorico dei dati sperimentali. Liso nat, tau 50mM, tau 400mM

È stata anche calcolata la temperatura di melting a 400mM di Taurina. Messa a confronto con le altre due (come riporta il grafico della figura 48), si nota un considerevole spostamento del picco a concentrazione di 400mM. In particolare, sembrerebbe che la temperatura di melting venga raggiunta intorno ai ~ 65.2 °C,

mostrando un promettente rallentamento rispetto ai casi precedenti. La temperatura di melting in questo caso è stata anche calcolata e graficata su Excel per far vedere lo spostamento delle curve. Considerando il rapporto:

$$\frac{\Delta A}{\Delta T} \text{ in funzione di } T_{ave}$$

Dove:

ΔA sarebbe la variazione di assorbanza

ΔT sarebbe la variazione di temperatura

T (ave) sarebbe la media per ogni temperatura

Dal grafico riportato in figura 50 (sotto) il picco più alto di ogni curva rappresenta il punto nel quale c'è il cambiamento della pendenza nel nostro fit.

Liso Nat		Tau 50		Tau 400	
Tave (°C)	$\Delta A/\Delta T$	Tave (°C)	$\Delta A/\Delta T$	Tave (°C)	$\Delta A/\Delta T$
22,5	-0,06888	7,5	0,0661	10	0,10884
27,5	0,1387	12,5	0,06812	17,5	-0,15022
32,5	-0,02872	17,5	-0,15966	22,5	-0,11806
37,5	-0,01406	22,5	-0,01172	27,5	0,0948
42,5	-0,04984	27,5	-0,01098	32,5	0,01582
47,5	0,27428	32,5	0,13468	37,5	0,03366
52,5	0,06796	37,5	0,12052	42,5	0,12502
57,5	0,5651	42,5	-0,0502	47,5	-0,1141
62,5	0,61888	47,5	0,05608	52,5	0,07414
67,5	0,12568	52,5	0,0146	57,5	0,20442
72,5	0,13396	57,5	0,3853	62,5	0,41028
77,5	0,09282	62,5	0,69706	67,5	0,58842
82,5	-0,06614	67,5	0,26286	72,5	0,16884
87,5	-0,02362	72,5	0,22482	77,5	0,036788
		77,5	-0,05494	82,5	0,073794
		82,5	0,0724	87,5	-0,00912
		87,5	-0,03354		

Figura 49 Le tabelle mostrano per ogni temperatura media (T_{ave}) il corrispettivo rapporto tra la variazione di assorbanza (ΔA) a 223nm e la variazione di temperatura (ΔT). Rispettivamente per lisozima da solo, lisozima con tau 50 mM e lisozima con tau 400 mM.

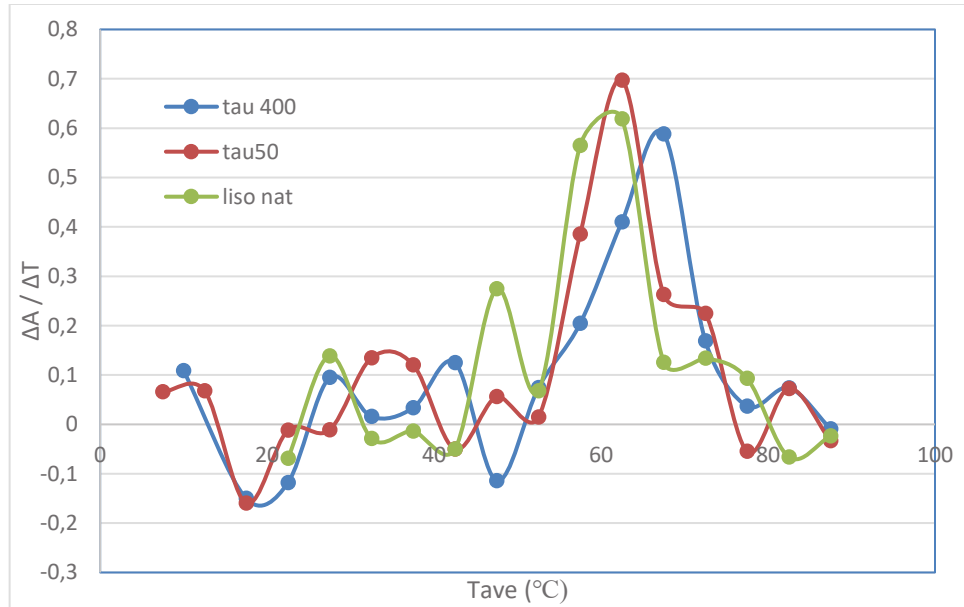


Figura 50 Dati plottati sul Excel: il punto di melting è rappresentato dai picchi più alti delle rispettive curve.

La concentrazione dell'osmolita è stata infine aumentata fino a 600mM.

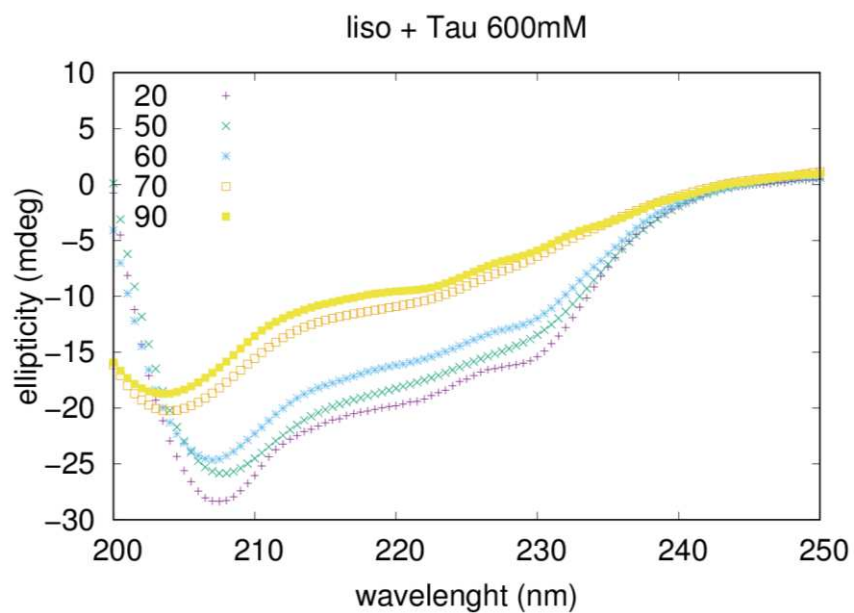


Figura 51 Spettro CD ottenuto in seguito al ciclo denaturante del lisozima in presenza di 600mM di taurina all'aumentare della temperatura.

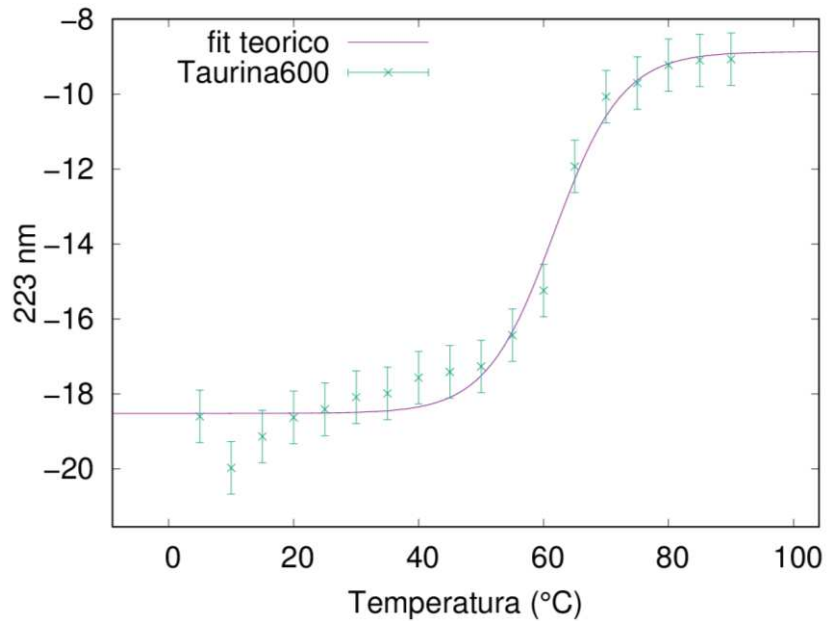


Figura 52: Segnale CD a 223 nm in funzione della temperatura per il lisozima con taurina a 600mM di concentrazione soggetto a ciclo di denaturazione. La curva rappresenta il fit teorico dei dati sperimentali.

Confrontando i fit a concentrazione 0mM, 400mM e 600mM di taurina, si nota che a 600mM l'effetto, seppur riscontrabile, risulterebbe essere meno efficace rispetto al campione a 400mM. La tabella 4 mostra chiaramente che la temperatura di melting del campione a 600mM è stimata intorno ~ ai 61.7 °C, leggermente superiore al campione senza taurina (60 °C), ma inferiore al campione con taurina a concentrazione 400mM (65.5 °C). Questo potrebbe indicare che a concentrazioni troppo elevate (superiori a 400mM) la taurina perda di efficacia.

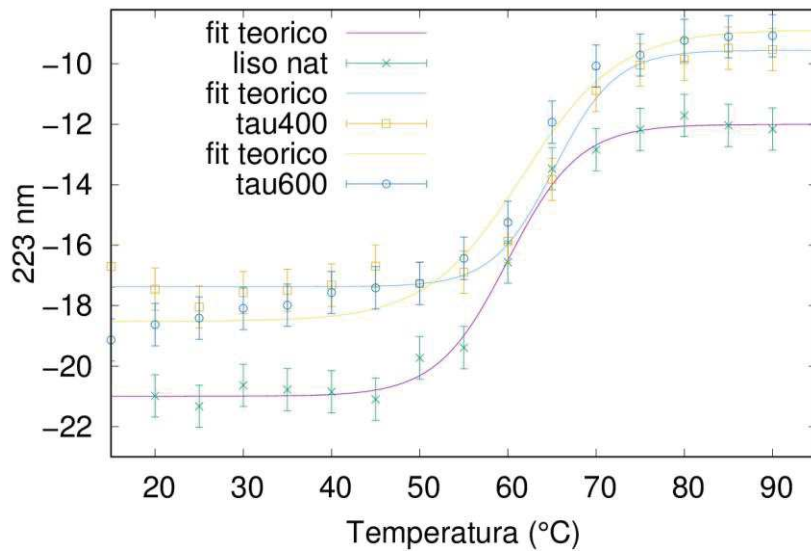


Figura 53: Confronto tra le curve fit a 0mM, 400mM, 600mM.

Dal calcolo delle curve di melting si può notare che a 400mM (in verde) il picco è più spostato, mentre a 600mM (in blu) c'è un effetto rispetto al nativo (in rosso), ma minore rispetto al campione a 400mM.

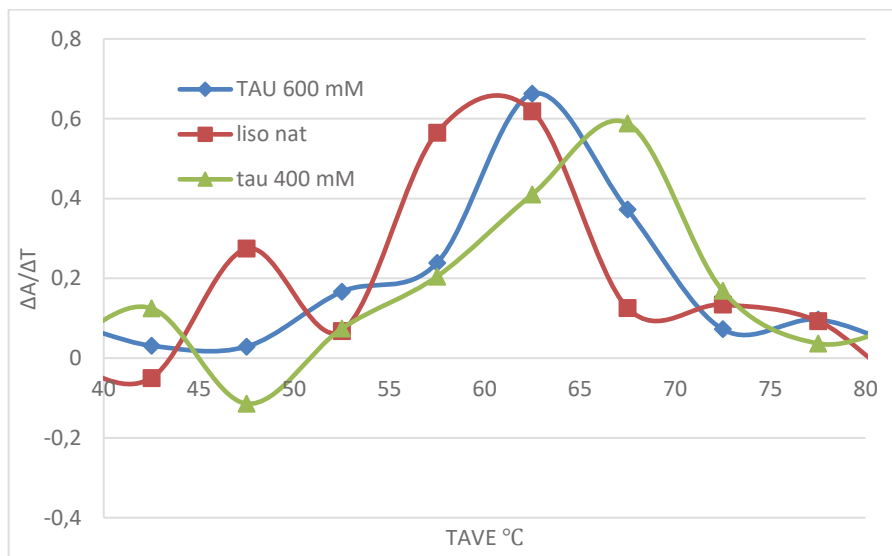


Figura 54: Grafico da Excel che mostra la finestra dai 40°C ai 80°C

Il campione misurato con 400mM di taurina sembra essere il più promettente e per questo è stato analizzato anche in presenza di forza ionica (NaCl) a 50 mM e 150 mM.

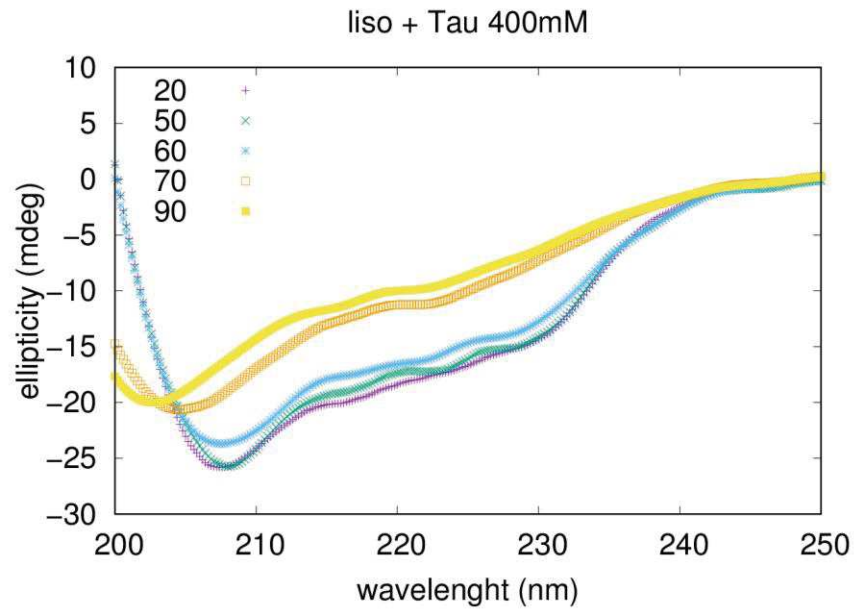


Figura 55 Spettro CD: lisozima con 400mM di taurina

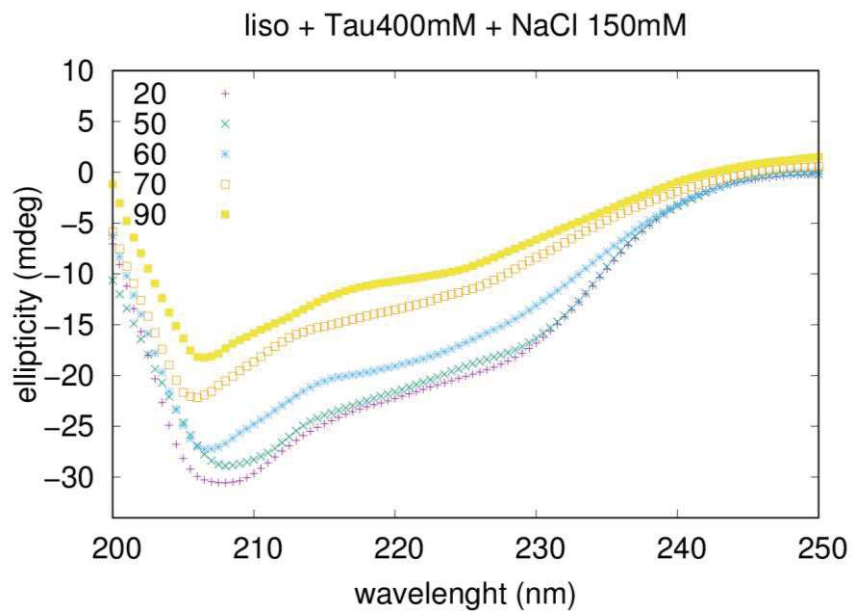


Figura 56 Spettro CD ottenuto in seguito al ciclo denaturante del lisozima in presenza di 400 mM di taurina e NaCl 150 mM all'aumentare della temperatura.

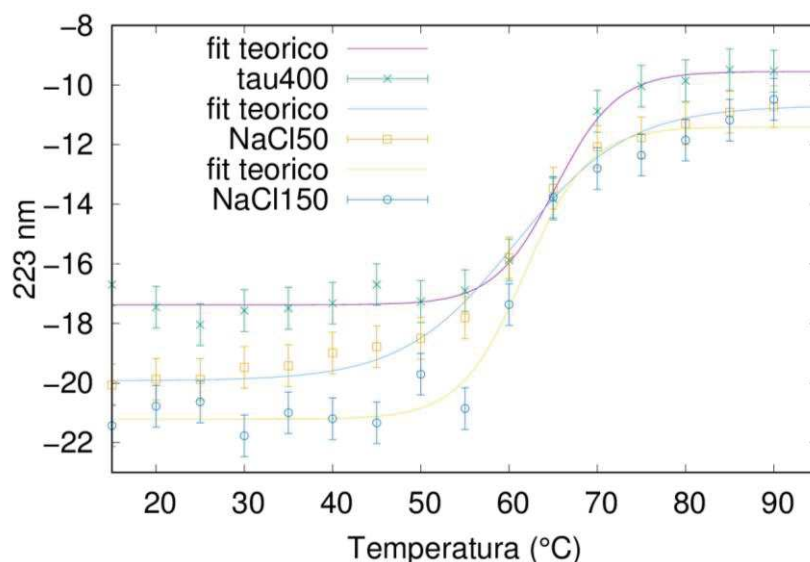


Figura 57 Confronto del segnale CD a 223 nm in funzione della temperatura per il lisozima a concentrazione di taurina 400 mM, per lisozima con 400 mM di taurina e 50 mM di NaCl e per lisozima con 400 mM di taurina e 150mM NaCl... Le curve rappresentano il fit teorico dei dati sperimentali

L'aggiunta di NaCl, come già sospettavamo da precedenti dati di letteratura, dovrebbe in qualche modo interferire con l'azione della taurina [23]. Infatti dai risultati dei fit riportati in tabella 2 si può notare come i valori della temperatura di melting in presenza di NaCl sia diminuiti. Rispettivamente 60.7 °C e 61.8°C rispettivamente per i campioni con NaCl a 50mM (Tau 400mM) e NaCl a 150mM (tau400mM). Il campione senza forza ionica con 400mM di taurina ha una temperatura di melting di 65.2 °C come già accennato in precedenza. La differenza si può notare anche dal grafico excel calcolando la temperatura di melting anche dal rapporto $\frac{\Delta A}{\Delta T}$ in funzione della media delle temperature (figura 18).

