

IL PEPTIDE BETA AMILOIDE: LA PROSPETTIVA DI UN CHIMICO. RUOLO IN ALZHEIMER E  
FIBRILLAZIONE

THE AMYLOID BETA PEPTIDE: A CHEMIST'S PERSPECTIVE. ROLE IN  
ALZHEIMER'S AND FIBRILLIZATION

- ▶ Candidatta: Doris Cosic
- ▶ Relatore: Dott.ssa Roberta Galeazzi

## *Riassunto*

- ▶ La malattia di Alzheimer è la causa più comune di demenza (che rappresenta circa il 50-80% di tutti i casi) con una stima di 18 milioni persone in tutto il mondo attualmente affette da questa condizione
- ▶ Il Morbo di Alzheimer viene oggi definito come un disordine neurodegenerativo progressivo, caratterizzato da perdita di memoria e cambiamenti nella personalità
- ▶ Il  $\beta$ -amiloide è una proteina normalmente prodotta dalle cellule del nostro cervello a partire dalla proteina precursore della  $\beta$ -amiloide (APP), grazie all'azione delle secretasi, sostanze che funzionano in maniera come una forbice; esse tagliano l'APP riducendola in frammenti più piccoli

## *Introduzione*

### Fibrille amiloidi - la breve storia

- ▶ Fisico tedesco Rudolph Virchow rivolse I suoi studi su macroscopiche anomalie nel cervello umano, presenti sotto forma di corpuscoli, somiglianti a grani di amido,
- ▶ Questi corpuscoli, come l'amido, reagivano positivamente alla colorazione con iodio, tingendosi di blu mentre tutti gli altri tessuti si coloravano di giallo.
- ▶ Invece, trattamenti con iodio e acido solforico, utilizzati come test per la cellulosa nella membrana cellulare delle piante, rivelavano il caratteristico colore violetto della cellulosa. Ipotizzandole sostanze "cellulosa-likeness", Virchow coniò il termine "amiloide".
- ▶ Studi successivi, dimostrarono invece la presenza, in queste masse amiloidi, di materiale proteico, una significativa quantità di azoto e, soprattutto, l'assenza di carboidrati, per cui si pensò che l'"amiloide" fosse una proteina o una classe di proteine

# *Introduzione*

## Malattie neurodegenerative

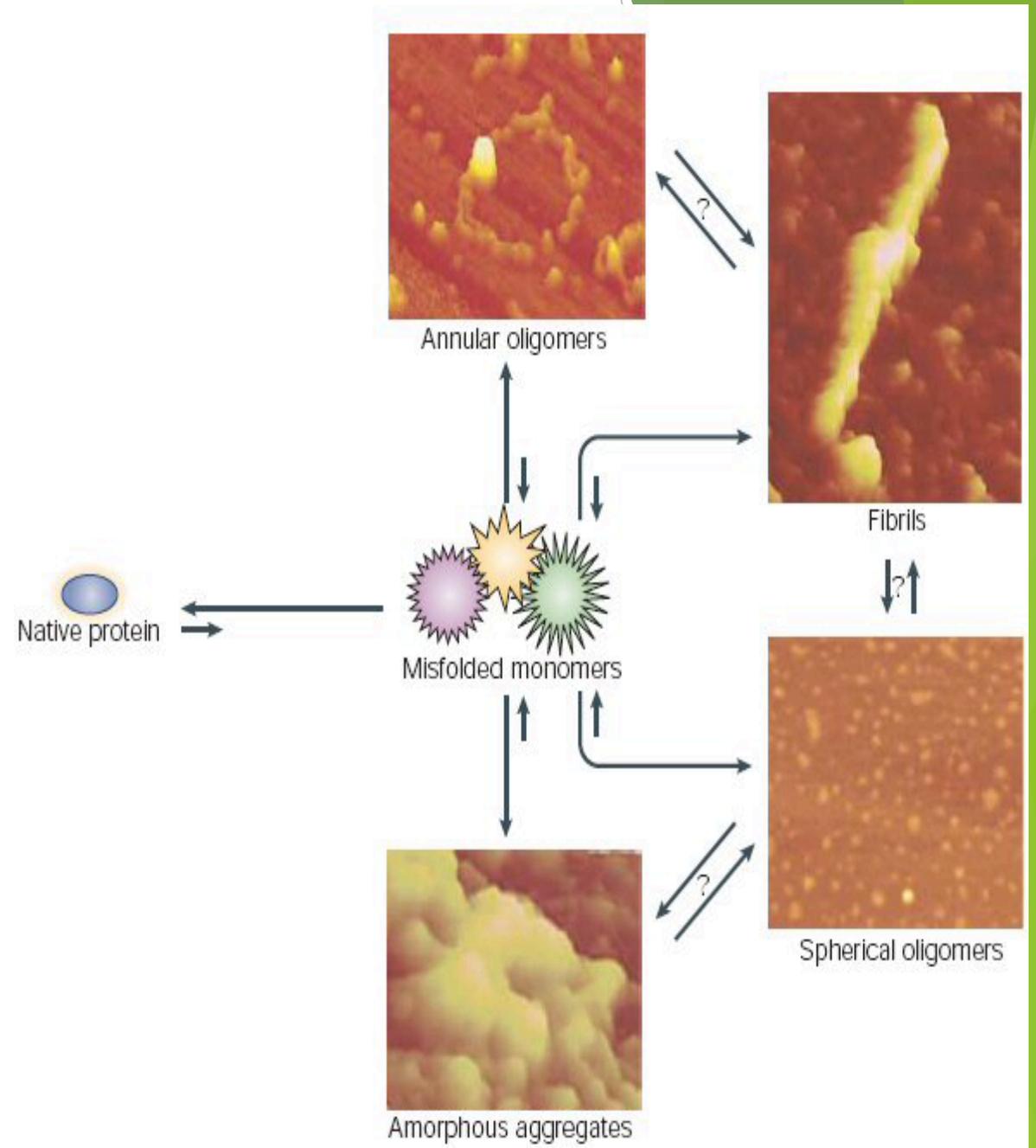
Il morbo di Alzheimer, come molte altre gravi malattie neurodegenerative, tra cui la Corea di Huntington, il Morbo di Parkinson e l'Encefalopatia Spongiforme sono, caratterizzate dalla formazione e dall'accumulo di aggregati proteici nel cervello, che formano depositi fibrillari altamente stabili e insolubili, le fibrille amiloidi

