



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea in Scienze Biologiche**

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2018-2019

**TITOLO TESI (ITALIANO)**

**Il contributo di studi biofisici e strutturali  
sull'autoassemblaggio delle proteine nella progettazione di  
strategie terapeutiche per le patologie amiloidi**

**TITOLO TESI (INGLESE)**

**The contribution of biophysical and structural studies of  
protein self-assembly to the design of therapeutic strategies  
for amyloid**

Tesi di Laurea di:

Lucia Pacilli

Docente Referente di:

Chiar.mo Prof.

Paolo Mariani

## Riassunto

Molti disturbi neurodegenerativi, tra cui l'Alzheimer, il Parkinson e le malattie da prioni, sono caratterizzati da un ripiegamento conformazionale di proteine o peptidi normalmente solubili in specie patologiche, a causa di un processo di mal ripiegamento e autoassemblaggio che porta in definitiva alla formazione di fibrille amiloidi. Studi recenti supportano l'idea che durante questi processi vengano generate più specie intermedie con un'ampia varietà di gradi di tossicità neuronale. Lo sviluppo di un elevato livello di conoscenza della natura e della struttura delle specie patogene amiloidi migliorerebbe in modo significativo gli sforzi per sottolineare le origini molecolari di questi disturbi e anche per sviluppare diagnosi accurate e interventi terapeutici efficaci per questi tipi di condizioni. In questo lavoro vengono discusse recenti informazioni biofisiche e strutturali riguardanti diversi tipi di aggregati amiloidi e il modo in cui queste informazioni possono indirizzare ad approcci terapeutici mirati a colpire specifici eventi patogeni che si verificano durante lo sviluppo di queste malattie altamente debilitanti e sempre più comuni.

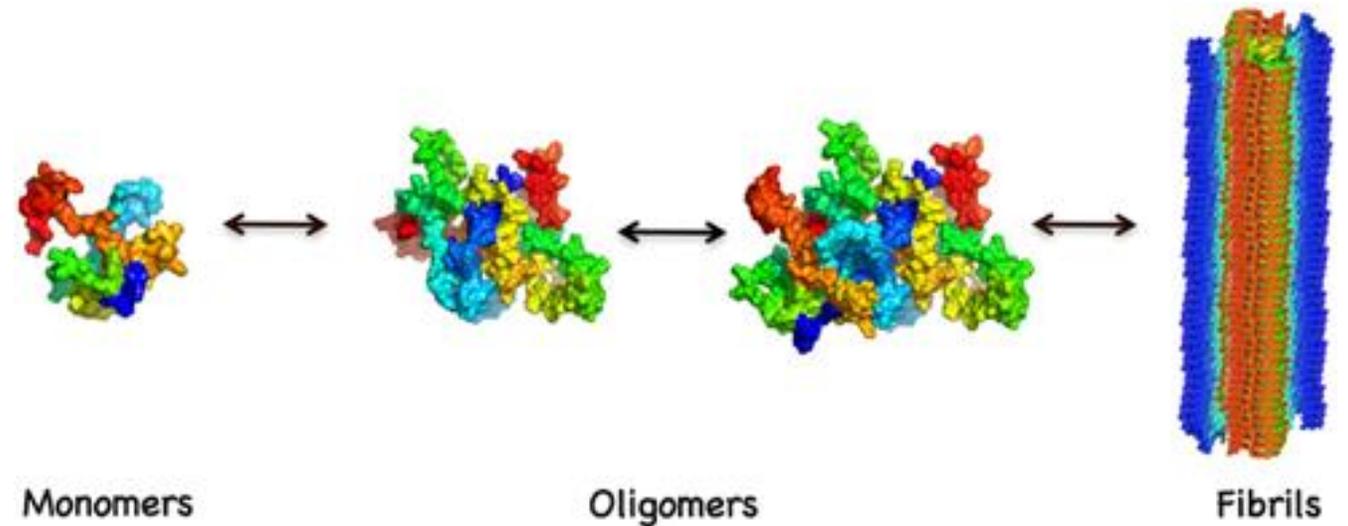
## Bibliografia

Nunilo Cremades, Christopher M. Dobson, 2018, *The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases*. *Neurobiology of Disease*,109,178-190