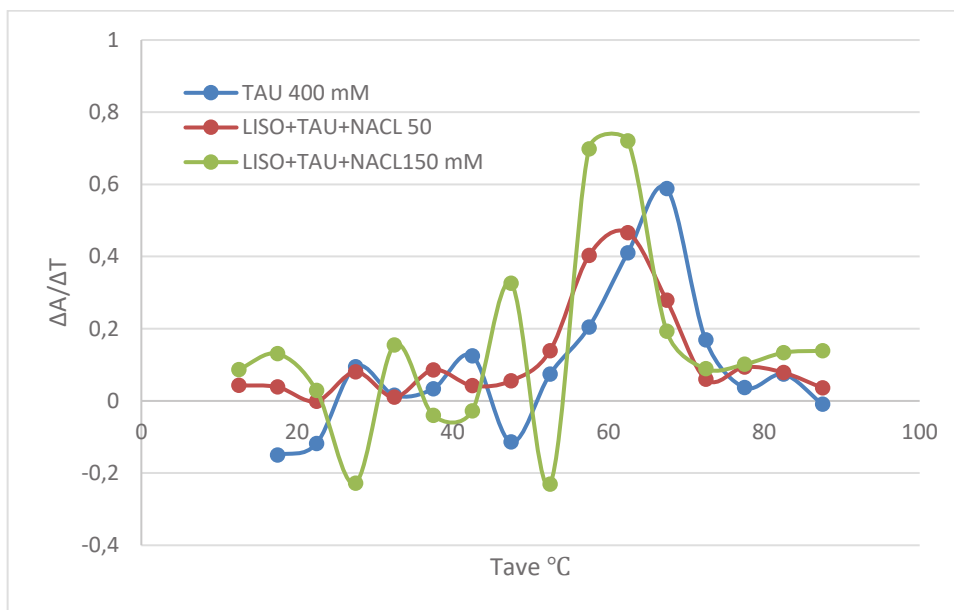


Figura 58 Grafico da Excel che mostra i picchi della temperatura di melting.

4.2 Analisi allo Spettrofotometro

Mediante la spettrofotometria di assorbimento sono state fatte delle misurazioni per studiare la cinetica di aggregazione della proteina modello (lisozima) al variare della concentrazione di Taurina. Le cinetiche effettuate per monitorare l'aggregazione sono state riassunte nella tabella che segue:

	[NaCl] (mM)	[Taurina] (mM)
Lisozima 3 mg/ml	5	0
	25	0
	50	0
	5	25
	5	50
	5	100
	25	25
	5	400

Tabella 5 Parametri applicati per lo studio dell'aggregazione in fibrille amiloidi

La cinetica del processo di formazione delle fibrille (fibre amiloidi) per il lisozima è stata monitorata tramite spettroscopia di assorbimento, utilizzando il Congo Red come sonda per la formazione dei foglietti β (β -sheet). Come già riportato nel capitolo 3 (Metodi), le cinetiche sono state condotte per 6 ore e le curve di assorbimento ottenute prelevando ogni 30 minuti delle aliquote dal volume di 50 μ l di proteina in fibrillazione a 65°C in agitazione mediante un magnete. Il campione da misurare è stato allestito in un'apposita cuvetta in quarzo per un volume totale di 500 μ l così distribuiti:

- 50 μ l di proteina fibrillata
- 350 μ l di buffer glicina (70 mM) basico a pH \sim 9.6
- 50 μ l di Congo Red

Per prima cosa è stato valutato il processo di fibrillazione in presenza di forza ionica crescente (NaCl). L'analisi dei dati è stata condotta valutando il rapporto tra l'intensità dei picchi di assorbimento a $\lambda=538$ nm e 505 nm come riportato nel capitolo 3 (metodi). I dati ottenuti in presenza di cloruro di sodio (NaCl) confermano le evidenze presenti in letteratura, ovvero all'aumentare della concentrazione di NaCl aumenta la velocità di aggregazione delle fibrille. Questo perché gli ioni agiscono da disidratante: sottraggono le molecole d'acqua che interagiscono con la superficie della proteina favorendo l'interazione proteina-proteina. Inoltre, i sali presenti in soluzione contribuiscono a schermare le cariche presenti sulla superficie della proteina, determinando una diminuzione delle interazioni repulsive fra proteine cariche con lo stesso segno.

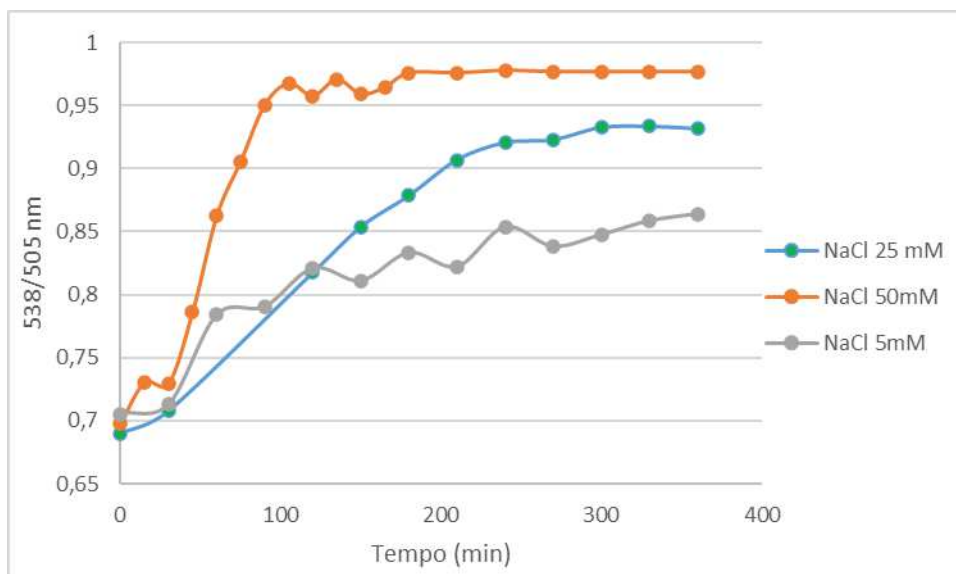


Figura 59 Rappresentazione grafica dell'analisi quantitativa tramite rapporto tra i picchi di assorbimento a λ 538 nm e a 505 nm.

È stata poi valutata la cinetica di fibrillazione del lisozima in presenza di taurina e NaCl a concentrazione costante di 5 mM, per poter monitorare più semplicemente gli effetti in un processo di aggregazione non molto rapido.

Per prima cosa è stato messo a confronto il rapporto dei picchi 538/505 del lisozima a concentrazione di taurina 0 mM e 25 mM. Si può vedere dal grafico in Figura 60 come a concentrazione di taurina 25 mM ci sia un piccolo effetto. In particolare, quando le curve raggiungono la fase di plateau a 25 mM di taurina la curva rimane più bassa, questo indica che si sono formati meno aggregati (β -sheet).

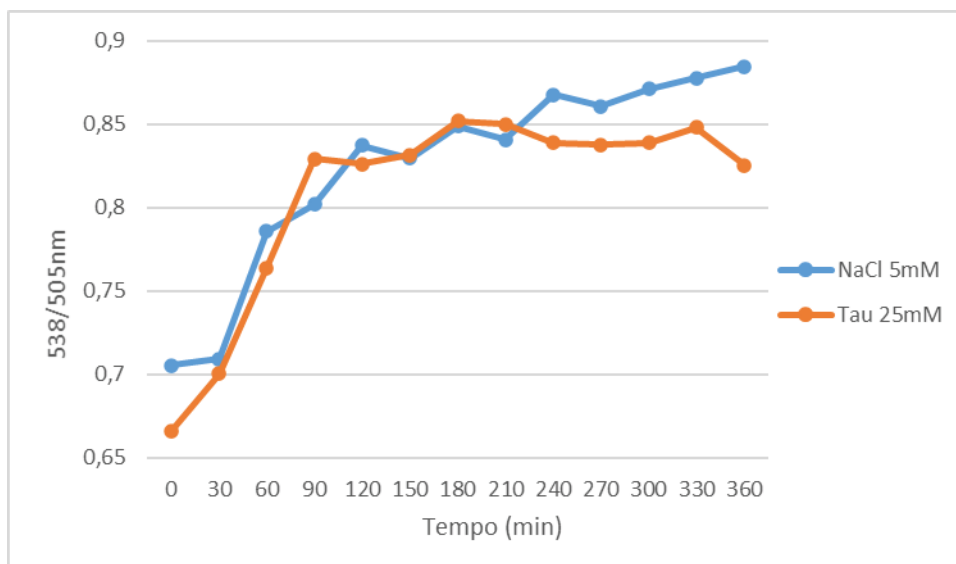


Figura 60 Analisi dei dati delle cinetiche: Rapporto 538/505 nm in funzione del tempo. Lisozima e NaCl 5mM (curva blu), Lisozima con NaCl 5mM e taurina 25mM (curva rossa).

È stata poi effettuata una cinetica di aggregazione su di un campione con taurina 25 mM con aggiunta di 25 mM di NaCl. I dati ricavati messi a confronto con quelli del campione con 25 mM di taurina e concentrazione più bassa di NaCl (5mM). Si nota dalle curve in figura 61 (sotto) che aumentando la forza ionica l'azione della taurina venga limitata come era stato già visto in precedenza con le analisi al Dicrografo. Per questo si è preferito proseguire alla concentrazione fissa di NaCl 5 mM per ogni campione.

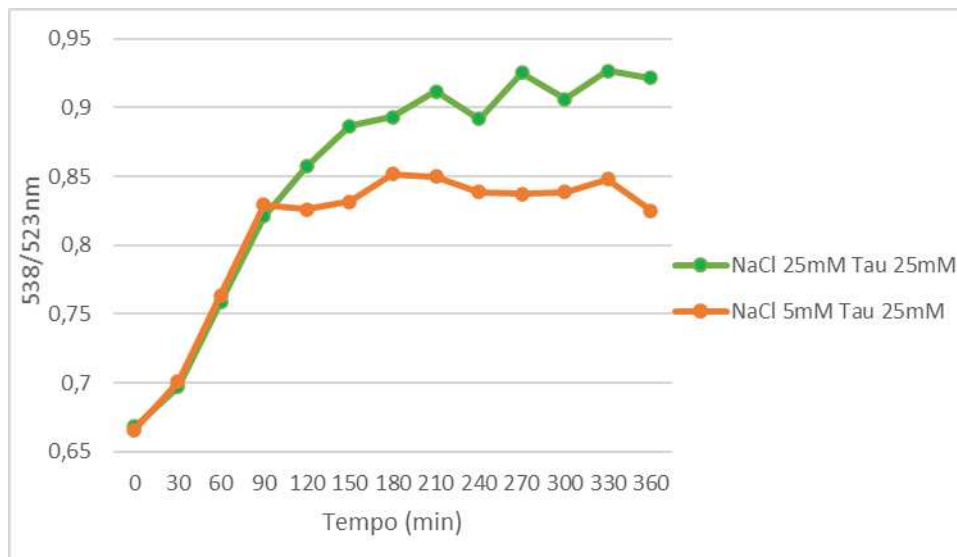


Figura 61 Analisi dei dati delle cinetiche: Rapporto 538/505 nm in funzione del tempo. Lisozima con NaCl 25 mM e taurina 25 mM (curva verde), Lisozima con NaCl 5 mM e taurina 25 mM (curva rossa).

Come per le analisi al Dicroismo circolare si è proseguito aumentando la concentrazione di taurina sino a 50 mM. Per i primi 210 minuti si assiste a un andamento abbastanza alternato delle 3 curve complice la difficile ripetibilità dell'esperimento. A 150 minuti la curva con taurina 50 mM tra le tre ha la quantità di strutture β più basso. Dopo 210 minuti sembra iniziare la fase di plateau che nel caso della taurina 50 mM è abbastanza simile al campione con taurina 25 mM. L'aumento della concentrazione di taurina non sembra modificare il suo effetto rispetto a quanto osservato con il campione a taurina 25 mM.

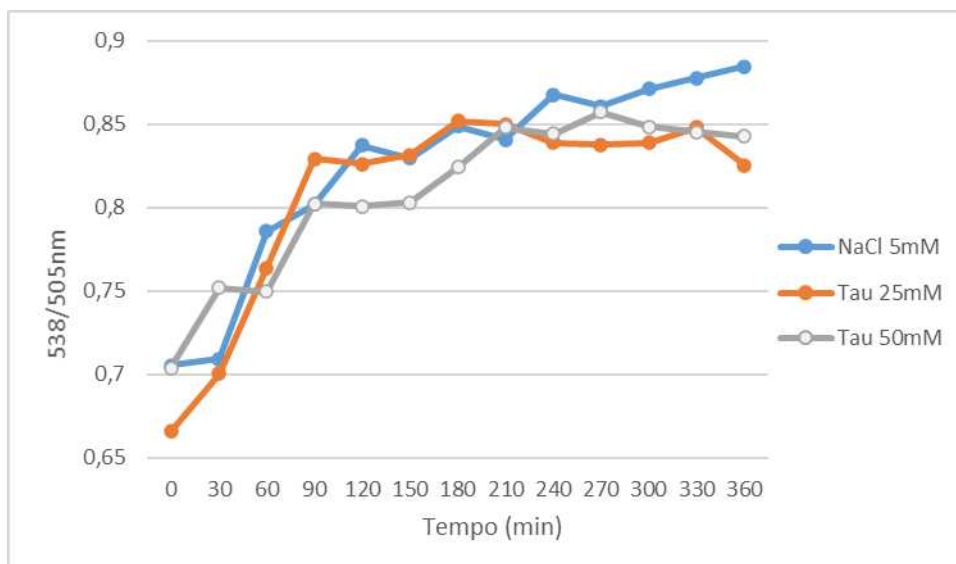


Figura 62 Analisi dei dati delle cinetiche: Rapporto 538/505 nm in funzione del tempo. Lisozima e NaCl 5mM (curva blu), Lisozima con NaCl 5mM e taurina 25mM (curva rossa), Lisozima con NaCl 5mM e taurina 50mM (curva grigia).

È stata poi condotta una cinetica su un campione preparato a concentrazione di 100 mM di taurina. Raddoppiando la concentrazione di taurina i risultati non si discostano da quelli con l'osmolita dimezzato. Questo ci fa capire che l'eventuale effetto rallentante della taurina sulla formazione delle fibrille non sia direttamente proporzionale all'aumento della sua concentrazione. È stata quindi aumentata la concentrazione di taurina fino a 400 mM per valutare un eventuale effetto più marcato ad alte concentrazioni. Confrontando gli spettri a concentrazione 0 mM di taurina e a concentrazione 400 mM di taurina si nota come in assenza di taurina le curve abbiano un maggiore spostamento verso lunghezze d'onda (λ) maggiori. Questo indicherebbe che il congo red sta interagendo con una maggiore quantità di aggregati formati.

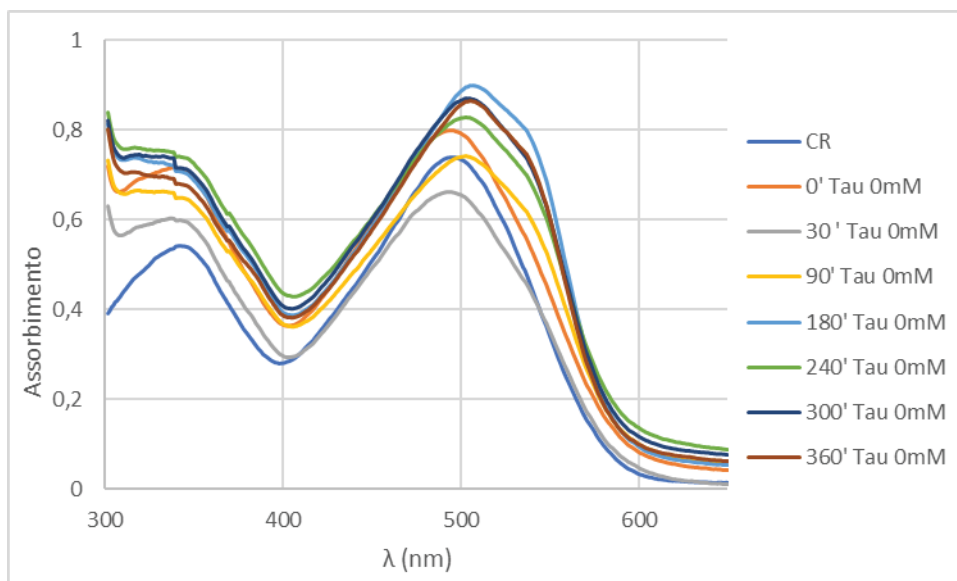


Figura 63 Curve di assorbimento ottenute per cinetica del lisozima a concentrazione 0mM di taurina e concentrazione di 5mM per NaCl.