- ▶ condividono una serie di caratteristiche chimico-fisiche: morfologia fibrillare, alta percentuale di struttura secondaria foglietto  $\beta$  ( $\beta$ -sheet), resistenza alle proteasi, insolubilità nei solventi comuni

## La neurodegenerazione

- ▶ Queste condizioni patologiche si manifestano quando una proteina nativa subisce un riarrangiamento conformazionale (misfolding) che, spesso la porta ad assumere una struttura tridimensionale errata.
- ▶ Ciò porta alla formazione di intermedi parzialmente avvolti, che espongono al solvente zone idrofobiche, normalmente nascoste all'interno della struttura tridimensionale della proteina; in tal modo, si creano le condizioni per una eventuale aggregazione delle catene polipeptidiche in strutture organizzate.
- ▶ La comprensione del processo di polimerizzazione di questi polipeptidi/proteine è cruciale per chiarire l'origine di queste patologie e, sviluppare approcci e strategie terapeutiche e preventive.
- ▶ La presenza di questi aggregati contenenti proteine in uno stato di folding non-nativo induce un danno alla cellula, determinato da una perdita di funzione fisiologica, da un aumento di citotossicità, in quanto gli aggregati sono tossici *per se*

- Il peptide Aβ, nel corso della fibrillogenesi, si assembla in piccoli aggregati prefibrillari metastabili e solubili. Questi oligomeri solubili, includono particelle sferiche di 2.7-4.2 nm di diametro, che si formano precocemente, e strutture curvilinee dette protofibrille, derivanti dall'unione delle particelle sferiche a formare "stringhe"