# Cosa sono le fibrille amiloidi?

---

- ❖ Le fibrille amiloidi sono strutture filiformi composte da protofilamenti e caratterizzate da una comune architettura secondaria cross- $\beta$ .
- ❖ Si formano a partire da monomeri o oligomeri mal ripiegati che non vengono eliminati dal sistema proteosoma-ubiquitina.
- ❖ La mancata eliminazione di queste proteine genera l'accumulo di fibrille amiloidi e causa di patologie che prendono il nome di amiloidosi.



# Cosa causano?

---

1) AMILOIDOSI SISTEMICHE: gruppo di circa trenta malattie causate dall'accumulo di sostanza amiloide che si deposita nei vari organi, anche in quelli vitali, danneggiandoli. La patogenicità è associata alla perdita di funzione delle proteine che si aggregano e c'è correlazione tra entità di accumulo di inclusioni proteiche e severità di sintomi associati alla malattia.

2) ALTRE MALATTIE AMILOIDI/ GRAN PARTE DISTURBI NEURODEGENERATIVI: gruppo particolare di proteine amiloidi ( $\beta$ A,  $\alpha$ S, PrP ...) coinvolte in disturbi neurodegenerativi (Alzheimer, Niemann-Pick, Parkinson, ... ). Diverse forme di proteine aggregate possono dare origine alla neurodegenerazione. Manca diretta correlazione tra entità di accumulo di inclusioni proteiche e severità dei sintomi associati alla malattia.

# FORMAZIONI AMILOIDI E DISTURBI NEURODEGENERATIVI

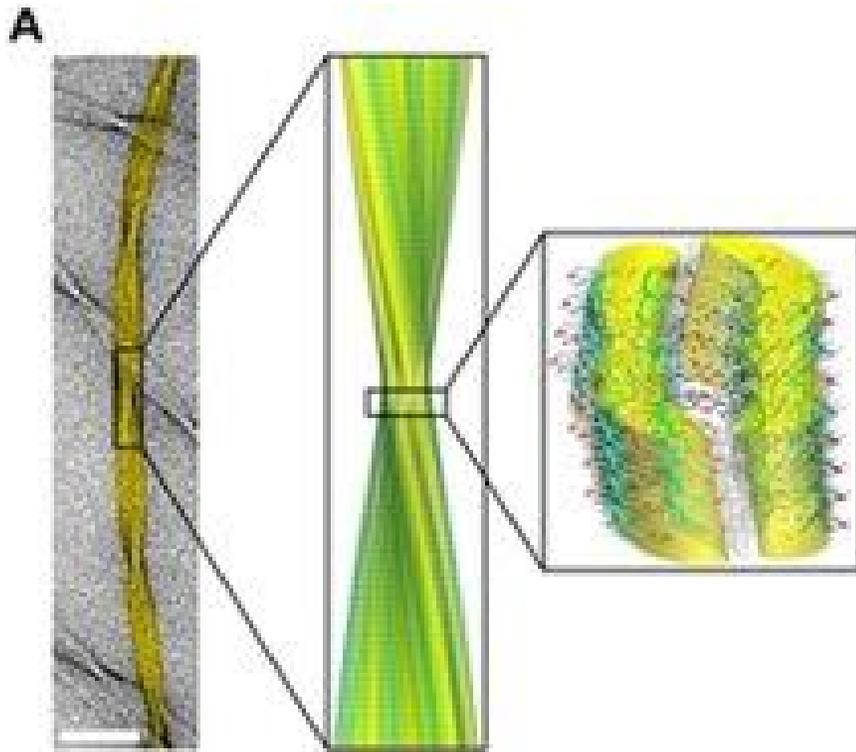
---

**IPOTESI DELLA CASCATA AMILOIDE:** fu avanzata negli anni '90 e attribuisce l'origine primaria della patogenesi dell'Alzheimer (AD) alla formazione e all'accumulo di aggregati amiloidi fibrillari; l'accumulo di betamiloide ( $A\beta$ ) in forma fibrillare a livello delle placche danneggia i neuroni. Basata su studi in cui si confronta l'effetto delle fibrille rispetto ai monomeri e si evince che i monomeri non sono tossici al contrario delle fibrille.