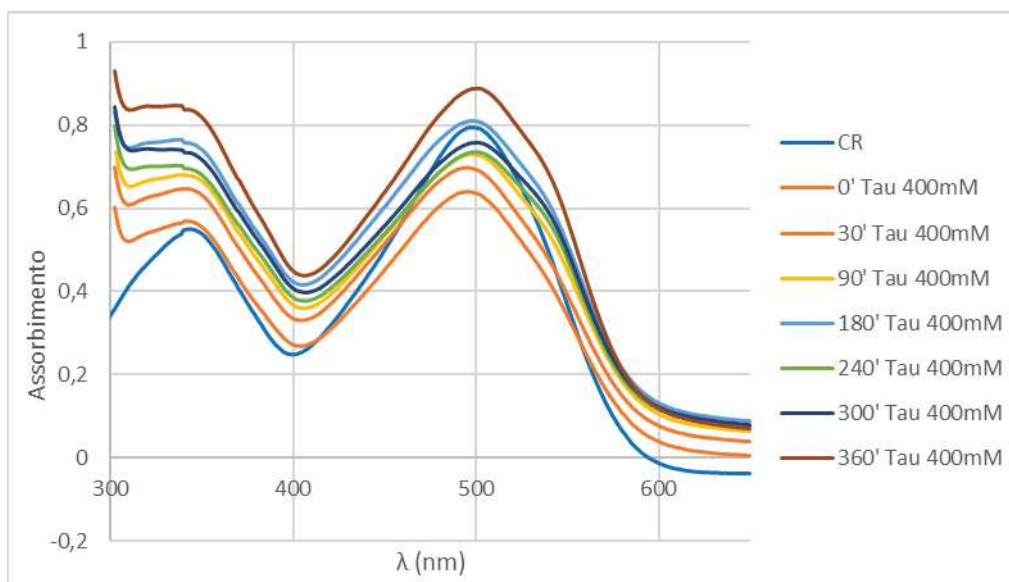


Figura 64 Curve di assorbimento ottenute per cinetica del lisozima a concentrazione 400mM di taurina e concentrazione di 5mM di NaCl.

Valutando il rapporto dei picchi a 538/505 nm il campione con taurina 400 mM mostra una importante diminuzione degli aggregati a fine cinetica (dopo 360 minuti) rispetto a lisozima con 0 mM di taurina, come viene mostrato in figura 65.

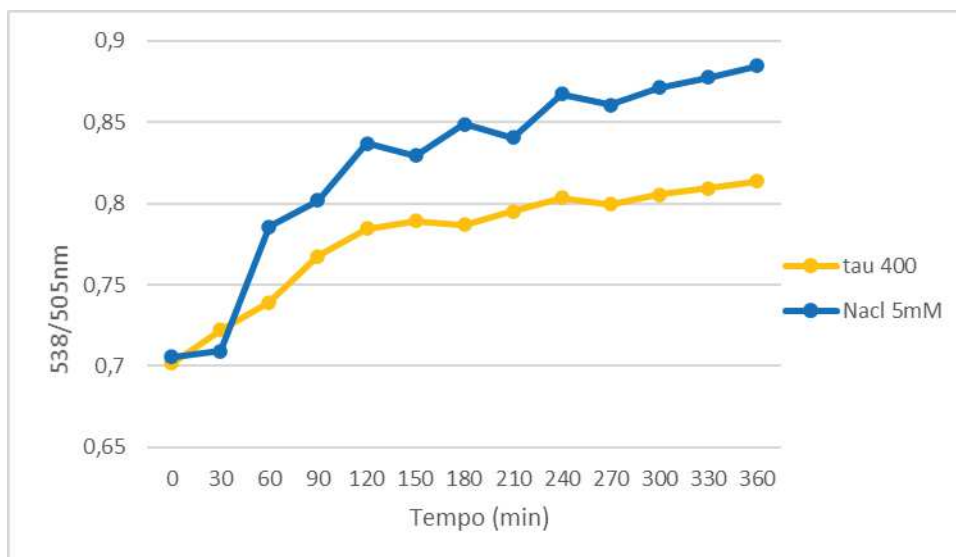


Figura 65 Analisi dei dati delle cinetiche: Rapporto 538/505 nm in funzione del tempo. Lisozima e NaCl 5 mM (curva blu), Lisozima con NaCl 5 mM e taurina 400 mM (curva gialla)

Confrontando i dati con concentrazione di taurina pari a 0 mM, 50 mM e 400 mM, si nota che a metà cinetica (180 minuti) il campione senza taurina (0mM) ha il rapporto 538/505 nm più alto, come ci aspettavamo. Questo rapporto scende a 50 mM e ancora di più a 400 mM di taurina. Dopo 180 minuti, la curva del campione con taurina 0 mM sale decisamente, mentre il campione con taurina 50 mM sale leggermente per poi stabilizzarsi verso un plateau che seppur non molto chiaro a fine cinetica (dopo 360 minuti), risulta essere più basso rispetto al campione con taurina 0 mM. A maggior ragione il campione con 400 mM ha il valore del rapporto 538/505 nm più basso dopo 360 minuti (figura 66).

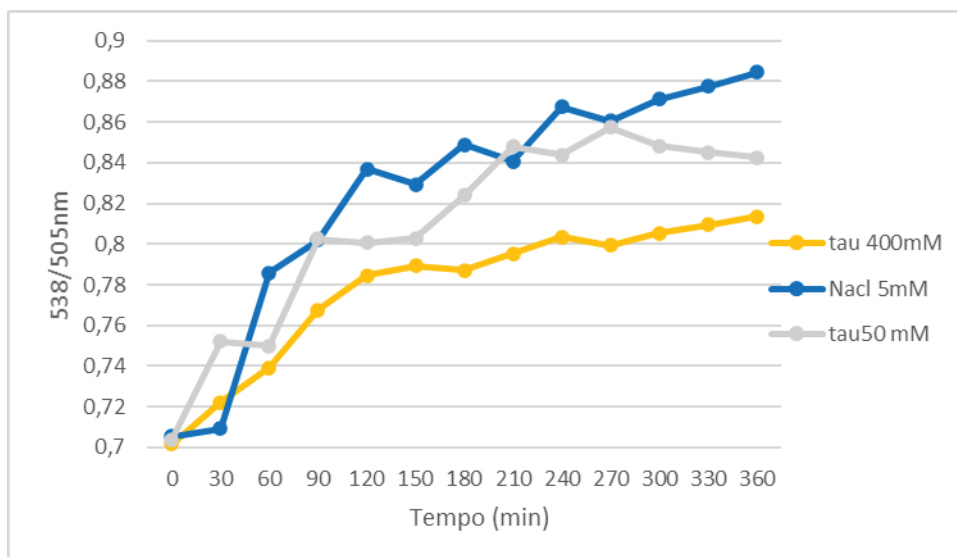


Figura 66 Analisi dei dati delle cinetiche: Rapporto 538/505 nm in funzione del tempo. Lisozima e NaCl 5mM (curva blu), Lisozima con NaCl 5mM e taurina 50mM (curva grigia), Lisozima con NaCl 5 mM e taurina 400mM (curva gialla).

In tabella vengono riportati i valori del rapporto fra i picchi di assorbimento a

$\frac{538}{505} nm$ ricavati dalle cinetiche di aggregazione.

	Dopo 180 minuti 538nm/505nm	Dopo 360 minuti 538nm/505nm
Tau 0mM	0.84	0.88
Tau 25mM	0.85	0.83
Tau 50mM	0.82	0.84
Tau 400mM	0.78	0.81

Tabella 6 valori del rapporto 538/505nm in funzione del tempo: A metà cinetica (180 minuti) e a fine cinetica (360 minuti)

4.3 Microscopia a Forza Atomica

Mediante la tecnica della microscopia a forza atomica siamo riusciti a determinare il profilo tridimensionale dei campioni, ovvero la loro morfologia.

È stato utilizzato il microscopio AFM-Raman (Horiba-Scientific) situato nei laboratori del Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente. I campioni analizzati sono quelli che hanno già subito il processo di 6 ore di fibrillazione e sono riportati nella seguente tabella:

	NaCl (mM)	Taurina (mM)
Lisozima 3 mg/ml	5	0
	5	25
	5	50
	5	100
	5	400

Tabella 7 Parametri inerenti la preparazione dei campioni analizzati al microscopio a forza atomica.

Per effettuare le analisi all’AFM sono stati diluiti i campioni con lo stesso buffer glicina (70mM) a pH acido (2.3). La proteina è stata portata alla concentrazione di 1.5 mg/ml.

Sono stati poi prelevati 15µl di ogni campione e posizionati su di un apposito portacampione coperto di mica in maniera omogenea. La mica su cui sono stati posti i campioni è di alluminio silicato e hanno struttura lamellare. I supporti invece sono dei dischi magnetici (diametro: 15mm, altezza: 3mm).

I campioni sono stati lasciati asciugare sul portacampione per 15 minuti, sono quindi stati soggetti a cicli di lavaggio con acqua milliQ per eliminare eventuali aggregati ed infine flussati con azoto.

Per prima cosa è stato visto il campione al tempo zero della cinetica (T_0). Come si può evincere dall'immagine seguente, prima che inizi il protocollo di fibrillazione non si hanno aggregati macroscopici, ma solo piccolissimi cluster dovuti alla deposizione del campione stesso.

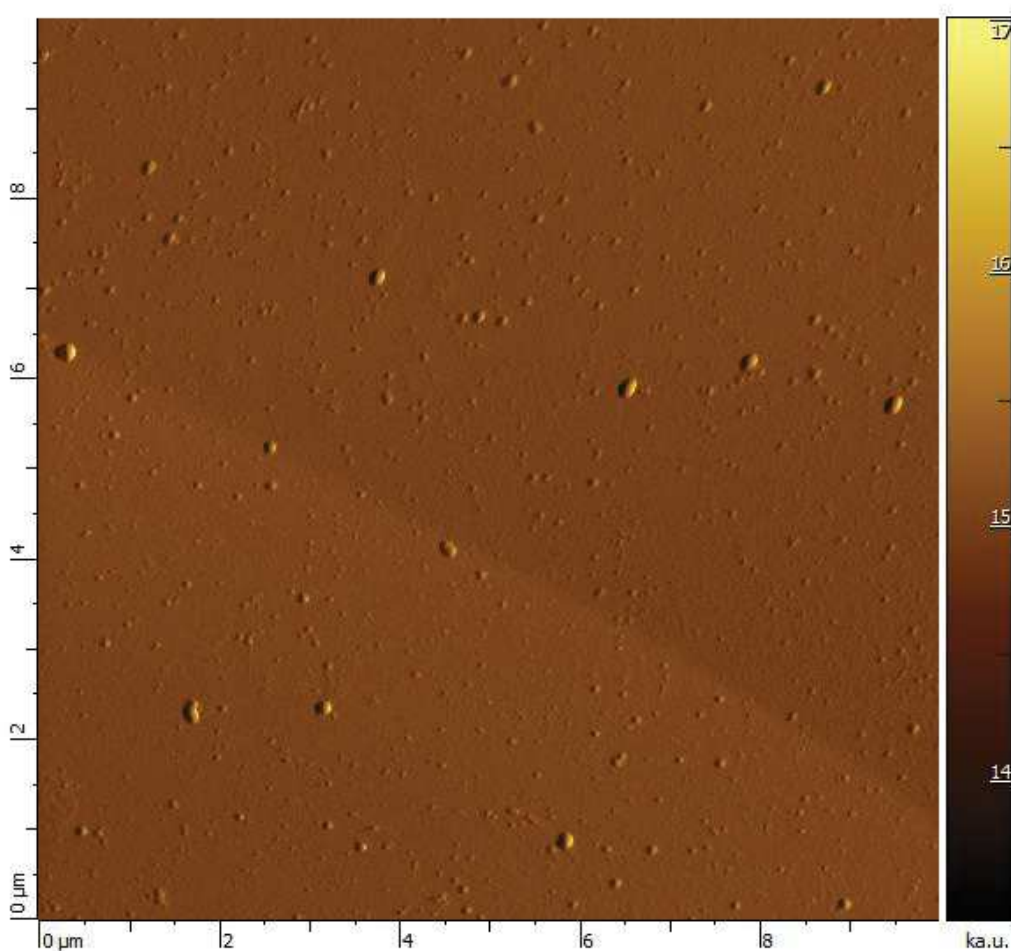
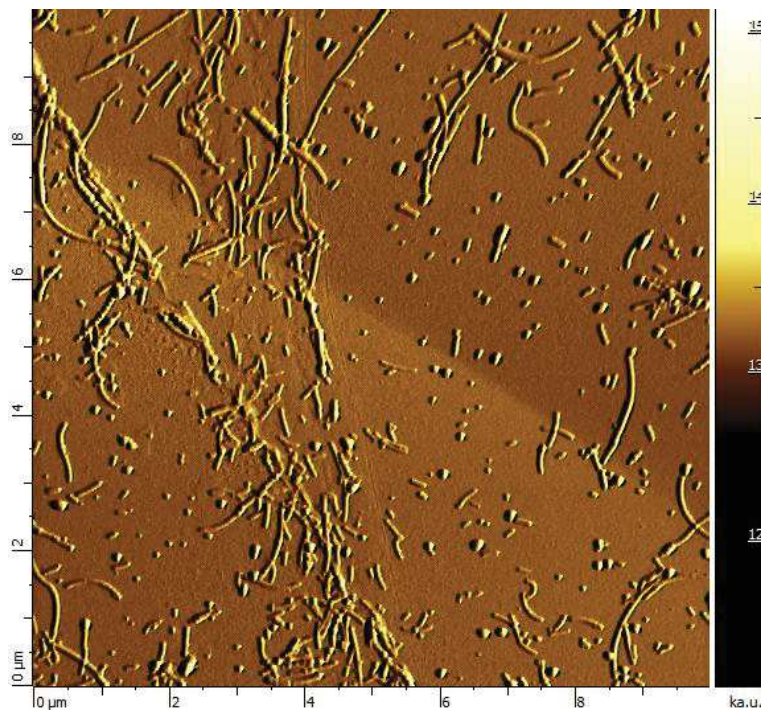


Figura 67 Immagine Inerente il campione con taurina a concentrazione 0 mM al tempo zero della fibrillazione (T_0).

Dopo 6 ore di fibrillazione le analisi con il microscopio a forza atomica mostrano la formazione di fibrille nella totalità dei campioni.

Il campione senza taurina (0mM) e NaCl (5mM) dopo 6 ore mostra molto chiaramente la formazione di fibrille come ci aspettavamo. Si possono notare anche dei corpi circolari dal diametro di circa $\sim 0.2\mu\text{m}$ (media approssimativa). Questi potrebbero essere identificati come oligomeri intermedi tossici che fungono da template per la formazione delle fibrille mature (corpi allungati) ben visibili dalle foto sottostanti.



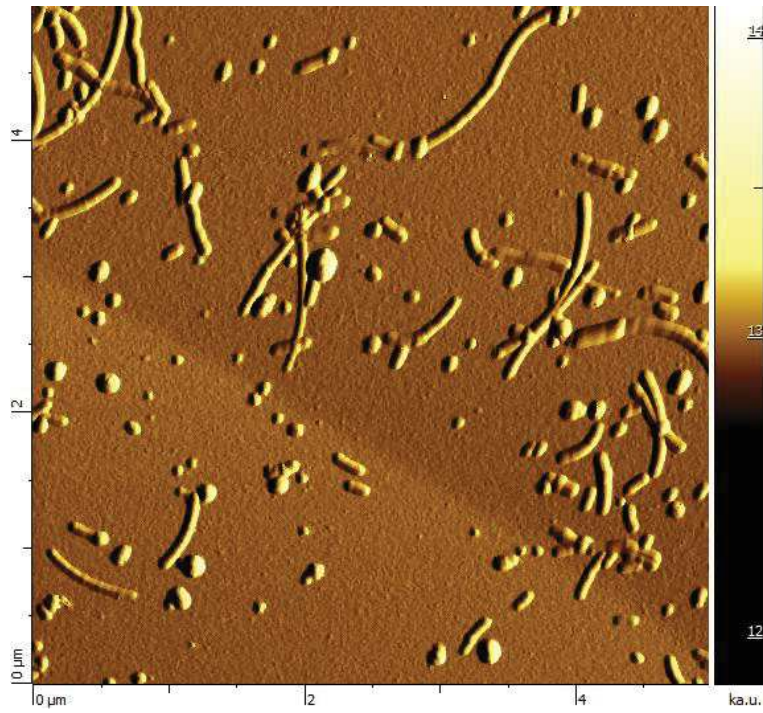
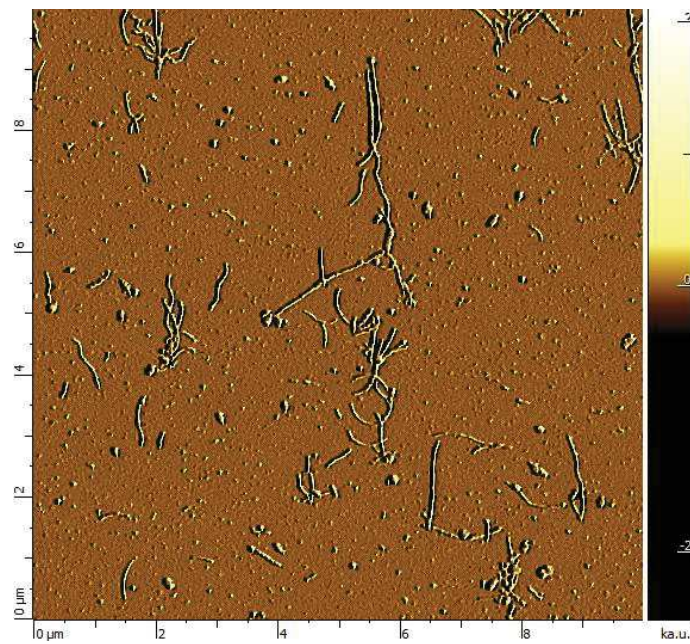


Figura 68 Immagini AFM. Campione senza taurina (0mM) dopo sei ore di fibrillazione.

Il campione con 25mM di taurina mostra chiaramente un minor numero di fibrille già a prima vista.