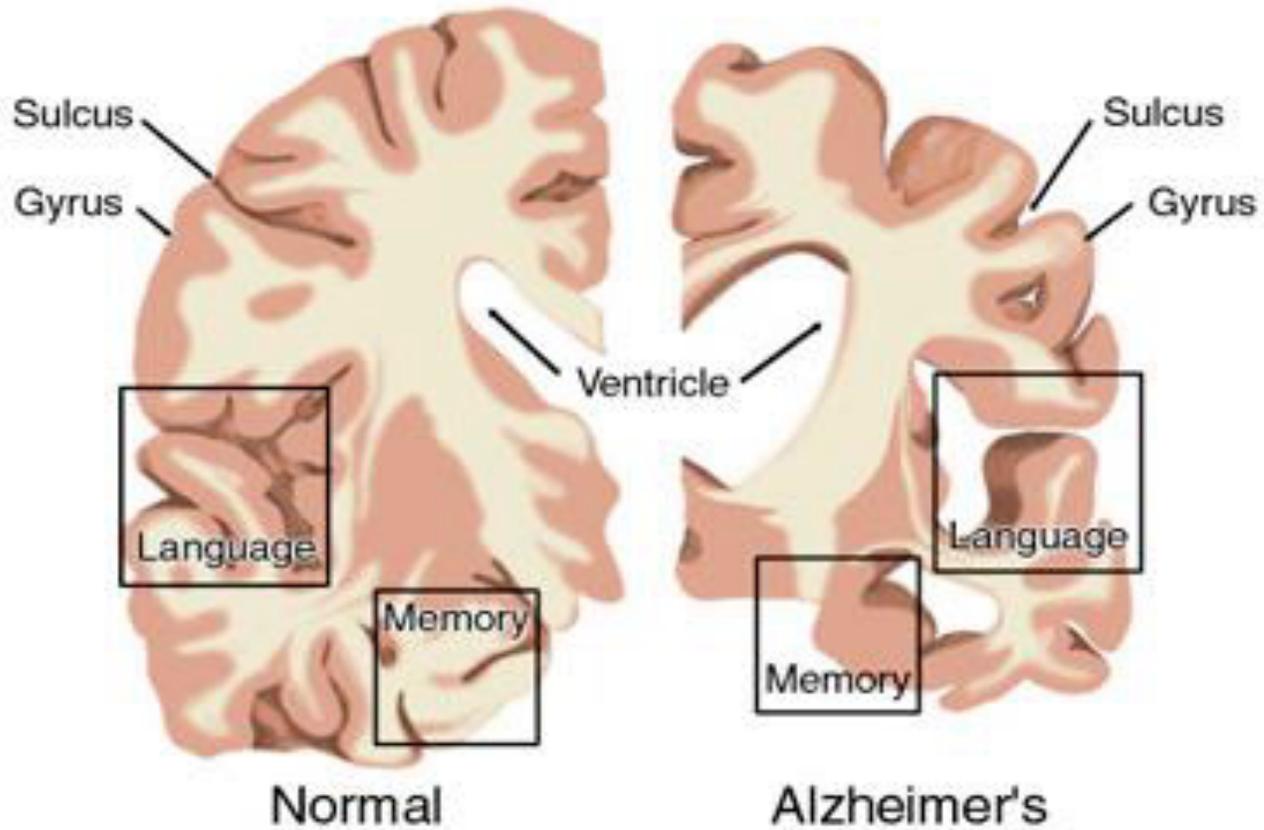
## 3.1 IL MORBO DI ALZHEIMER

Nel 1906, Alois Alzheimer, giovane neurologo tedesco, descrisse in una donna di cinquant'anni una insolita patologia, che le aveva provocato perdita di memoria, disorientamento, allucinazioni e l'aveva infine condotta a morte.

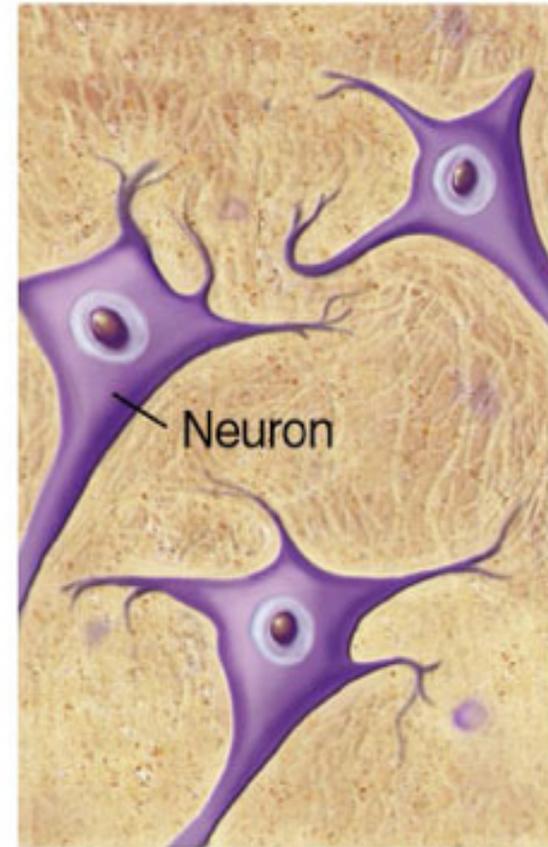
Con l'autopsia del cervello della paziente era visibile una scarsità di neuroni nella corteccia cerebrale e la presenza di due distinti tipi di lesioni cerebrali: depositi extracellulari e fasci intracellulari di grovigli neurofibrillari