**CRITICHE ALL'IPOTESI DELLA CASCATA AMILOIDE:** studi su topi transgenici dimostrano che i deficit funzionali (perdita della memoria), deficit cognitivi e deficit di apprendimento non sono correlati temporalmente e quantitativamente con la formazione delle placche e quindi con l'accumulo di forme fibrillari di  $A\beta$ . Oltre alle forme fibrillari potrebbero essere patogeni anche piccoli oligomeri solubili e protofibrille, cioè le forme precedenti alla aggregazione in forma fibrillare. L'effetto tossico degli oligomeri precederebbe quello delle fibrille responsabili della morte cellulare e coincidente con la formazione delle placche.

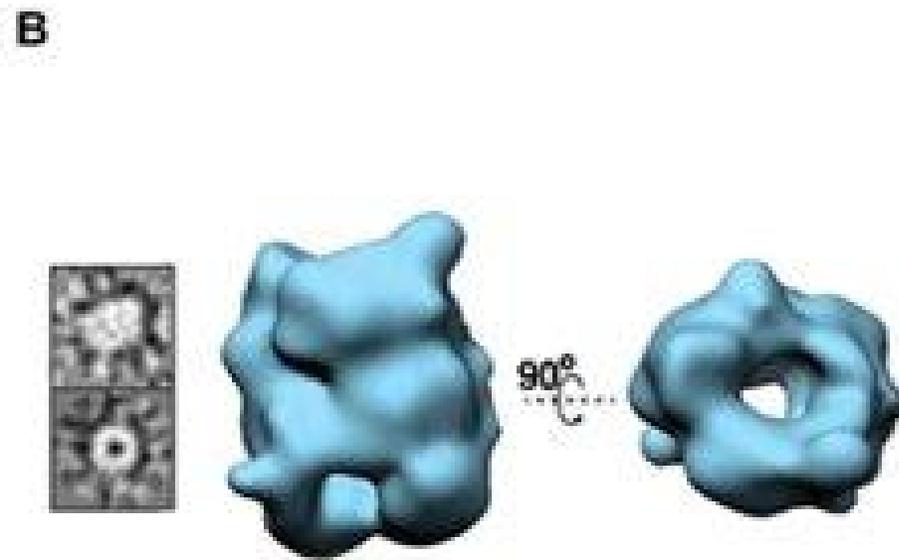
Diverse prove sostengono questa versione:

- Forme oligomeriche di aggregati amiloidi sono state trovate nel cervello e nei tessuti di pazienti che soffrono di disturbi neurodegenerativi
- Perdita di sinapsi correlata a un aumento di oligomeri solubili (animali transgenici)
- Anticorpi anti-oligomeri possono eliminare i deficit di memoria nei modelli animali senza avere alcun effetto sulle placche
- Studi in vivo hanno evidenziato che esistono due classi principali di  $A\beta$  oligomeri: la prima è caratterizzata da oligomeri che hanno una struttura  $\beta$ -sheet parallela che rimane confinata nelle vicinanze delle placche e non compromette significativamente le capacità cognitive, l'altra da una struttura  $\beta$ -sheet antiparallela che si forma prima che le placche siano osservate e ha potenziale maggiore a causare disfunzione neuronale.