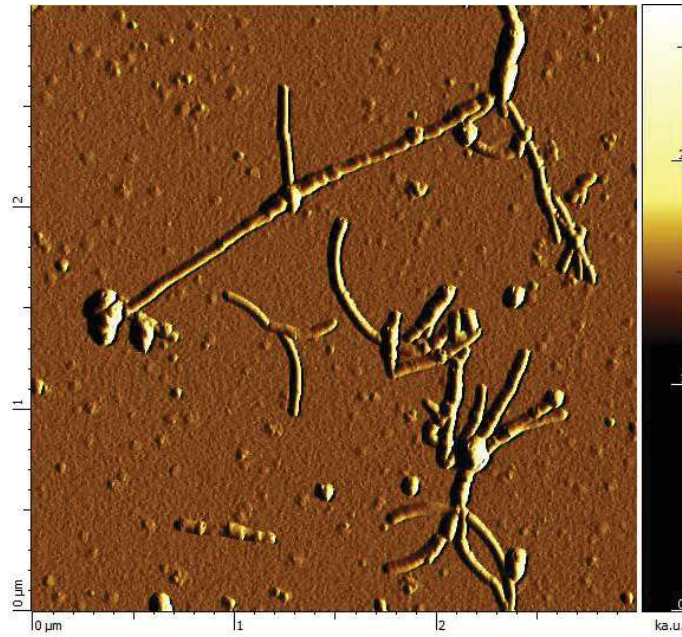
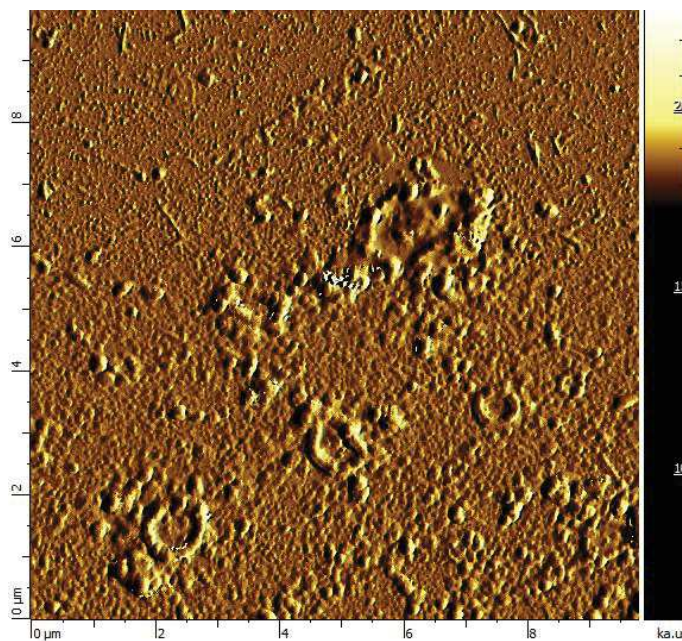


Figura 69 Immagini AFM. Campione con taurina a 25mM e NaCl a 5mM.

Sia nel campione senza taurina (figura 68) sia nel campione con taurina 25mM (figura 69) si notano delle strutture nodulari che rendono le fibrille ramificate.

Si è poi proceduto con il campione contenente lisozima con 100mM di taurina e 5mM di NaCl.



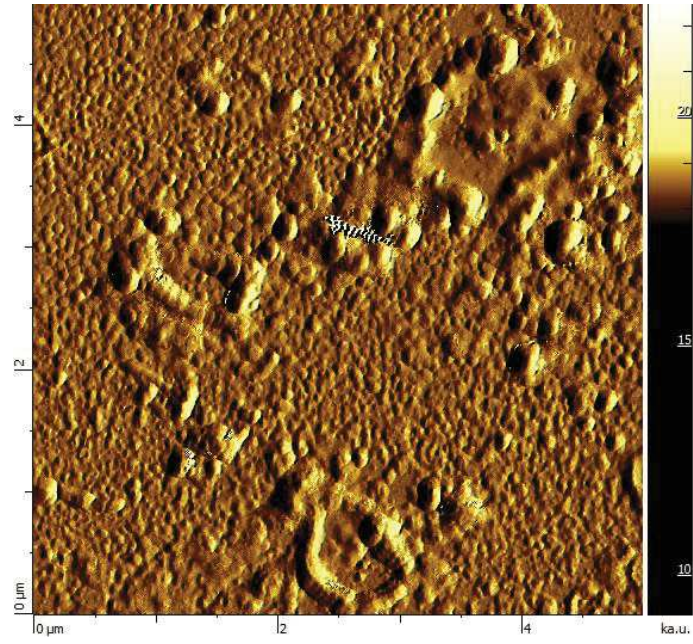
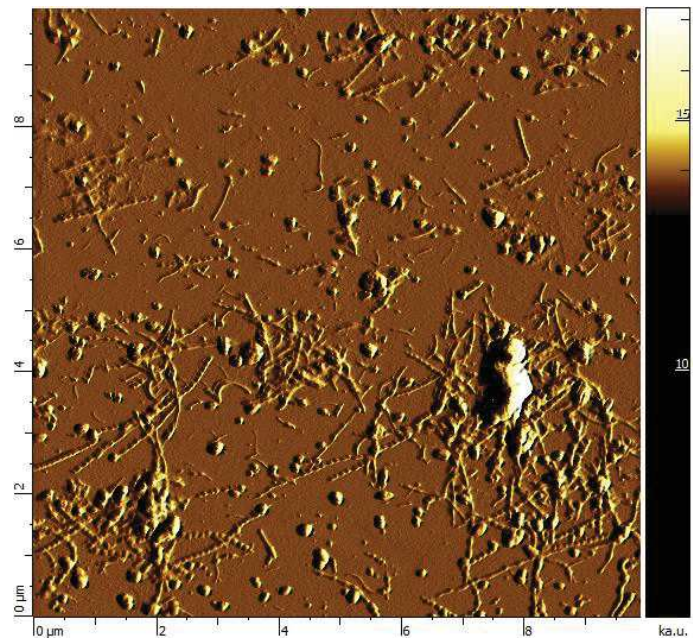


Figura 70 Immagini AFM: campione con taurina 100mM.

Il campione con tau 400mM invece:



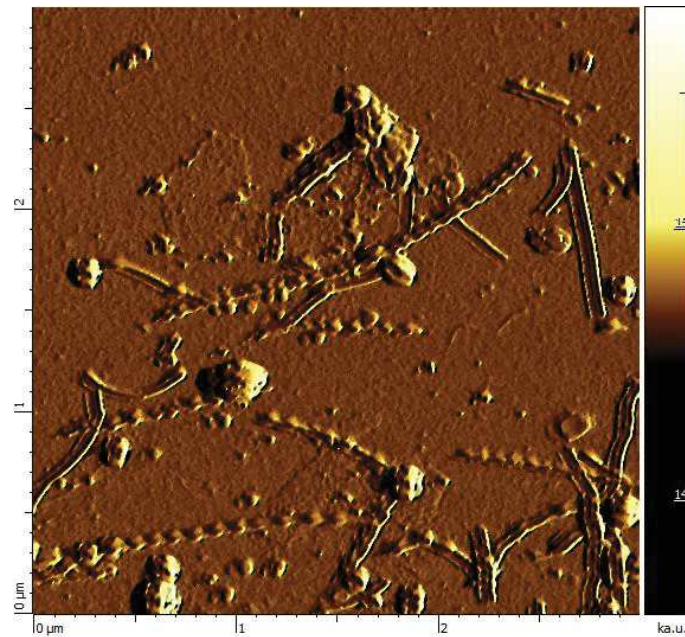


Figura 71 Immagine AFM: campione con taurina 400mM

Le foto sono state analizzate mediante “IMAGEJ”, un programma open-source che permette la rielaborazione delle immagini tridimensionali provenienti da tecniche come la microscopia a forza atomica, la microtomografia ed altro.

Grazie all'utilizzo di questo programma è stato possibile calcolare la larghezza delle fibrille e in generale degli aggregati evidenziati. I risultati sono stati riportati sotto forma di medie in tabella 8 per quanto riguarda i corpi circolari visibili in microscopia, molto probabilmente riconducibili agli oligomeri, intermedi dell'aggregazione oppure prodotti che non partecipano alla costituzione delle fibrille mature. In tabella 9 sono stati riportati lo spessore medio e le lunghezze medie delle fibrille nei vari campioni.

Il dato interessante riguarda gli oligomeri intermedi in assenza di taurina, che sono meno numerosi e con un diametro medio generale intorno ai $\sim 0.16 \mu\text{m}$. A concentrazione di taurina 25 mM la larghezza media sembrerebbe la stessa

aggirandosi intorno ai $\sim 0.14 \mu\text{m}$. A concentrazioni di taurina più alte, invece, il diametro medio degli aggregati intermedi aumenta. L'aumento potrebbe essere dovuto alle più alte concentrazioni di taurina che funge da collante e si interpone alla crescita degli oligomeri in fibrille mature. Sequestrando gli oligomeri intermedi si generano degli ammassi amorfi simil-circolari. Questo potrebbe essere in prospettiva un elemento interessante per la neutralizzazione dei corpi circolari intermedi che sono tossici. È stata anche trovata la densità dei corpi circolari nei corrispettivi campioni usufruendo dell'opzione "Counter Notice" del programma "IMAGEJ" per contarli. Il numero è stato poi diviso per l'area della foto che nel nostro caso era di $100 \mu\text{m}$.

Corpi circolari intermedi	Densità medie (numero/area)	Larghezza media μm
Tau 0 mM	0.9	0.16 ± 0.008
Tau 25 mM	0.19	0.14 ± 0.007
Tau 100 mM	0.46	0.25 ± 0.012
Tau 400 mM	0.57	0.35 ± 0.017

Tabella 8 Densità e larghezza dei corpi circolari dei corrispettivi campioni

Per quanto riguarda le fibrille, se si comparano i 4 campioni insieme si nota come in presenza di taurina le fibrille diminuiscano.

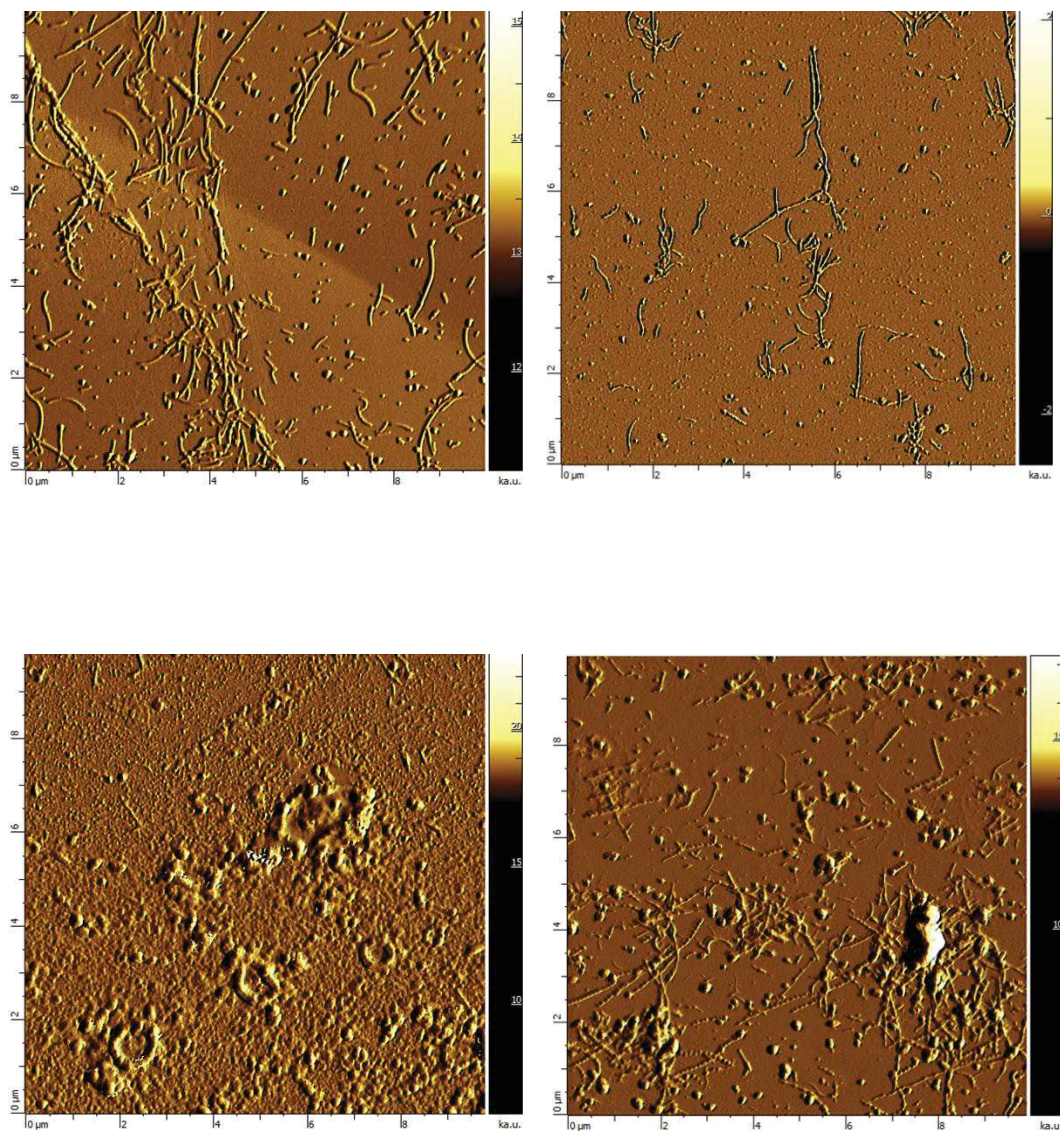


Figura 72 Immagini da AFM: Campione con taurina 0mM (figura A), Campione con taurina 25mM (figura B), Campione con taurina 100mM (figura C), Campione con taurina 400mM (figura D)

Anche per le fibrille è stata calcolata l'ampiezza e in questo caso anche la lunghezza. Se si osservano i valori riportati in tabella 9 si può evincere che all'aumentare della taurina la larghezza delle fibrille diminuisce. Nel campione senza taurina (Tau 0 mM) le fibrille sembrerebbero avere il diametro maggiore. Inoltre,

sembrerebbe diminuire anche la lunghezza. Il campione con 100 mM di taurina riporta un valore di zero per quanto riguarda le fibrille perché non sono evidenti ma al contrario compaiono ammassi circolari su cui andranno fatti ulteriori approfondimenti.

Fibrille	Densità	Lenght μm	Width μm
Tau 0mM	0.75	0.9 \pm 0.04	0.13 \pm 0.006
Tau 25mM	0.22	1.2 \pm 0.06	0.068 \pm 0.003
Tau 100mM	0	\sim 0	\sim 0
Tau 400mM	0.44	0.66 \pm 0.03	0.08 \pm 0.004

Tabella 9 Densità, Lunghezza (μm) e Larghezza (μm) per ogni campione calcolati mediante il programma "IMAGEJ"

Presi come riferimento i due estremi a taurina 0mM e a taurina 400mM. si è visto che nel campione a 0mM la lunghezza media delle fibrille è intorno gli 0.9 μm ed è possibile dividere la popolazione fibrillare in range di lunghezza: il 40 % delle fibrille è tra 1 e 2 μm di lunghezza, un altro 40 % circa tra 0.6 e 0.9 μm di lunghezza ed il restante 20% sotto gli 0.5 μm di lunghezza.

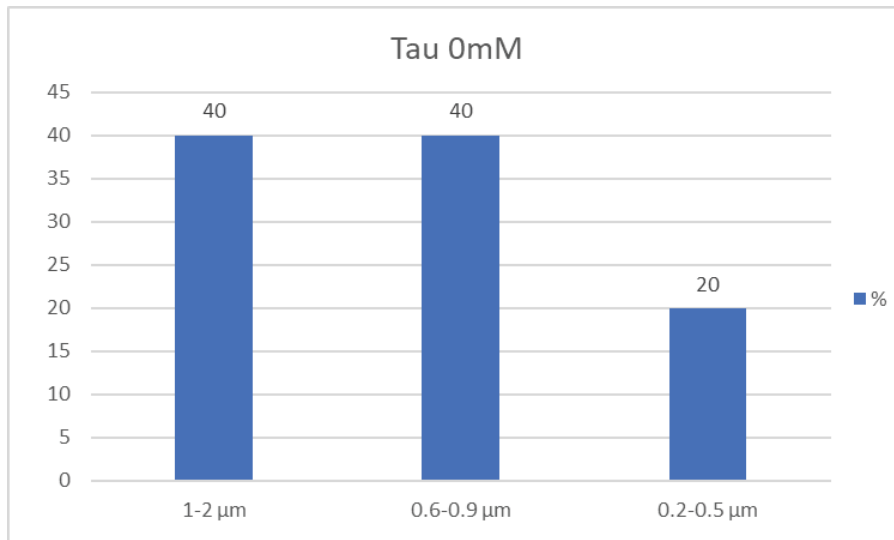


Figura 73 Campione senza taurina: istogramma che mette in correlazione la lunghezza delle fibrille con la distribuzione percentuale nella popolazione fibrillare del campione.

Per quanto riguarda il campione con taurina a 400mM la lunghezza media delle fibrille sembrerebbe essere ~ 0.6 μm come riportato in tabella. La popolazione fibrillare è così suddivisa: un 6% tra 1 e 2 μm di lunghezza, il 75% tra 0.6 e 0.9μm di lunghezza ed il restante 19% sotto gli 0.5 μm di lunghezza

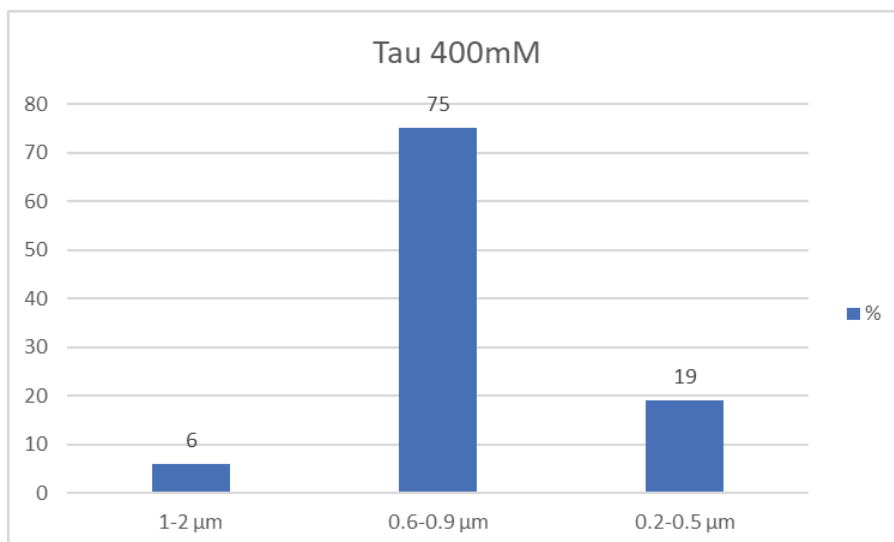


Figura 74 Campione con taurina 400 mM: Istogramma che mette in correlazione la lunghezza delle fibrille con la distribuzione percentuale nella popolazione fibrillare del campione.