- ▶ Queste lesioni oggi sono considerate le caratteristiche patologiche invariante del Morbo di Alzheimer

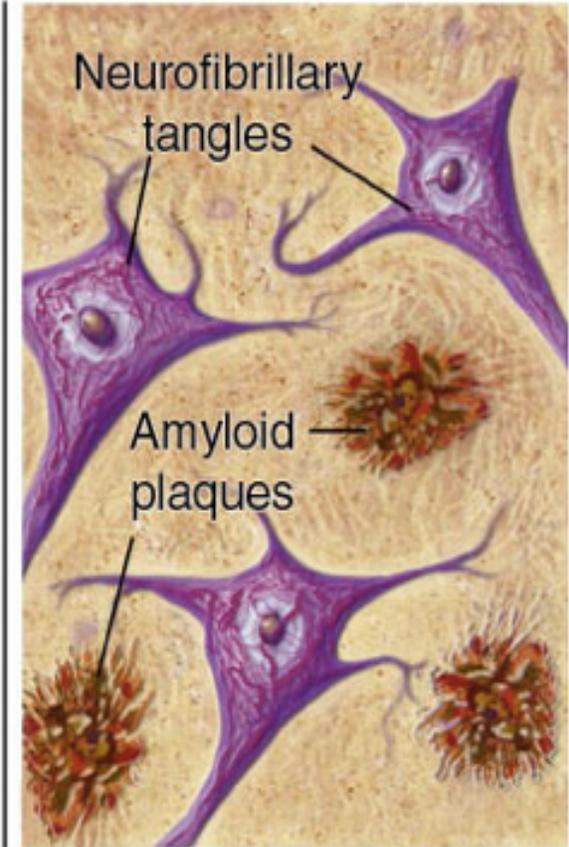
## Brain Cross-Sections



## Normal



## Alzheimer's



differenze tra encefalo normale ed encefalo affetto da AD

## 3.2 IL MORBO DI ALZHEIMER

- Il Morbo di Alzheimer viene oggi definito come un disordine neurodegenerativo progressivo, caratterizzato da perdita di memoria e cambiamenti nella personalità.
- Poiché le cause della perdita di memoria possono essere diverse, nel cervello dei pazienti affetti devono essere presenti in notevoli quantità i “marker” patologici dell’Alzheimer, cioè le placche senili (i depositi extracellulari individuati da Alzheimer) e i grovigli neurofibrillari intracellulari
- Le placche e i grovigli neurofibrillari sono presenti nelle regioni del cervello coinvolte nei processi di apprendimento e memoria e nei compartimenti emozionali

La maggior parte dei casi di Alzheimer sono sporadici, non ereditari; tuttavia, sembrano esserci molti geni che determinano una certa suscettibilità alla malattia. Il primo tra questi è il gene per l'apolipoproteina E, per la quale ci sono tre alleli che codificano le isoforme E2, E3 ed E4; gli individui che producono E4 sono ad alto rischio di malattia, poiché questa isoforma favorisce l'aggregazione dei peptidi BA

# il processamento dell APP e la genesi dei peptidi $\beta$ A

## La genesi dei peptidi $\beta$ A

- La proteina precursore del  $\beta$ A, o APP, è una glicoproteina integrale di membrana
- Il ruolo di questa proteina non è ancora del tutto chiaro ma sembra importante nel regolare la sopravvivenza dei neuroni, lo sviluppo dei neuriti, la plasticità sinaptica e l'adesione cellulare.
- APP è soggetta, in condizioni fisiologiche, a due vie di processamento, una nonamiloidogena (via dell'  $\alpha$ -secretasi) e una amiloidogena (via della  $\beta$ -secretasi), che porta alla produzione dei peptidi  $\beta$ A.
- Nella via amiloidogena, invece, il taglio proteolitico da parte della  $\beta$ -secretasi sul versante extracellulare avviene a livello dell'estremo N-terminale della sequenza  $\beta$ A, con formazione del frammento sAPP $\beta$  che viene secreto, e di C99, che rimane nella membrana. Quest'ultimo viene poi attaccato dalla  $\gamma$ -secretasi che taglia in posizioni a livello dell'estremo C-terminale della sequenza  $\beta$ A.
- Come risultato avremo la formazione di frammenti  $\beta$ -amiloidi di lunghezza tra 39 e 43 aminoacidi, di cui i più abbondanti sono  $\beta$ A40 e  $\beta$ A42, che vengono secreti, e un "dominio intracellulare di APP

## Il ruolo dell peptide $\beta$ -amiloide

Come accennato sopra, dal doppio taglio proteolitico catalizzato da  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi, si generano peptidi BA di lunghezza variabile ma i principali costituenti delle placche amiloidi sono i peptidi BA.