### A) ESEMPIO DELLA STRUTTURA DI UNA FIBRILLA AMILOIDE.

L'architettura strutturale mostrata in giallo è uno dei polimorfismi di un frammento della proteina transtiretina; rappresenta la struttura atomica e l'assemblaggio gerarchico di una fibrilla amiloide cross- $\beta$ . Queste fibrille sono costituite da tre protofilamenti, ognuno dei quali è formato da coppie di di protofilamenti cross- $\beta$ . Ogni protofilamento è composto da coppie di  $\beta$ -sheet che interagiscono tra loro attraverso specifiche interazioni mediate dall'acqua e stabilite tra le catene laterali dei residui del peptide che formano il nucleo della fibrilla.



### B) STRUTTURA DI UN TIPO DI OLIGOMERO AMILOIDE TOSSICO.

Ricostruzione tridimensionale di una forma oligomerica tossica di  $\alpha$ S. Sono state utilizzate diverse procedure per isolare le forme oligomeriche  $\alpha$ S: le informazioni accumulate finora indicano che specie oligomeriche formate da proteine e polipeptidi in condizioni diverse hanno un grado di somiglianza notevolmente elevato in termini fisico-chimici, proprietà strutturali e tossiche.

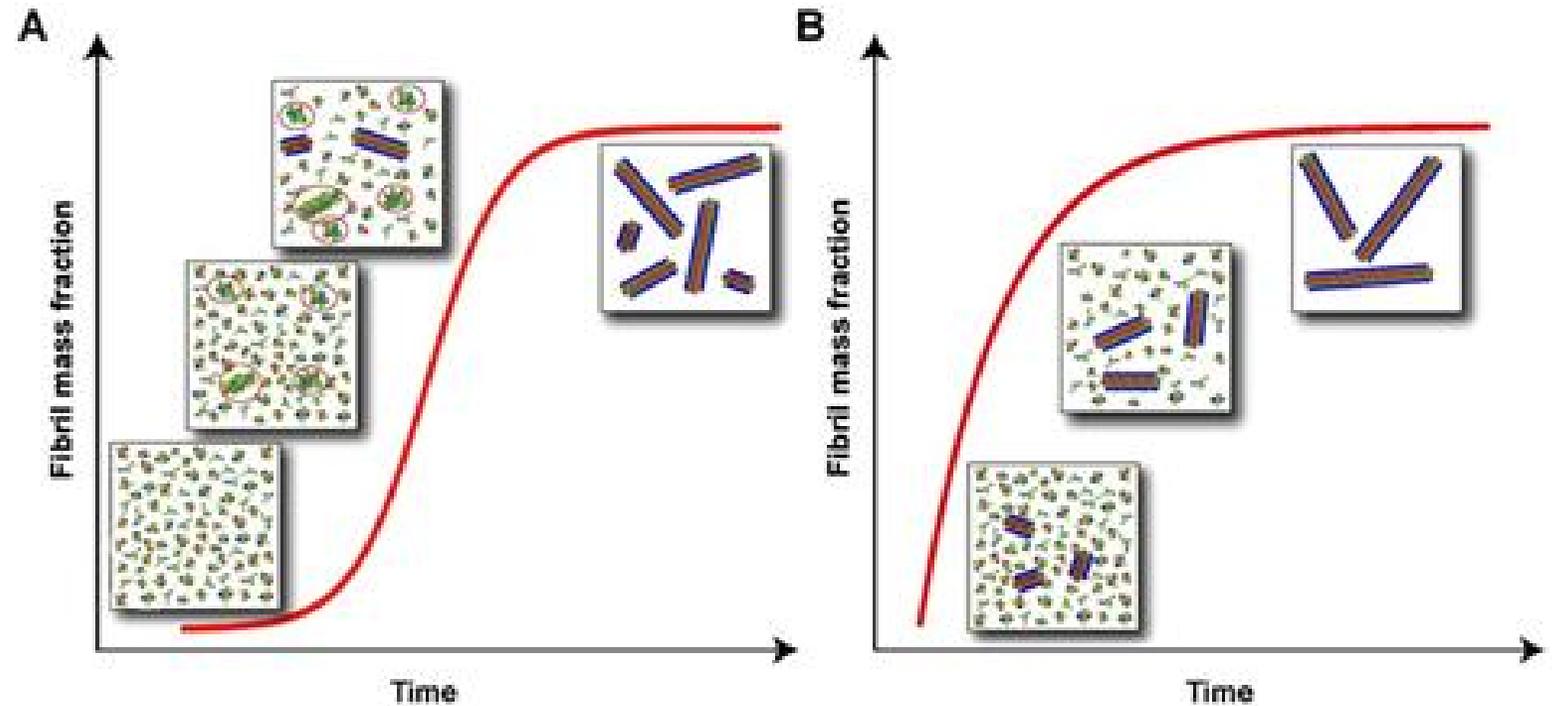