In conclusione, l'analisi svolta al microscopio a forza atomica mostra un aumento delle dimensioni di ammassi circolari, all'aumentare della taurina. Parallelamente

viene evidenziata una diminuzione della lunghezza, della larghezza e della densità di fibrille all'aumentare dell'osmolita. L'ipotesi proposta sarebbe che la taurina interferisca con la crescita delle fibrille mature sottraendo le strutture intermedie, questo spiegherebbe le dimensioni ridotte delle fibrille riscontrate in particolare nel campione a 400mM di taurina e la formazione di ammassi/aggregati amorfi nel campione con taurina 100mM e taurina 400Mm.

APPENDICE

4.4 Small Angle X-RAY Scattering (SAXS)

Come parte complementare a questa tesi focalizzata sull'effetto della taurina, si è voluto analizzare, ai raggi X, la stabilità termica del lisozima in presenza di 4 nuovi zuccheri: EC101, EC212, EC311, EC202, EC312 (già descritti nel capitolo 2) in corso di brevetto a scopo farmacologico.

L'esperimento è stato svolto usufruendo della luce del sincrotrone di Trieste come descritto nel capitolo 3. Il lisozima è stato sciolto in un buffer con acido fosforico all'85 %. Sono state analizzate le seguenti condizioni:

- Lisozima 2 g/l a pH 3
- Lisozima 2 g/l a pH 5
- Lisozima 10g/l a pH 3
- Lisozima 10 g/l a pH 5

Per ognuna delle condizioni sono stati analizzati i seguenti zuccheri alle seguenti concentrazioni molari (M)

EC312	0 M	0.05 M	0.10 M	0.25 M
EC101	0 M	0.05 M	0.10 M	0.25 M
EC311	0 M	0.05 M	0.10 M	0.25 M
EC202	0 M	0.05 M	0.10 M	0.25 M
EC212	0 M	0.05 M	0.10 M	0.25 M

Tabella 10 Concentrazioni dei vari zuccheri applicate all' esperimento del ciclo denaturante di lisozima al SAXS

I dati ricavati dall'analisi SAXS sono stati poi rielaborati mediante il programma “gnuplot” per ricavarne informazioni strutturali del campione analizzato. Il primo step per l'analisi è stato definire il segnale attribuibile esclusivamente alle particelle in soluzione, eliminando il contributo del solvente. Le curve mostrano l'intensità di scattering in funzione del vettore di scattering, che dipende dall'angolo di scattering e dalla lunghezza d'onda della radiazione usata. Di seguito sono riportate le curve dei campioni di lisozima a 2g/l e 10g/l in assenza di zuccheri a pH 3 e pH 5 dopo ciclo di denaturazione all'aumentare della temperatura.

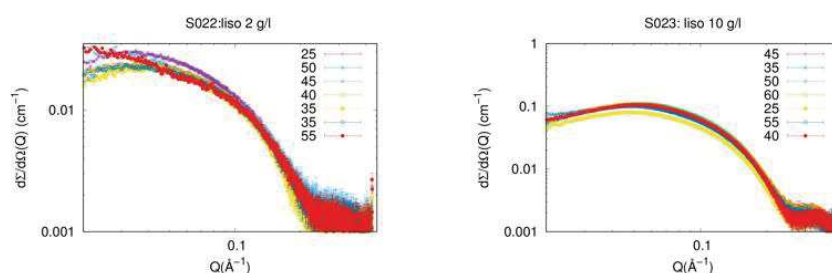


Figura 75 Curve SAXS di lisozima nativo a pH 3 rispettivamente alla concentrazione di 2 g/l e 10 g/l

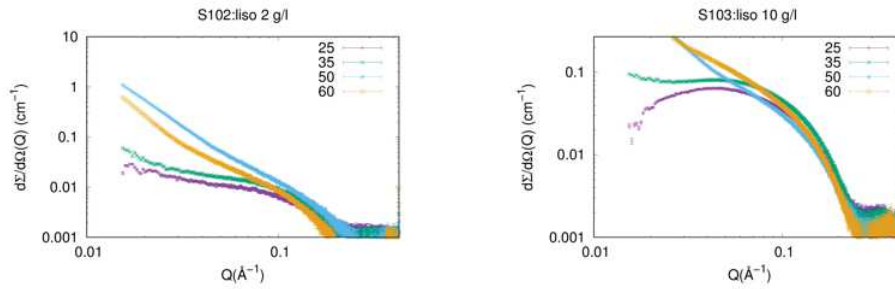


Figura 76 Curve SAXS di lisozima nativo a pH 5 rispettivamente alla concentrazione di 2 g/l e 10 g/l

Per ogni campione sono stati fatti i plot di Kratky. Come già detto nel capitolo 3 (Metodi) il plot di Kratky è un metodo qualitativo di analisi dei dati SAXS importante per la caratterizzazione della struttura della proteina in esame. È la rappresentazione dell'intensità di scattering moltiplicata per il vettore di scattering Q elevato al quadrato in funzione di Q . Possiamo vedere in questo modo se la struttura proteica è rimasta compatta, denaturata o parzialmente denaturata (caratteristica degli stadi intermedi di folding).

I grafici di Kratky sono riportati sempre mediante l'utilizzo del software "Gnuplot".

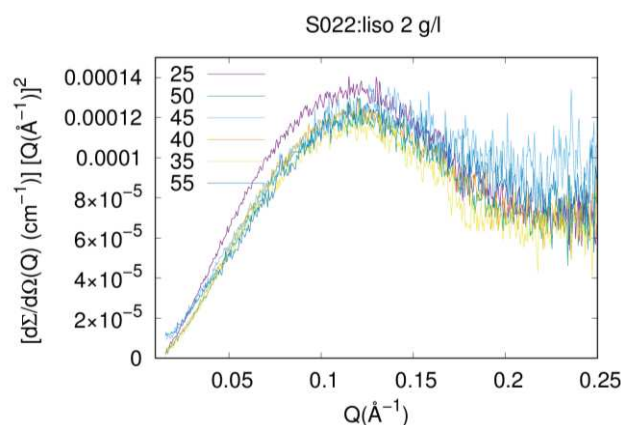


Figura 77 Kratky plot di curve SAXS lisozima nativo a 2 g/l pH 3

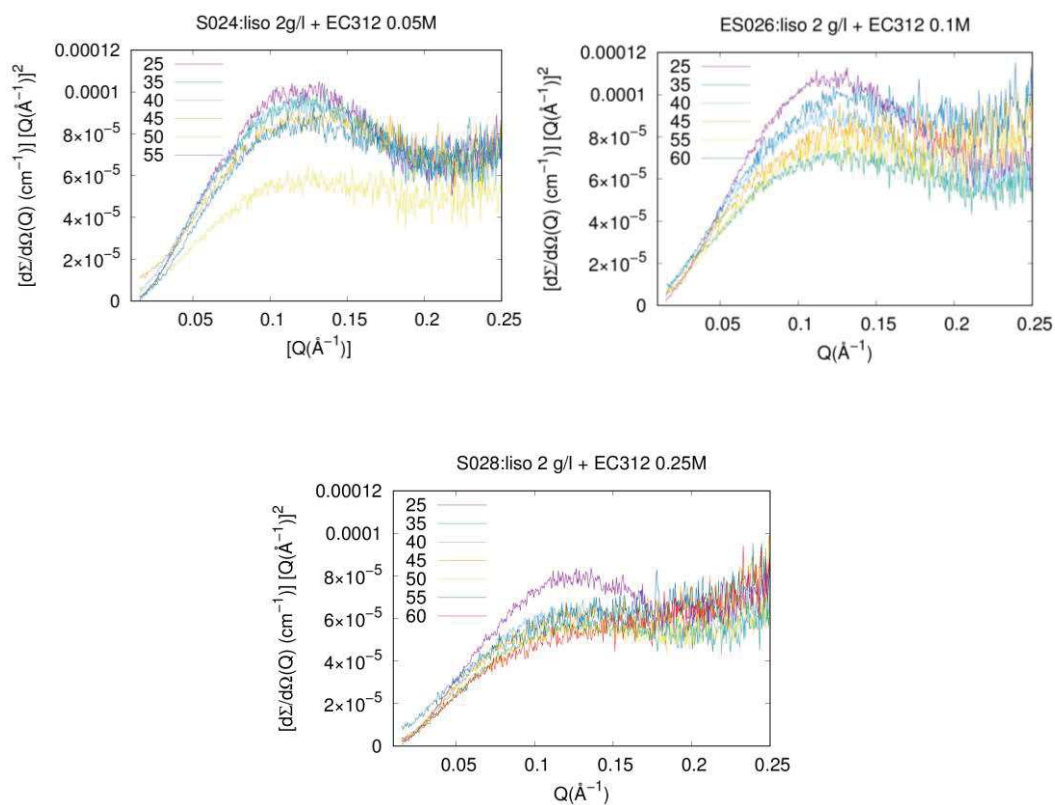


Figura 78 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 3 con lo zucchero EC312 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M

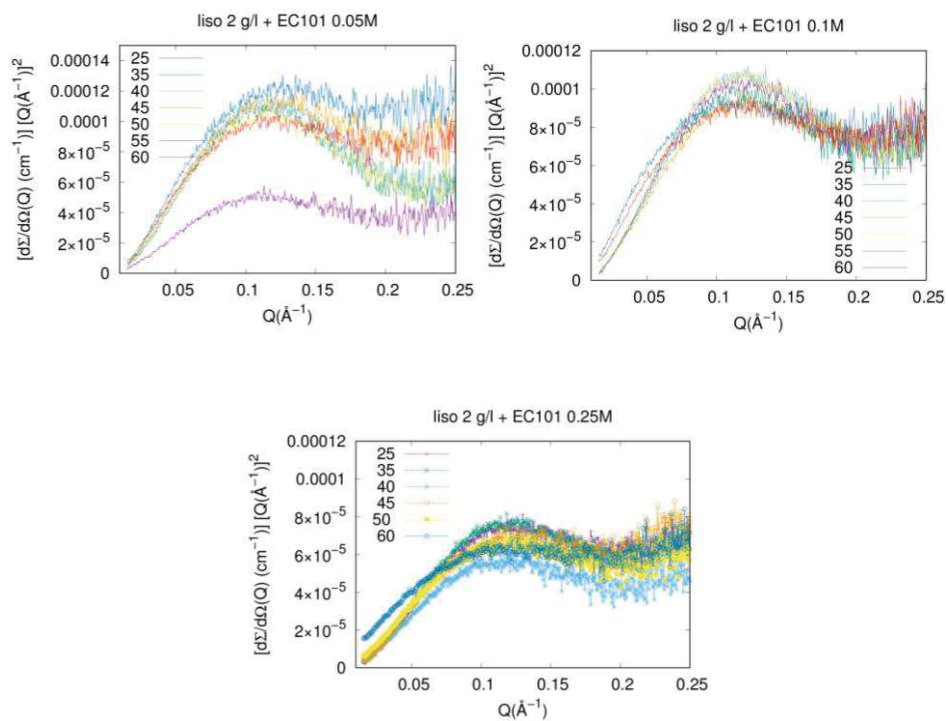


Figura 79 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 3 con lo zucchero EC101 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M

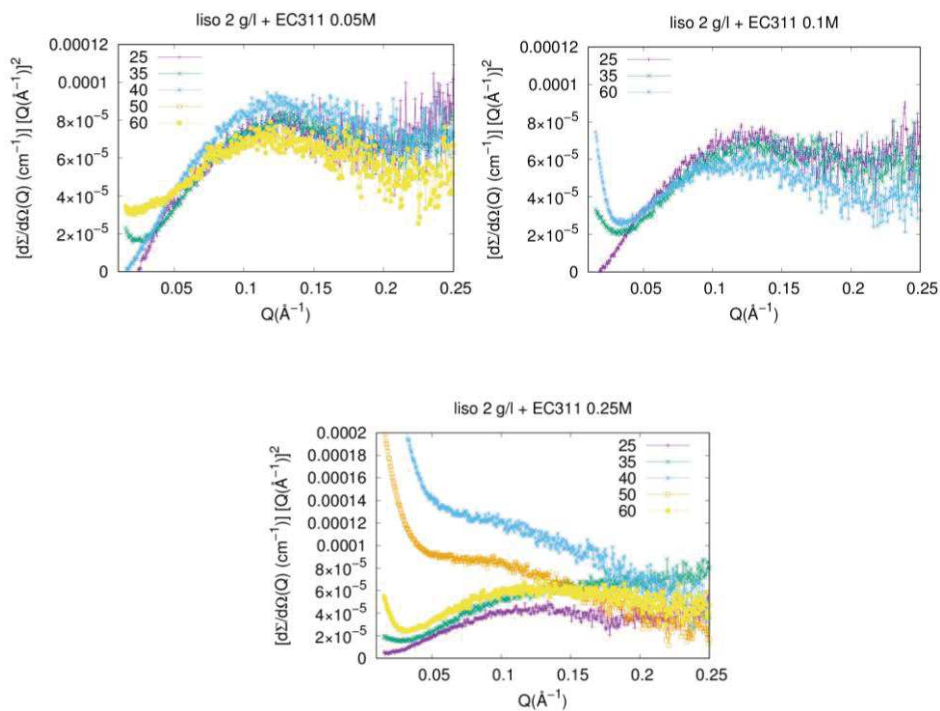


Figura 80 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 3 con lo zucchero EC311 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M

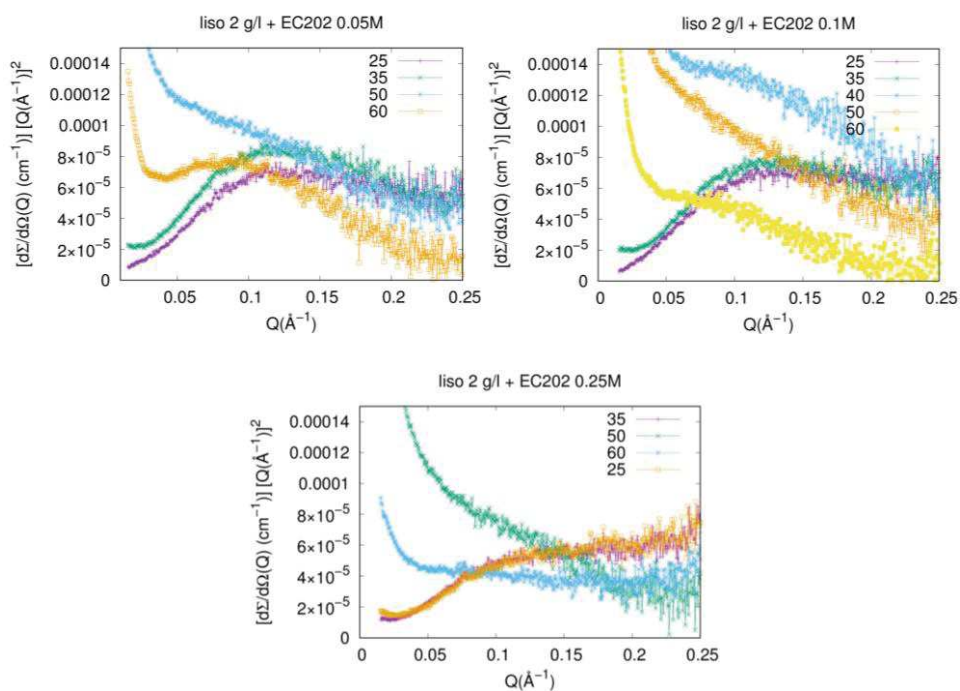


Figura 81 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 3 con lo zucchero EC202 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M

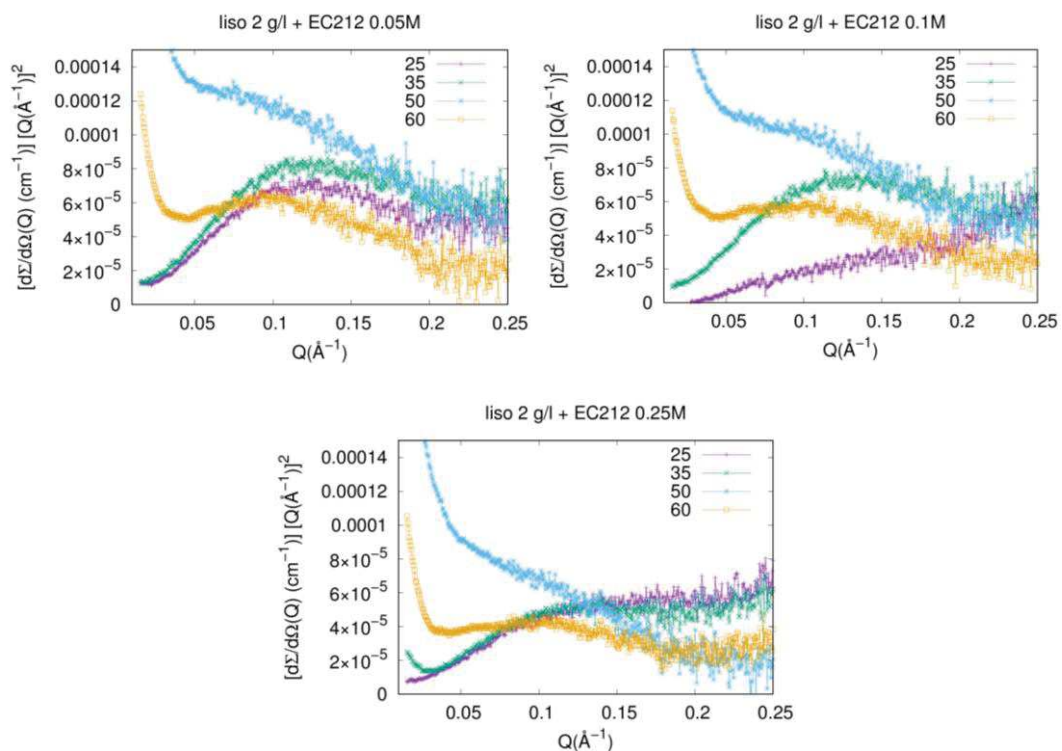


Figura 82 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 3 con lo zucchero EC212 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M