La concentrazione di BA42 secreto è circa il 10% di quella di BA40

BA42 è la componente principale delle placche e la sua neurotossicità si rivela essere molto maggiore

BA40 è presente, in vivo, sotto forma di monomeri, dimeri, trimeri e tetrameri in equilibrio tra loro

BA42 è inizialmente presente sotto forma di monomeri non strutturati che tendono precocemente ad oligomerizzare in pentameri ed esameri, anch'essi prevalentemente non strutturati, detti paranuclei

- ▶ I peptidi A $\beta$  nel tessuto cerebrale esistono in diversi stati di aggregazione , come monomeri, dimeri e oligomeri ad alto peso molecolare; l'ulteriore aggregazione di oligomeri genera le protofibrille ed infine le fibrille
- ▶ Solo le fibrille,sono alla base della formazione delle placche, presenti sia nel cervello di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer, che in soggetti anziani sani

## Il ruolo del peptide $\beta$ -amiloide

I meccanismi di degenerazione neuronale promossi dal peptide  $\beta$ A sembrano essere correlabili principalmente a stress ossidativo di proteine, DNA e lipidi di membrana.

Come conseguenza, si ha una perturbazione dell'omeostasi ionica e dei principali soluti cellulari; in particolare,  $\beta$ A altera significativamente l'omeostasi del calcio tramite stress ossidativi che disabilitano le pompe per il calcio sulla membrana e favoriscono il flusso di questo ione attraverso canali voltaggio dipendenti per il glutammato

Una aumentata concentrazione di calcio intracellulare può indurre iperattivazione di proteasi o chinasi calcio-dipendenti

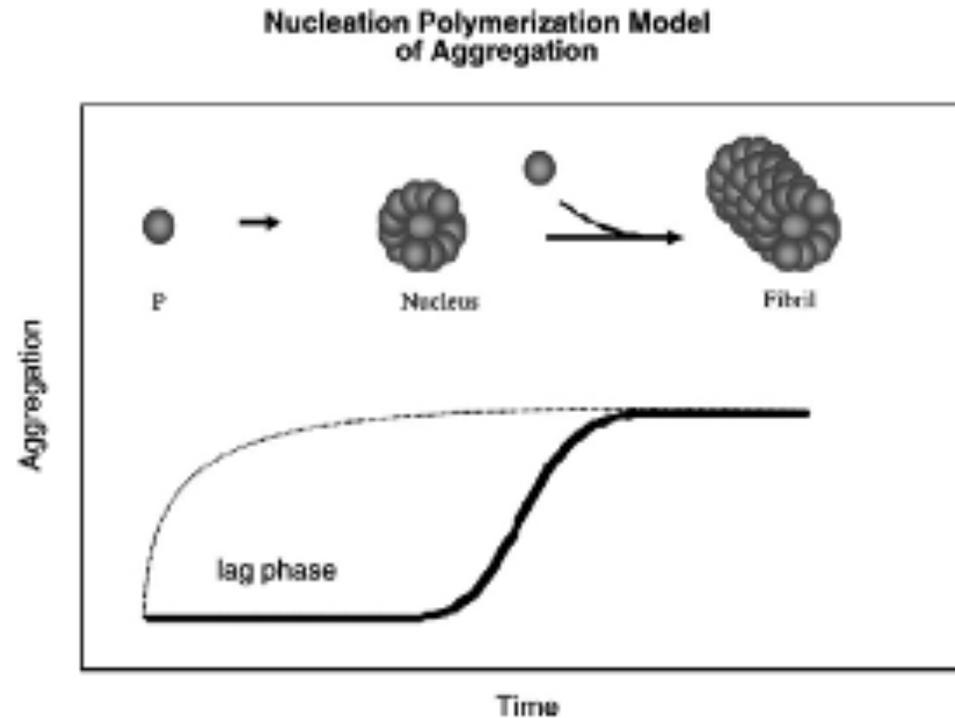
Le fibrille amiloidi sono strutture semi-flessibili, tipicamente lineari e larghe circa 6-12 nm; sono formate da un numero variabile, da 3 a 6 nm di solito, di estesi filamenti (protofilamenti) di circa 1-2 nm di diametro, arrotolati a formare una struttura “a fune”.