# CINETICA DI AGGREGAZIONE

La cinetica di formazione degli aggregati amiloidi è caratterizzata da due parametri chiave:

- Velocità di nucleazione
- Velocità di allungamento degli aggregati fibrillari

Si possono distinguere tre diverse fasi:

1. **FASE INIZIALE DI NUCLEAZIONE:** non si osserva aggregazione ma ha inizio il processo, entropicamente sfavorito, di associazione di monomeri liberi che procede fino alla formazione di oligomeri di dimensioni variabili che favoriscono il processo di aggregazione.
2. **POLIMERIZZAZIONE:** si formano aggregati stabili con morfologia fibrillare (protofibrille). Si osserva una rapida fase di crescita.
3. **PLATEAU:** formazione di fibrille mature stabili



A) **PROCESSI DI NUCLEAZIONE PRIMARIA:** si formano nuovi aggregati a una velocità ridotta partire da monomeri. L'andamento è rappresentato da una curva sigmoide.

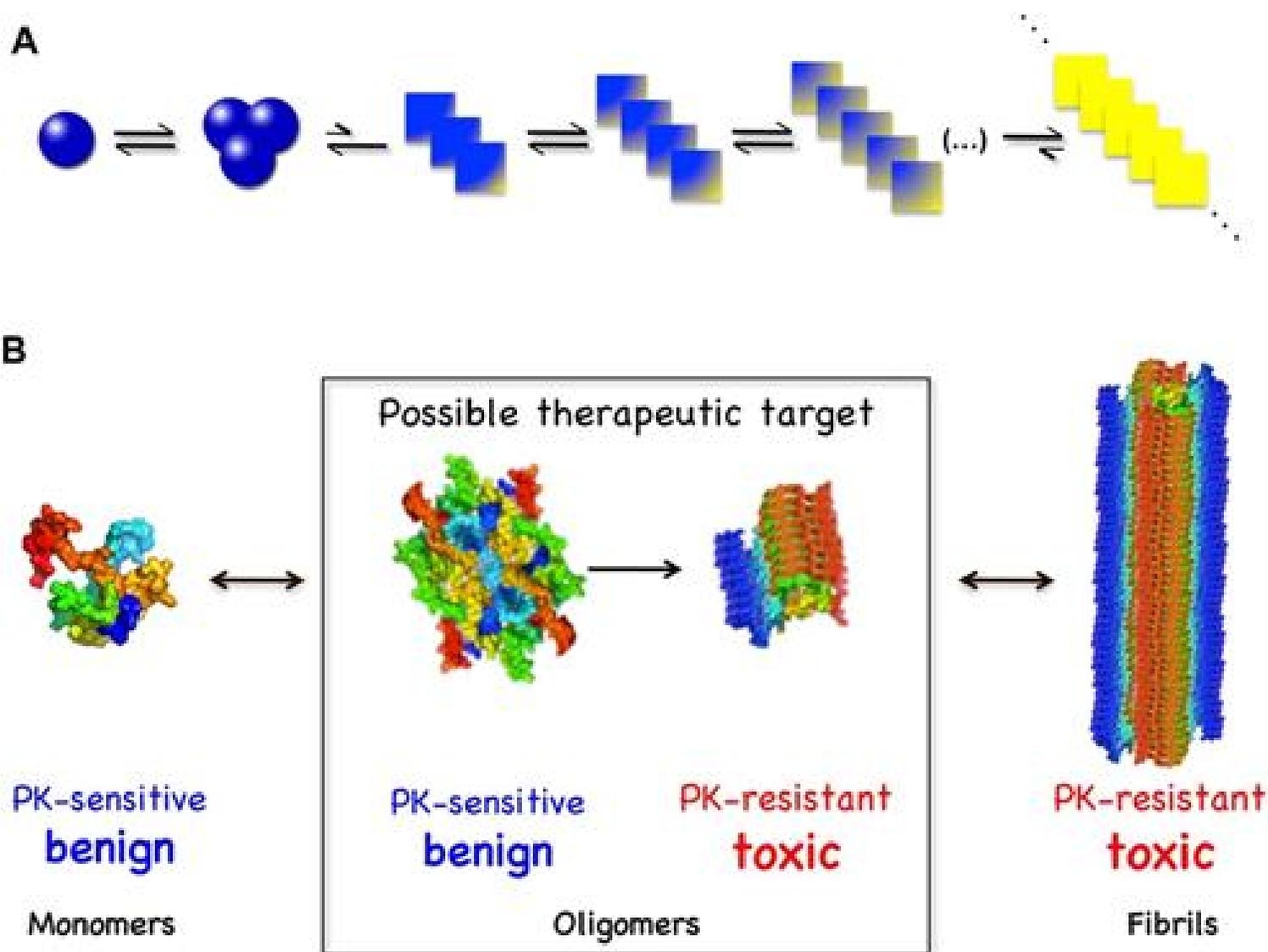
B) **FORMAZIONE DI NUOVI AGGREGATI A PARTIRE DA FIBRILLE PREESISTENTI:** la fase di nucleazione primaria è assente e i nuovi aggregati si formano a una velocità dipendente dalla concentrazione delle fibrille. Il profilo di aggregazione segue una singola funzione esponenziale.