Kratky plot per lisozima alla concentrazione di 2 g/l a pH 5:

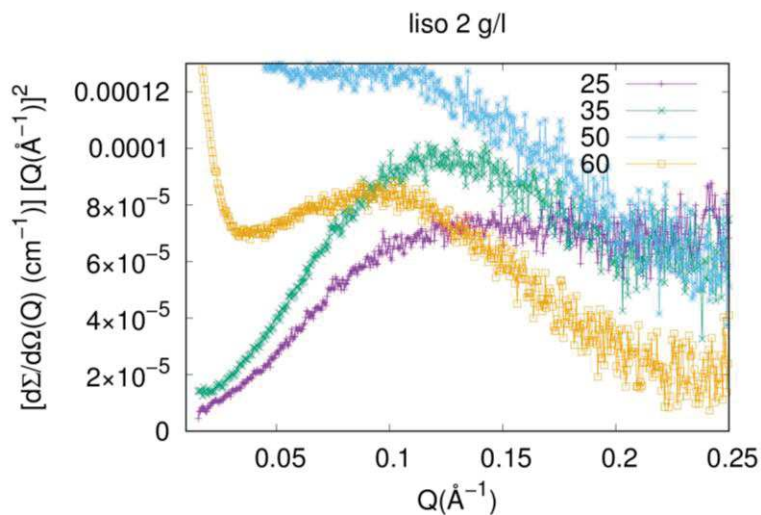


Figura 83 Kratky plot di curve SAXS lisozima nativo a 2 g/l pH 5

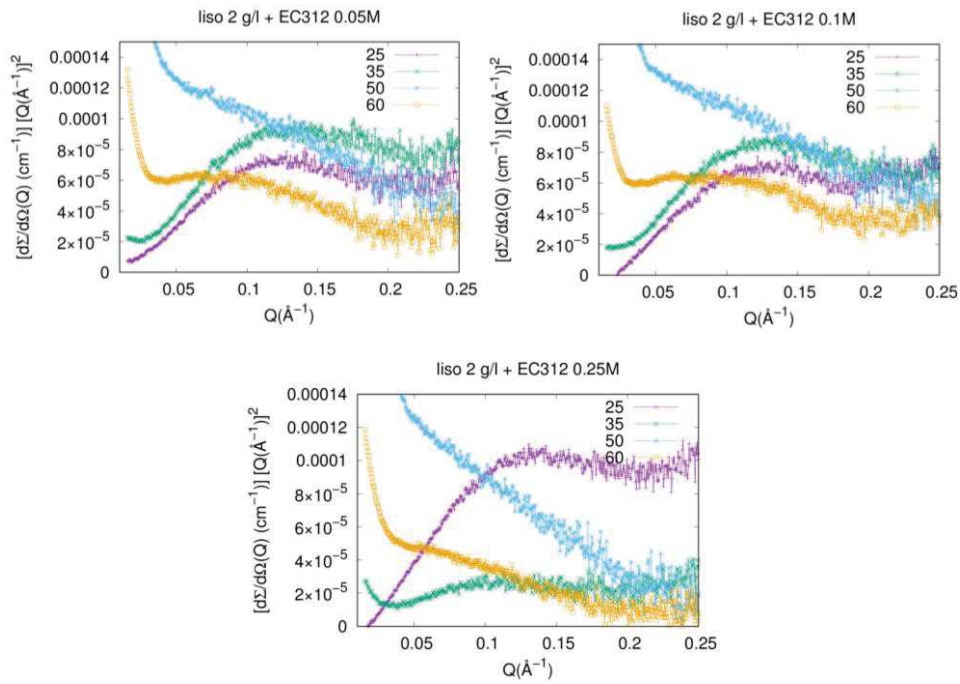


Figura 84 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 5 con lo zucchero EC312 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M

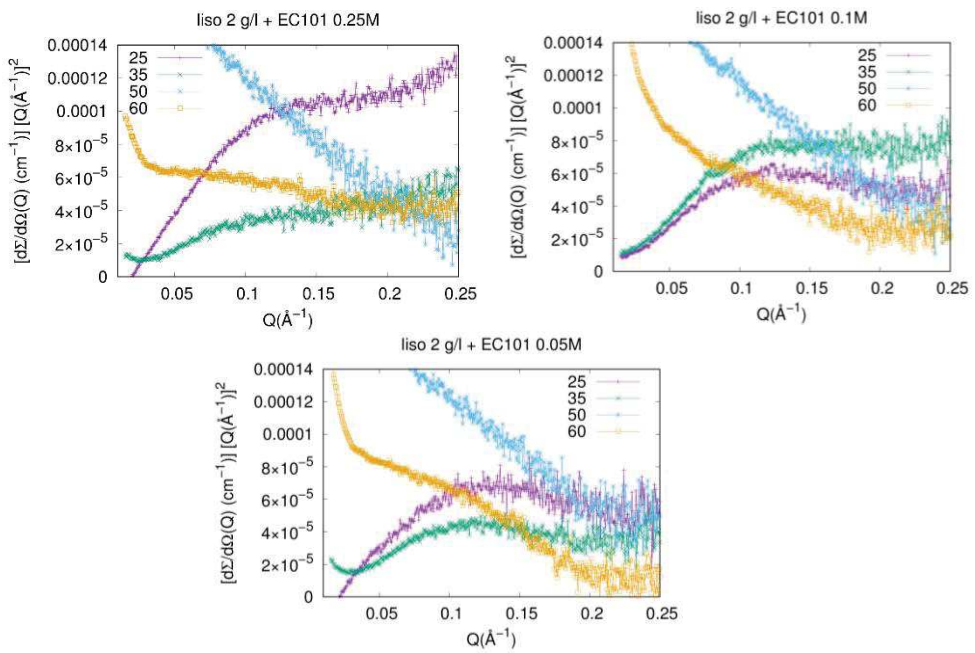


Figura 85 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 5 con lo zucchero EC101 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25

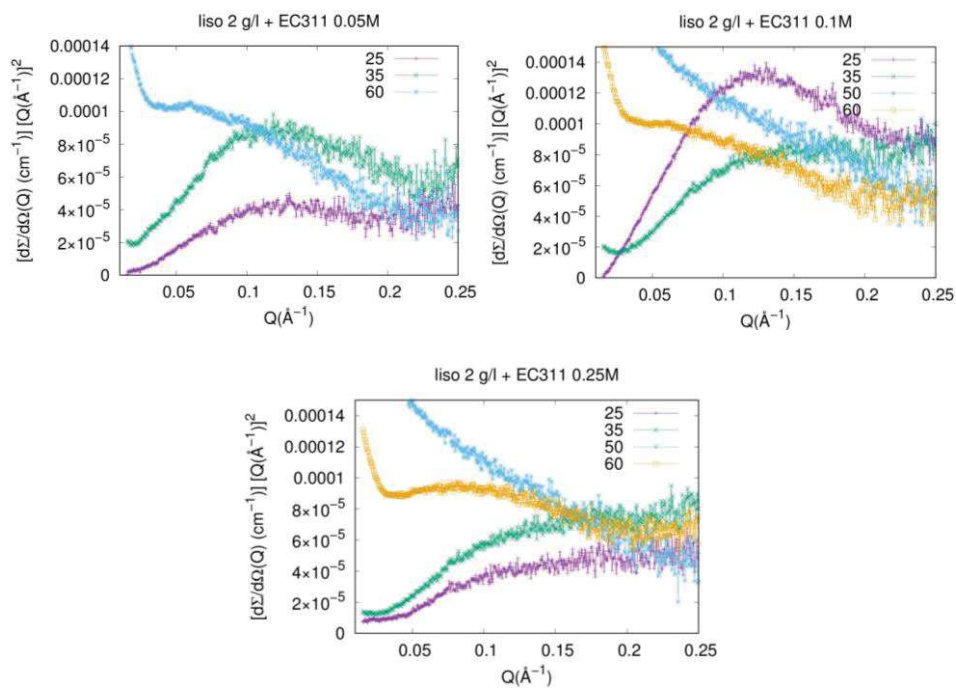


Figura 86 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 5 con lo zucchero EC311 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M

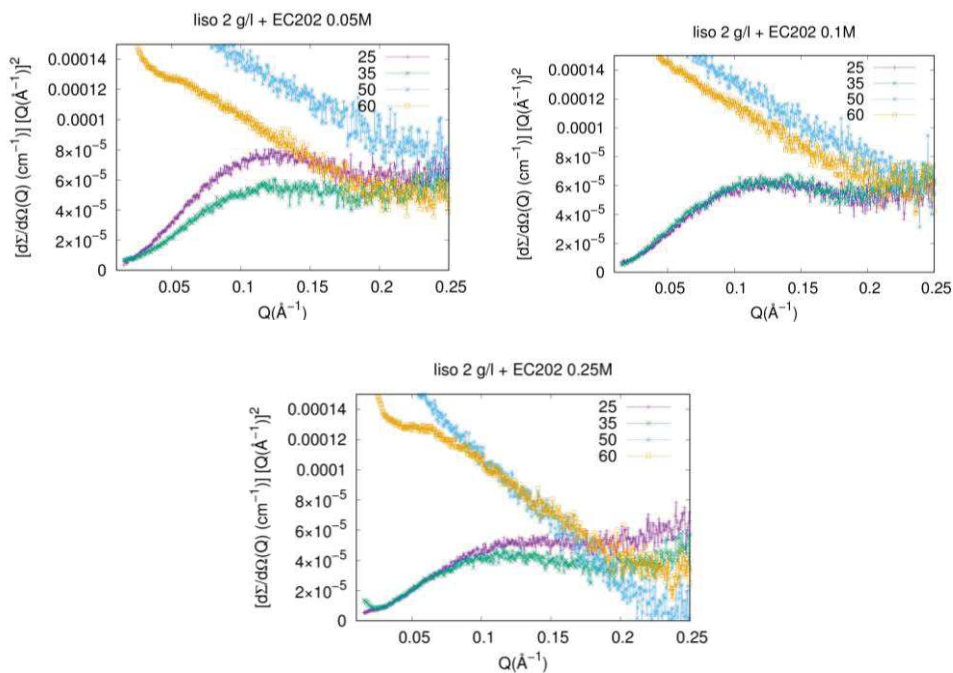


Figura 87 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 5 con lo zucchero EC202 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

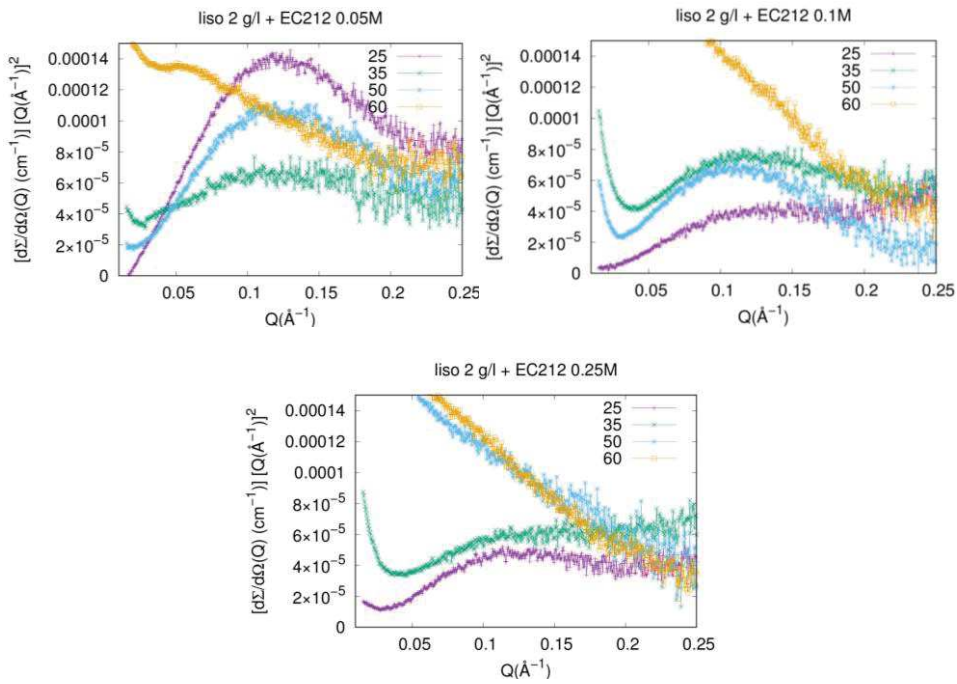


Figura 88 Kratky plot lisozima 2g/l a pH 5 con lo zucchero EC212 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

I plot di Kratky sono stati fatti anche per i campioni a concentrazione di 10 g/l sia a pH 3 sia a pH 5.

Kratky plot lisozima concentrazione 10 g/l a pH 3:

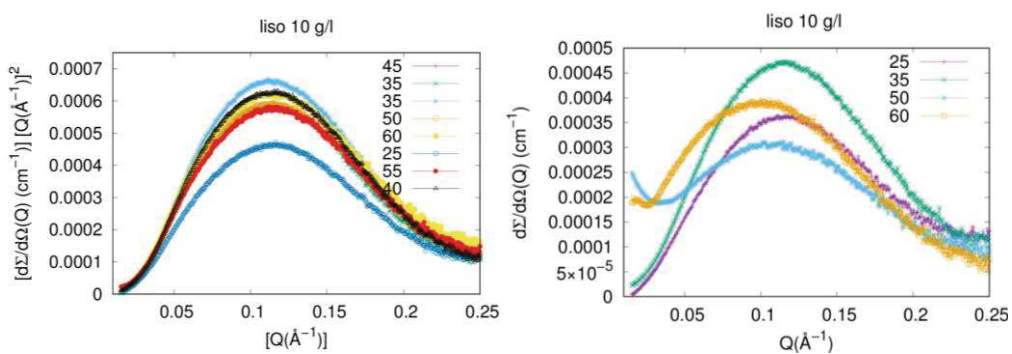


Figura 89 Kratky plot lisozima nativo 10 g/l a pH 3 e pH 5 rispettivamente

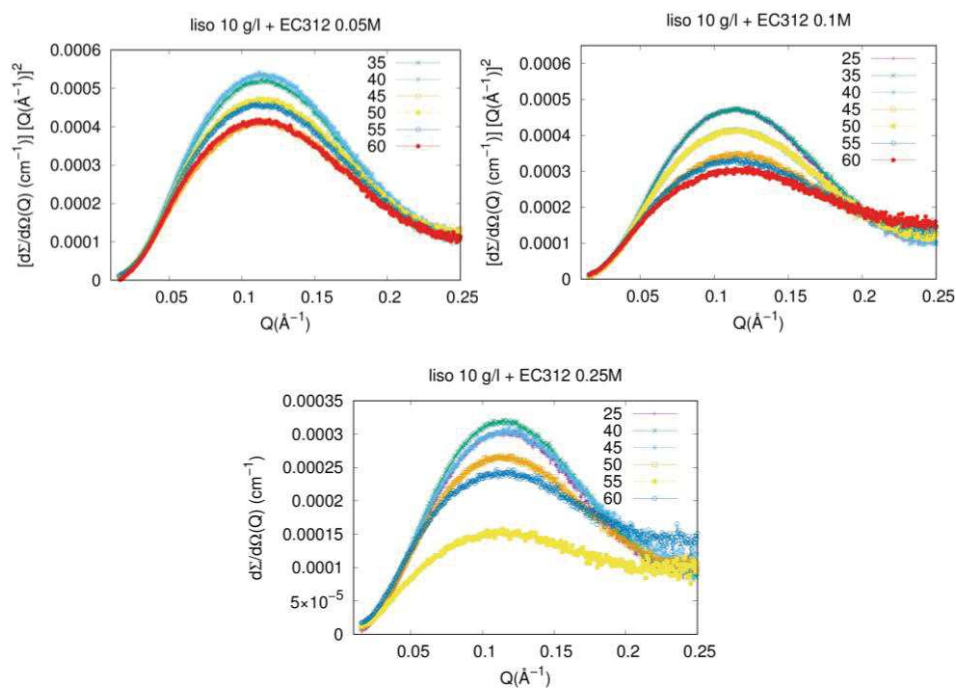


Figura 90 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 3 con lo zucchero EC312 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

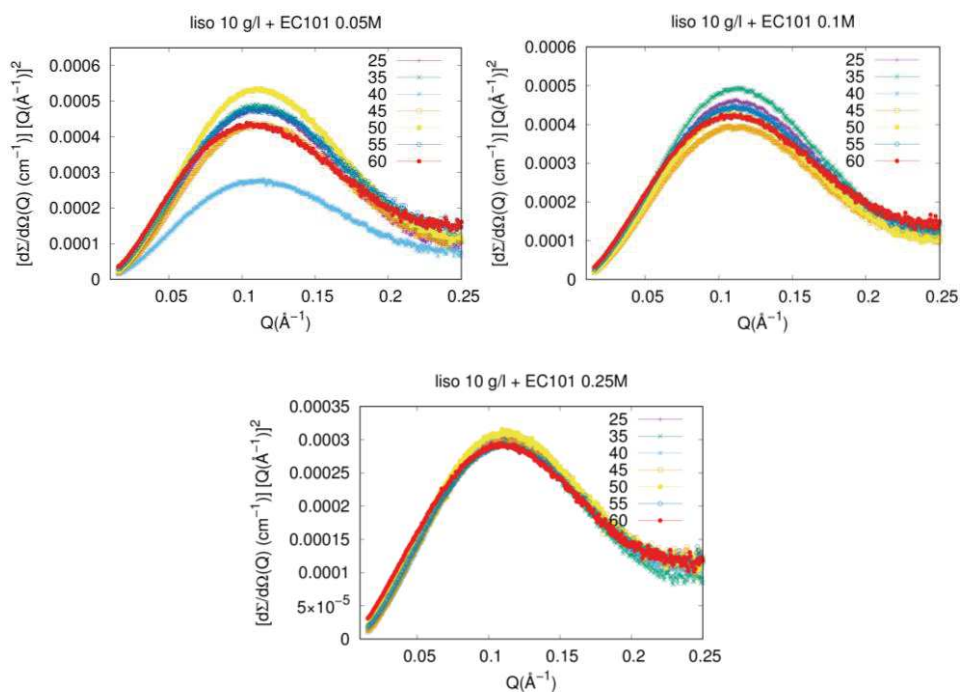


Figura 91 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 3 con lo zucchero EC101 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