Il “core” delle fibrille amiloidi è rappresentato da una struttura cross- $\beta$ , dove ciascun protofilamento è costituito da una doppia fila di  $\beta$ -sheet

- ▶ Il residuo Phe-19 della proteina  $\beta$ -amiloide è particolarmente importante nella formazione delle fibrille. se Phe-19 viene rimpiazzata con un altro aminoacido, ad esempio Ala, viene persa del tutto la capacità di formare fibrille.
- ▶ Le tecniche più comuni per l'identificazione delle fibrille si basano sull'utilizzo di due coloranti: istologici il Congo Red e la Tioflavina T, si sono rivelati utili anche per studi in vitro di depositi amiloidi isolati e fibrille in soluzione.

# La cinetica di aggregazione:

- La fibrillogenesi di  $\beta$ A è un processo di polimerizzazione il cui andamento nel tempo è rappresentato da una curva sigmoide, caratteristica di tutte le cinetiche di aggregazione nucleazione-dipendenti .



# Trattamenti terapeutici

## Trattamenti esistenti:

- ▶ Gli unici farmaci attualmente disponibili non curano l'AD ma possono ritardare lo sviluppo dei sintomi. L'attuale standard di cura per l'AD da lieve a moderata include il trattamento con:
- ▶ inibitori dell'acetilcolinesterasi per migliorare la funzione cognitiva e memantina, un antagonista NMDA.(N-methyl-D-aspartate) L'acetilcolinesterasi gli inibitori includono la galantamina, un alcaloide disponibile commercialmente come Reminyl (Shire), Razadyne (Janssen), rivastigmina (Exelon, Novartis) e donepezil (Aricept, Pfizer) .

## Gli inibitori di fibrillazione/oligomerizzazione

Ci sono stati un gran numero di documenti sugli inibitori delle piccole molecole della fibrillizzazione A $\beta$  (anche inibitori della  $\gamma$ -secretasi),

Ci concentriamo su classi chiave di composti e singoli composti che hanno attirato particolare interesse. L'obiettivo principale è quello degli inibitori della fibrillizzazione A $\beta$ , poiché alcuni composti sono stati sviluppati per inibire la  $\beta$ -secretasi o la  $\gamma$ -secretasi.

## Trattamenti terapeutici

### Gli inibitori di fibrillazione/oligomerizzazione

Diversi studi hanno dimostrato che un certo numero di composti aromatici, molti dei quali sono noti come antiossidanti, sono capaci di influire in modo significativo sulla cinetica di aggregazione dei peptidi  $\beta$ A. Tra questi, abbiamo, la curcumina e l'acido tannico, le tetracicline, la melatonina, le vitamine A, C, E ed il  $\beta$ -carotene e i polifenoli del vino

Le proteine chaperone hanno la capacità di legarsi ad A $\beta$  e di inibire la fibrillizzazione e oligomerizzazione. La piccola proteina da shock termico  $\alpha$ B-cristallina e le proteine correlate come i membri della famiglia  $\alpha$ B-Crystallin, legandosi ad A $\beta$  prevengono la crescita delle fibrille.

## Conclusione

Questa tesi si è concentrata sulle prospettive di un chimico sull ruolo del peptide  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) nel morbo di Alzheimer

Il Morbo di Alzheimer viene oggi definito come un disordine neurodegenerativo progressivo, caratterizzato da perdita di memoria e cambiamenti nella personalità.

La  $\beta$ -amiloide è una proteina normalmente prodotta dalle cellule del nostro cervello a partire dalla proteina precursore della  $\beta$ -amiloide (APP), grazie all'azione delle secretasi, sostanze che tagliano l'APP riducendola in frammenti più piccoli .

L'attenzione è stata focalizzata sul peptide  $\beta$ -amiloide (1-40) (1-42), responsabili del Morbo di Alzheimer, che formano grossi aggregati fibrillari nel parenchima cerebrale, noti come placche senili o placche amiloidi che provocano l'alterazione nella comunicazione tra i neuroni.

Gli unici farmaci attualmente disponibili non curano l'AD ma possono ritardare lo sviluppo dei sintomi.