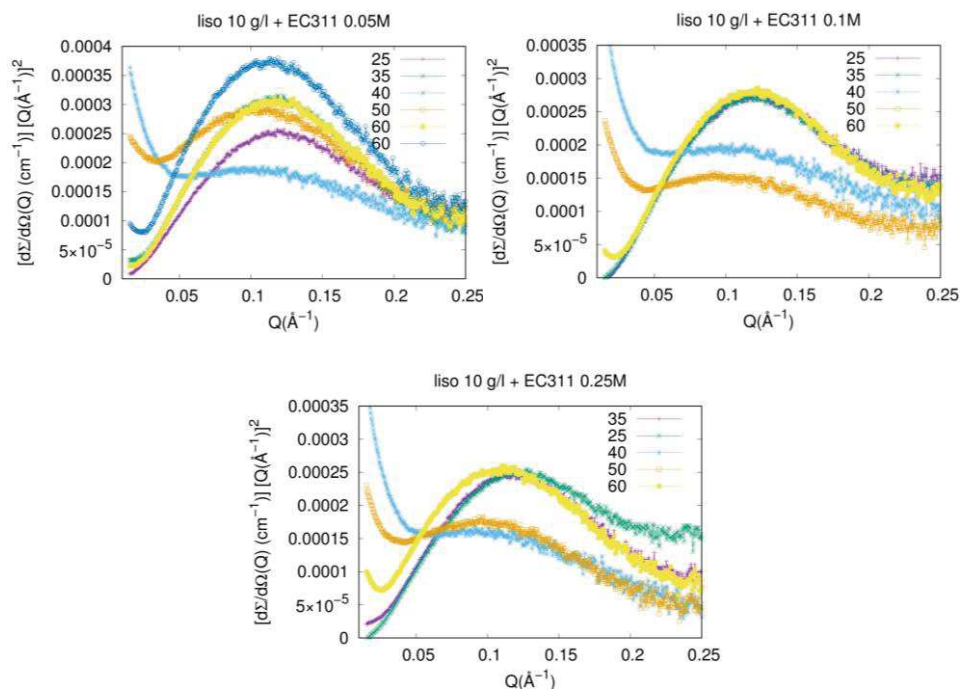


Figura 92 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 3 con lo zucchero EC311 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

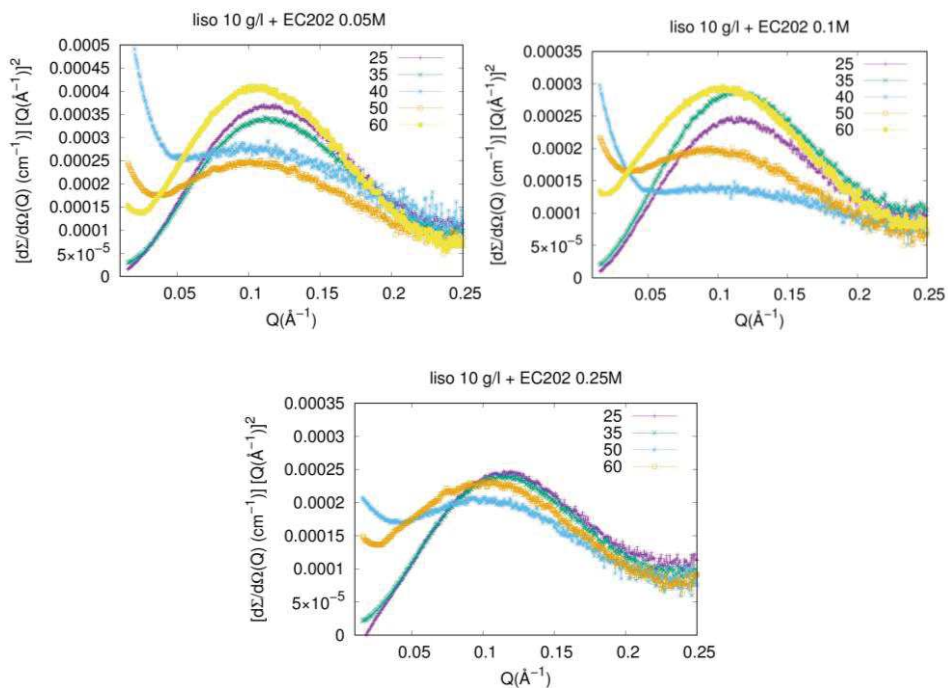


Figura 93 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 3 con lo zucchero EC202 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

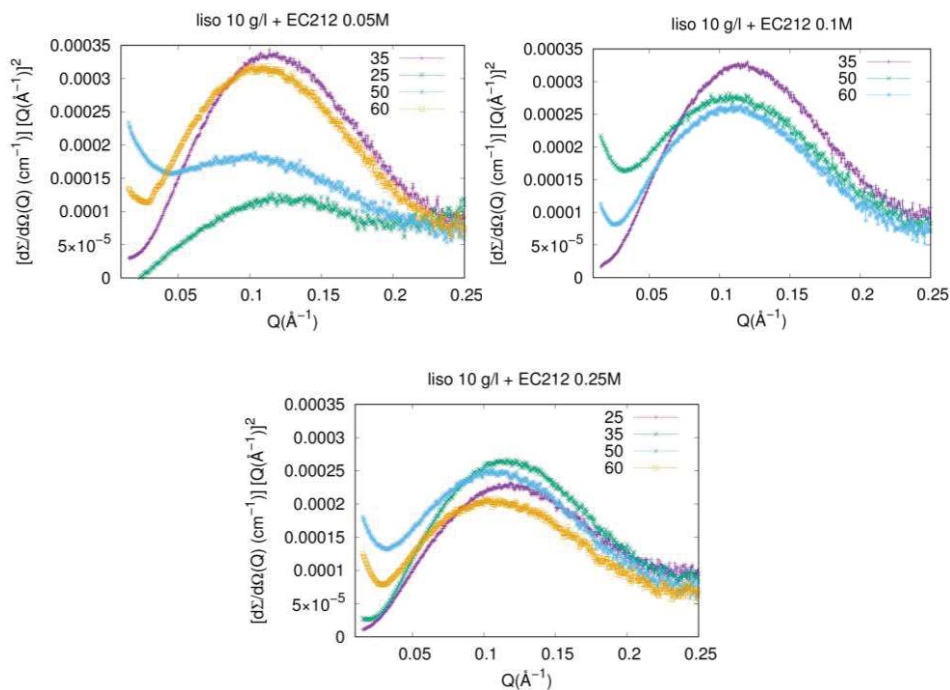


Figura 94 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 3 con lo zucchero EC212 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

Kratky plot delle curve SAXS lisozima 10 g/l a pH 5:

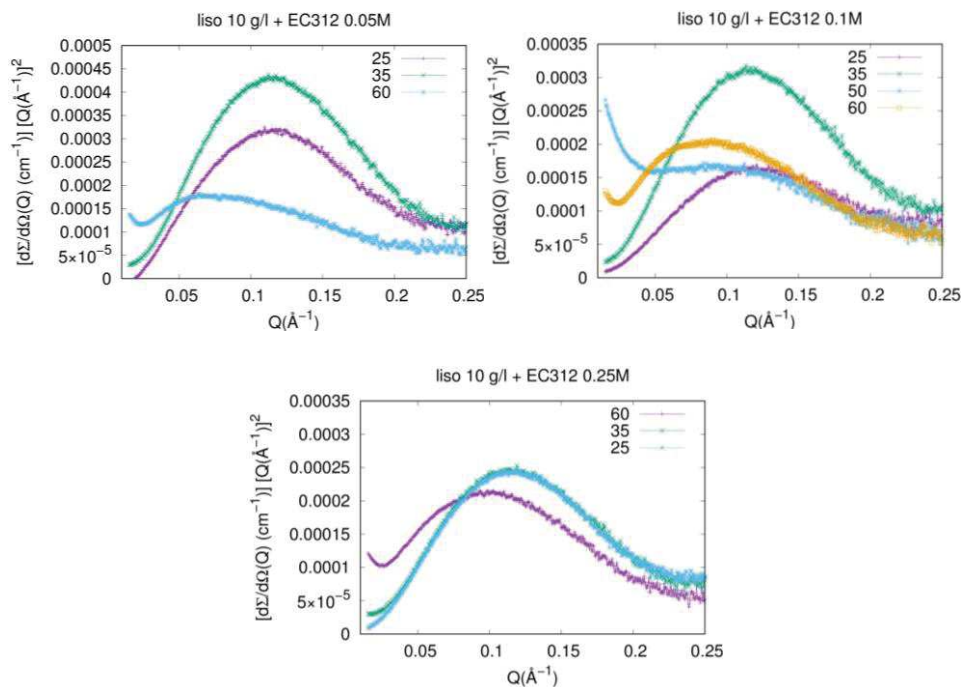


Figura 95 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 5 con lo zucchero EC312 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

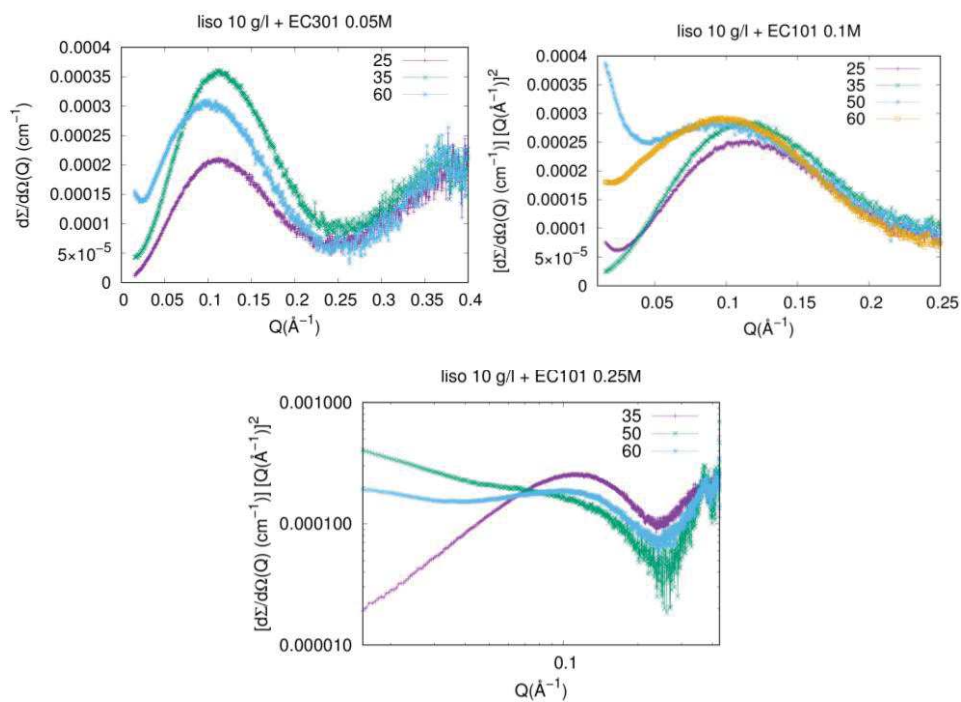


Figura 96 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 5 con lo zucchero EC101 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

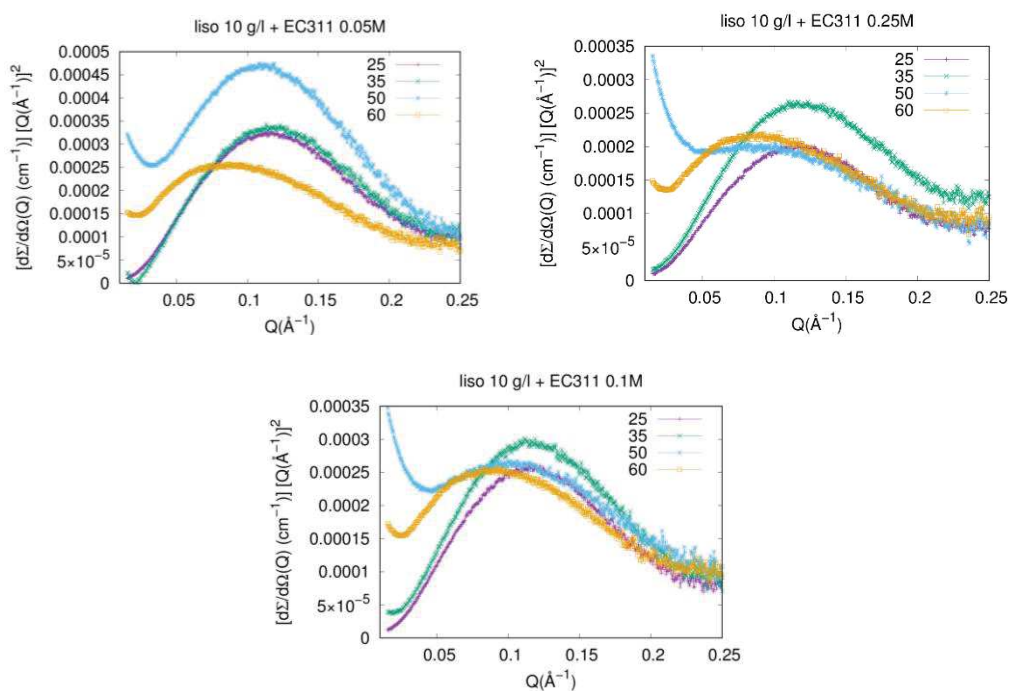


Figura 97 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 5 con lo zucchero EC311 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

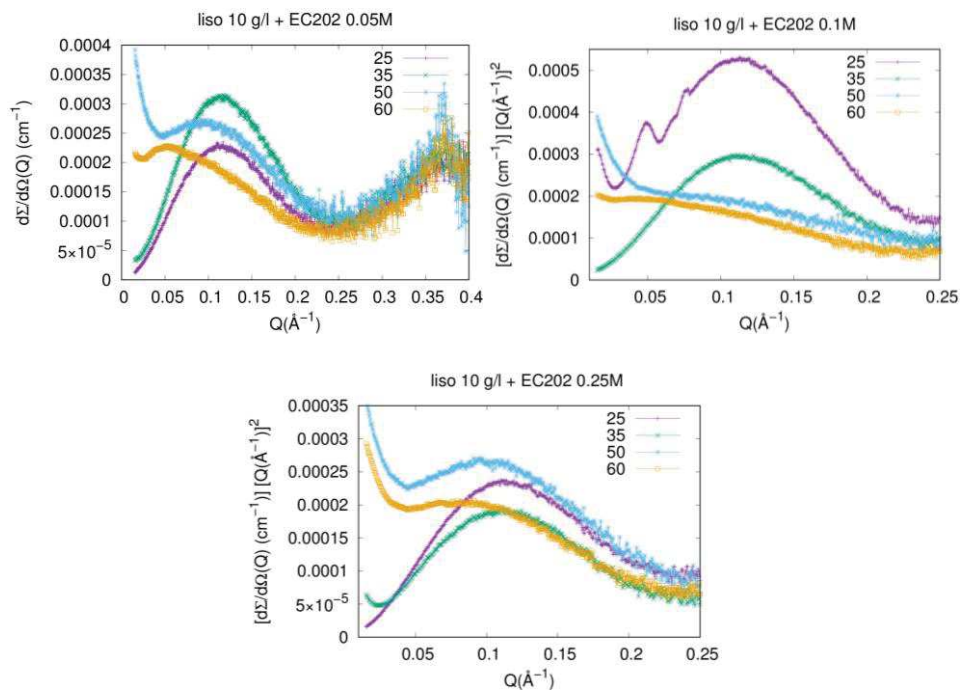


Figura 98 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 5 con lo zucchero EC202 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

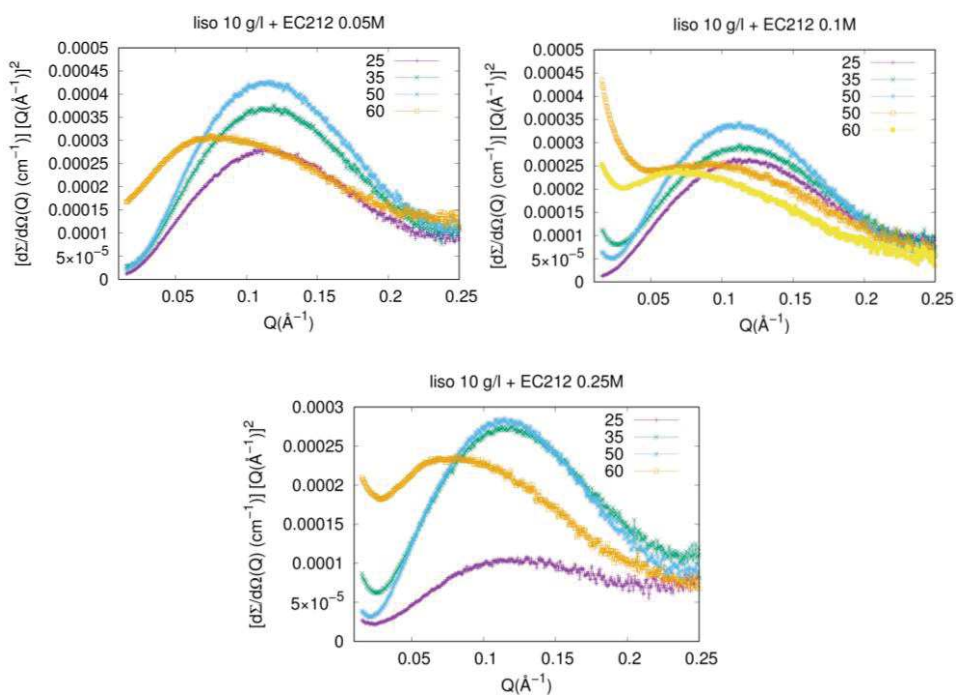


Figura 99 Kratky plot lisozima 10g/l a pH 5 con lo zucchero EC212 rispettivamente a concentrazione: 0.05M, 0.1M, 0.25M.

I risultati ottenuti agli esperimenti SAXS sono stati svolti per valutare la stabilità termica del lisozima in presenza di 5 zuccheri neosintetizzati. Gli zuccheri sono stati ideati e realizzati da uno spin-off portoghese a scopi farmacologici per mantenere inalterate proteine e farmaci durante il trasporto [46]. In questa sede si voleva valutare l'efficacia degli zuccheri servendosi della tecnica del "Small Angle Scattering" (linea SAXS di Trieste) per vedere gli effetti sulle proteine in soluzione. Questi zuccheri testati in presenza di lisozima soggetto a cicli di denaturazione all'aumentare della temperatura non sembrerebbero aumentarne la stabilità. In certi casi, confrontando i vari plot di Kratky, sembrerebbero avere un effetto contrario destabilizzante all'aumentare della concentrazione di zucchero. Ulteriori studi verranno svolti su questo argomento.

5 CONCLUSIONI

Il lavoro svolto in questa tesi aveva lo scopo di valutare e chiarire gli eventuali effetti di agenti stabilizzanti sulla denaturazione termica e sull'aggregazione amiloide del lisozima in vitro. L'idea iniziale è stata quella di studiare gli effetti dell'aminoacido taurina. La taurina è un agente versatile a livello fisiologico come già riportato nel capitolo 1 (Introduzione) [38]. Lo scopo era capire se possa essere un valido candidato anche per il ruolo di stabilizzatore proteico, in particolare nel processo di fibrillogenesi delle proteine.

Le metodiche che sono state utilizzate hanno richiesto prima diversi tentativi di ottimizzazione dei protocolli per avere dei risultati convincenti.

Da questo studio si evince che la taurina agisce come stabilizzatore rallentando la denaturazione termica in vitro del lisozima e interferisce con la fibrillogenesi, in

particolare nella fase di maturazione delle fibrille, sequestrando le strutture intermedie tossiche nella fase critica di nucleazione secondaria. Non è ancora ben chiaro il meccanismo d'azione della taurina, perché da questo studio sperimentale emerge che il suo effetto non sia direttamente proporzionale alla sua concentrazione.

Il lavoro ha mostrato un aumento della fibrillazione del lisozima all'aumentare della forza ionica (NaCl) in assenza e in presenza di taurina. Questo indica che l'NaCl interferisce con la taurina confermando uno studio recente fatto con il trealosio che mostra un comportamento analogo [23].

Le analisi allo spettrofotometro dei campioni di lisozima soggetti a cinetica di aggregazione per 6 ore a temperatura di 65 °C con un agitatore magnetico mostrano che a concentrazioni di taurina basse, come 25 mM di taurina, c'è già un effetto stabilizzante. Raddoppiando la concentrazione di taurina (50 mM) l'effetto persiste, ma non si discosta significativamente dal caso precedente. A 400 mM si ha un risultato molto positivo: si rivela un'efficacia importante della taurina. Allo stesso modo le analisi condotte al dicroismo circolare sempre su campioni di lisozima evidenziano un certo effetto a 50 mM di taurina con un rallentamento della denaturazione enzimatica ed un aumento della temperatura di melting di qualche grado come riportato nella tabella 2 del capitolo 4 (paragrafo 4.1). A concentrazioni raddoppiate l'effetto è poco notevole, ma migliora alla concentrazione di 400 mM con un rallentamento della denaturazione e un aumento della temperatura di Melting di oltre 5 °C (tabella 2, capitolo 4, paragrafo 4.1). Il campione invece a concentrazione di 600 mM ha un effetto stabilizzante rispetto al campione senza taurina, ma comunque leggermente inferiore del campione a 400 mM.

Le misure condotte mediante la microscopia a forza atomica mostrano un evidente diminuzione delle fibrille all'aumentare della concentrazione di taurina e del numero degli oligomeri intermedi. In particolare, a concentrazione di 100 mM e 400 mM di taurina si hanno poche fibrille e si notano degli ammassi circolari (sui quali andranno fatti ulteriori studi) dovuti probabilmente alle alte concentrazioni di osmolita che contribuiscono a sequestrare le componenti intermedie impedendone la maturazione sino a costituire fibrille.

È probabile quindi che la taurina abbia un range ottimale di concentrazione, se vogliamo abbastanza ristretto, che con le dovute approssimazioni potrebbe essere tra 400 mM i 500 mM nel caso specifico studiato. A concentrazioni minori o maggiori l'effetto si abbassa e non mostra linearità. Sarebbe interessante svolgere ulteriori studi in vitro magari testandolo su altre proteine modello oppure sul β -amiloide peptide e sull' α -sinucleina che sappiamo essere alla base della malattia di Alzheimer e del morbo di Parkinson, rispettivamente [63].

Per quanto riguarda l'esperimento condotto mediante Small Angle X-ray Scattering alla linea SAXS di Elettra-Sincrotrone Trieste, gli zuccheri che si volevano testare e che sono in fase di brevetto [46] non sembrerebbero rallentare la denaturazione del lisozima. Dai dati rielaborati e dall'estrapolazione dei Kratky plot a certe temperature sembrerebbero favorire l'aggregazione della proteina modello. Non è chiaro se possano avere funzione di collante tra le macromolecole in soluzione. Andranno fatti ulteriori studi per accertare la cosa.

6 Bibliografia

- [1] T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, e C. M. Dobson, «The amyloid state and its association with protein misfolding diseases», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, n. 6, pagg. 384–396, giu. 2014, doi: 10.1038/nrm3810.
- [2] D. A. Fletcher e R. D. Mullins, «Cell mechanics and the cytoskeleton», *Nature*, vol. 463, n. 7280, pagg. 485–492, gen. 2010, doi: 10.1038/nature08908.
- [3] F. G. Omenetto e D. L. Kaplan, «New opportunities for an ancient material», *Science*, vol. 329, n. 5991, pagg. 528–531, lug. 2010, doi: 10.1126/science.1188936.
- [4] A. Chacinska, C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow, e N. Pfanner, «Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms», *Cell*, vol. 138, n. 4, pagg. 628–644, ago. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.08.005.
- [5] Roberto Colombo ed Ettore Olmo, *BIOLOGIA della CELLULA*, Edi.Ermes. .
- [6] C. GM., *Protein Folding and Processing*, vol. A Molecular Approach. 2nd edition. 2000.
- [7] S. W. Englander e L. Mayne, «The nature of protein folding pathways», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, n. 45, pag. 15873, nov. 2014, doi: 10.1073/pnas.1411798111.
- [8] W. Al-Zuhairi, «Revisiting Lysozme and tri-N-acetylglucosamine interaction Preparation and Characterization», 2014.
- [9] A. J. Baldwin *et al.*, «Metastability of Native Proteins and the Phenomenon of Amyloid Formation», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, n. 36, pagg. 14160–14163, set. 2011, doi: 10.1021/ja2017703.
- [10] S. I. A. Cohen, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, e T. P. J. Knowles, «From Macroscopic Measurements to Microscopic Mechanisms of Protein Aggregation», *J. Mol. Biol.*, vol. 421, n. 2–3, pagg. 160–171, ago. 2012, doi: 10.1016/j.jmb.2012.02.031.
- [11] H. Li, R. Lantz, e D. Du, «Vibrational Approach to the Dynamics and Structure of Protein Amyloids», *Mol. Basel Switz.*, vol. 24, n. 1, pag. 186, gen. 2019, doi: 10.3390/molecules24010186.
- [12] M. Nilsson, «Techniques to study amyloid fibril formation in vitro», *Methods*, vol. 34, n. 1, pagg. 151–160, set. 2004, doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.012.

- [13] S. I. A. Cohen *et al.*, «Proliferation of amyloid-42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, n. 24, pagg. 9758–9763, giu. 2013, doi: 10.1073/pnas.1218402110.
- [14] A. Munke *et al.*, «Phage display and kinetic selection of antibodies that specifically inhibit amyloid self-replication», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, n. 25, pagg. 6444–6449, giu. 2017, doi: 10.1073/pnas.1700407114.
- [15] «J. Biol. Chem.-1997-Walsh-22364-72.pdf». .
- [16] Sunde, M. *et al.*, «Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction», *Journal of Molecular Biology*, n. 273, pagg. 729–739, 1997.
- [17] «Martin Luther Universitat Halle Wittenberg». <http://www.natfak2.uni-halle.de/forschung/verbund/sfbtrr102/conceperia/amyloids/?lang=en>.
- [18] A. T. Petkova *et al.*, «A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, n. 26, pagg. 16742–16747, dic. 2002, doi: 10.1073/pnas.262663499.
- [19] V. Kumar, R. Chari, V. K. Sharma, e D. S. Kalonia, «Modulation of the thermodynamic stability of proteins by polyols: significance of polyol hydrophobicity and impact on the chemical potential of water», *Int. J. Pharm.*, vol. 413, n. 1–2, pagg. 19–28, lug. 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.04.011.
- [20] P. N. Jethva e J. B. Udgaonkar, «The Osmolyte TMAO Modulates Protein Folding Cooperativity by Altering Global Protein Stability», *Biochemistry*, vol. 57, n. 40, pagg. 5851–5863, ott. 2018, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00698.
- [21] T. Arakawa e S. N. Timasheff, «Stabilization of protein structure by sugars», *Biochemistry*, vol. 21, n. 25, pagg. 6536–6544, dic. 1982, doi: 10.1021/bi00268a033.
- [22] P. Yancey, M. Clark, S. Hand, R. Bowlus, e G. Somero, «Living with water stress: evolution of osmolyte systems», *Science*, vol. 217, n. 4566, pagg. 1214–1222, set. 1982, doi: 10.1126/science.7112124.
- [23] E. Mari, C. Ricci, S. Pieraccini, F. Spinozzi, P. Mariani, e M. G. Ortore, «Trehalose Effect on The Aggregation of Model Proteins into Amyloid Fibrils», *Life*, vol. 10, n. 5, pag. 60, mag. 2020, doi: 10.3390/life10050060.
- [24] H. Ripps e W. Shen, «Review: Taurine: A “very essential” amino acid», *Mol. Vis.*, pag. 14, 2012.
- [25] J. B. Lombardini, «Effects of ATP and Taurine on Calcium Uptake by Membrane Preparations of the Rat Retina», *J. Neurochem.*, vol. 40, n. 2, pagg. 402–406, feb. 1983, doi: 10.1111/j.1471-4159.1983.tb11296.x.
- [26] A. Zulli, «Taurine in cardiovascular disease», *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 14, n. 1, 2011, [In linea]. Available at: <https://journals.lww.com/co->

clinicalnutrition/Fulltext/2011/01000/Taurine_in_cardiovascular_disease.10.a
spx.

- [27] Y. Yamori, T. Taguchi, A. Hamada, K. Kunimasa, H. Mori, e M. Mori, «Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies», *J. Biomed. Sci.*, vol. 17, n. 1, pag. S6, ago. 2010, doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S6.
- [28] W. J. L'Amoreaux, C. Cuttitta, A. Santora, J. F. Blaize, J. Tachjadi, e A. El Idrissi, «Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines», *J. Biomed. Sci.*, vol. 17 Suppl 1, n. Suppl 1, pagg. S11–S11, ago. 2010, doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S11.
- [29] H. Ripps e W. Shen, «Review: taurine: a “very essential” amino acid», *Mol. Vis.*, vol. 18, pagg. 2673–2686, 2012.
- [30] I. Lambert, «Regulation of the Cellular Content of the Organic Osmolyte Taurine in Mammalian Cells», *Neurochem. Res.*, vol. 29, pagg. 27–63, feb. 2004, doi: 10.1023/B:NERE.0000010433.08577.96.
- [31] I. H. Lambert, «Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells», *Neurochem. Res.*, vol. 29, n. 1, pagg. 27–63, gen. 2004, doi: 10.1023/b:nere.0000010433.08577.96.
- [32] T. Ito, S. W. Schaffer, e J. Azuma, «The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications», *Amino Acids*, vol. 42, n. 5, pagg. 1529–1539, mag. 2012, doi: 10.1007/s00726-011-0883-5.
- [33] A. T. A. Nandhini, V. Thirunavukkarasu, e C. Anuradha, «Taurine modifies insulin signaling enzymes in the fructose-fed insulin resistant rats», *Diabetes Metab.*, vol. 31, n. 4 Pt 1, pagg. 337–344, set. 2005, doi: 10.1016/s1262-3636(07)70202-1.
- [34] A. A. Heinämäki, A. S. H. Muhonen, e R. S. Piha, «Taurine and other free amino acids in the retina, vitreous, lens, iris ciliary body, and cornea of the rat eye», *Neurochem. Res.*, vol. 11, n. 4, pagg. 535–542, apr. 1986, doi: 10.1007/BF00965323.
- [35] M. McDaniel e H. Orr, «Absolute levels of some free amino acids in normal and biologically fractionated retinas», vol. 12, n. 9, pag. 8.
- [36] T. Takatani *et al.*, «Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome», *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 287, n. 4, pagg. C949–C953, ott. 2004, doi: 10.1152/ajpcell.00042.2004.
- [37] Jong CJ, Azuma J, Schaffer S., «Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production.», *Amino Acids*, pagg. 2223–32, 2012.
- [38] J. Menzie, C. Pan, H. Prentice, e J.-Y. Wu, «Taurine and central nervous system disorders», *Amino Acids*, vol. 46, n. 1, pagg. 31–46, gen. 2014, doi: 10.1007/s00726-012-1382-z.

- [39] R. Schliebs e T. Arendt, «The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease», *J. Neural Transm.*, vol. 113, n. 11, pagg. 1625–1644, nov. 2006, doi: 10.1007/s00702-006-0579-2.
- [40] M. Hoshi *et al.*, «Nontoxic Amyloid β Peptide₁₋₄₂ Suppresses Acetylcholine Synthesis: POSSIBLE ROLE IN CHOLINERGIC DYSFUNCTION IN ALZHEIMER'S DISEASE», *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n. 4, pagg. 2038–2041, gen. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.4.2038.
- [41] C. C. F. BLAKE, D. F. KOENIG, G. A. MAIR, A. C. T. NORTH, D. C. PHILLIPS, e V. R. SARMA, «Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution», *Nature*, vol. 206, n. 4986, pagg. 757–761, mag. 1965, doi: 10.1038/206757a0.
- [42] J. Wang, M. Dauter, R. Alkire, A. Joachimiak, e Z. Dauter, «Triclinic lysozyme at 0.65 Å resolution», *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 63, n. 12, pagg. 1254–1268, dic. 2007, doi: 10.1107/S0907444907054224.
- [43] Y. Tokunaga, Y. Sakakibara, Y. Kamada, K. Watanabe, e Y. Sugimoto, «Analysis of Core Region from Egg White Lysozyme Forming Amyloid Fibrils», *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 9, n. 2, pagg. 219–227, 2013, doi: 10.7150/ijbs.5380.
- [44] E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, I. M. Vikhlyantsev, e A. G. Bobylev, «Congo Red and amyloids: history and relationship», *Biosci. Rep.*, vol. 39, n. 1, pag. BSR20181415, gen. 2019, doi: 10.1042/BSR20181415.
- [45] A. A. Reinke e J. E. Gestwicki, «Insight into Amyloid Structure Using Chemical Probes: Amyloid Structure Using Chemical Probes», *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 77, n. 6, pagg. 399–411, giu. 2011, doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01110.x.
- [46] <https://patents.google.com/patent/WO2015137838A1/ru>.
- [47] T. A. Trumbo, E. Schultz, M. G. Borland, e M. E. Pugh, «Applied spectrophotometry: Analysis of a biochemical mixture», *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 41, n. 4, pagg. 242–250, lug. 2013, doi: 10.1002/bmb.20694.
- [48] Ugo Amaldi, *La Fisica di Amaldi*, vol. 3. Zanichelli.
- [49] A. Scarani, «Tecniche spettroscopiche e spettrofotometriche», n. Rivista Italiana di Gemmologia, 2017.
- [50] K. Vo, «Spectrophotometry», 2019. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry).
- [51] R. Cocomazzi, *Analisi delle proteine tramite spettrofotometria*. 2018.
- [52] *I principi di Biochimica di Lehninger*, Sesta. 2014.

- [53] Cantor and Schimmel, *BIOPHYSICAL CHEMISTRY*, vol. Part II. .
- [54] A. J. Miles e B. A. Wallace, «Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics», *Chem Soc Rev*, vol. 35, n. 1, pagg. 39–51, 2006, doi: 10.1039/B316168B.
- [55] G. Binnig, C. F. Quate, e Ch. Gerber, «Atomic Force Microscope», *Phys Rev Lett*, vol. 56, n. 9, pagg. 930–933, mar. 1986, doi: 10.1103/PhysRevLett.56.930.
- [56] S. Vahabi, N. Salman, e B. N. Salman, «Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study», vol. 38, n. 2, pag. 8.
- [57] N. Sasaki e M. Tsukada, «Theory of Atomic-Force Microscopy(STM Theory)», *Sci. Rep. Rerearch Inst. Tohoku Univ. Ser. -Phys.*, vol. 44, gen. 1997.
- [58] D. Lamprou e J. Smith, «Applications of AFM in Pharmaceutical Sciences», 2015.
- [59] Y. F. Dufrêne *et al.*, «Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology», *Nat. Nanotechnol.*, vol. 12, n. 4, pagg. 295–307, apr. 2017, doi: 10.1038/nnano.2017.45.
- [60] https://www.horiba.com/en_en/products/detail/action/show/Product/omega-scope-1913.
- [61] D. A. Jacques e J. Trehwella, «Small-angle scattering for structural biology-expanding the frontier while avoiding the pitfalls», *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 19, n. 4, pagg. 642–657, apr. 2010, doi: 10.1002/pro.351.
- [62] A. G. Kikhney e D. I. Svergun, «A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins», *FEBS Lett.*, vol. 589, n. 19PartA, pagg. 2570–2577, set. 2015, doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.027.
- [63] J. Menzie, C. Pan, H. Prentice, e J.-Y. Wu, «Taurine and central nervous system disorders», *Amino Acids*, vol. 46, n. 1, pagg. 31–46, gen. 2014, doi: 10.1007/s00726-012-1382-z.