❖ Le diverse curve di aggregazione sono conseguenza del tasso più lento (più alta barriera energetica) della nucleazione primaria rispetto all'aggiunta di monomeri su una fibrilla preesistente

A ) Modello di nucleazione-conversione per l'acquisizione della struttura amiloide durante il processo di autoassemblaggio di  $\alpha$ S. I monomeri di  $\alpha$ S (intrinsecamente disordinati) si uniscono inizialmente a formare oligomeri in gran parte disordinati (unità monomeriche rappresentate dalle sfere) che, dopo essere aumentate di dimensioni, iniziano ad acquisire la struttura cross- $\beta$  (raffigurata dai quadrati). La struttura intrinsecamente disordinata è raffigurata in blu e la struttura  $\beta$ -sheet è raffigurata in giallo. L'estensione della struttura  $\beta$ -sheet in questi oligomeri aumenta gradualmente fino a quando forma la struttura cross- $\beta$  e quindi acquisisce la caratteristica struttura fibrillare. Questo processo genera una serie continua di specie oligomeriche con dimensioni e contenuto di fogli  $\beta$  diversi ma tutti con la caratteristica struttura architettónica amiloide.

B ) Rappresentazione delle principali specie  $\alpha$ S osservate durante la formazione di fibrille da esperimenti di fluorescenza a molecola singola. Questi studi suggeriscono che gli oligomeri inizialmente formati sono in gran parte disordinati e benigni. Successivamente, attraverso una serie di riorganizzazioni strutturali, si convertono lentamente in specie più stabili, caratterizzati da un'estesa struttura  $\beta$ -sheet e altamente tossiche.

❖ Possibili strategie terapeutiche potrebbero inibire la conversione dagli oligomeri disordinati alle strutture  $\beta$ -sheet prevenendo quindi la loro conversione in oligomeri amiloidi tossici.



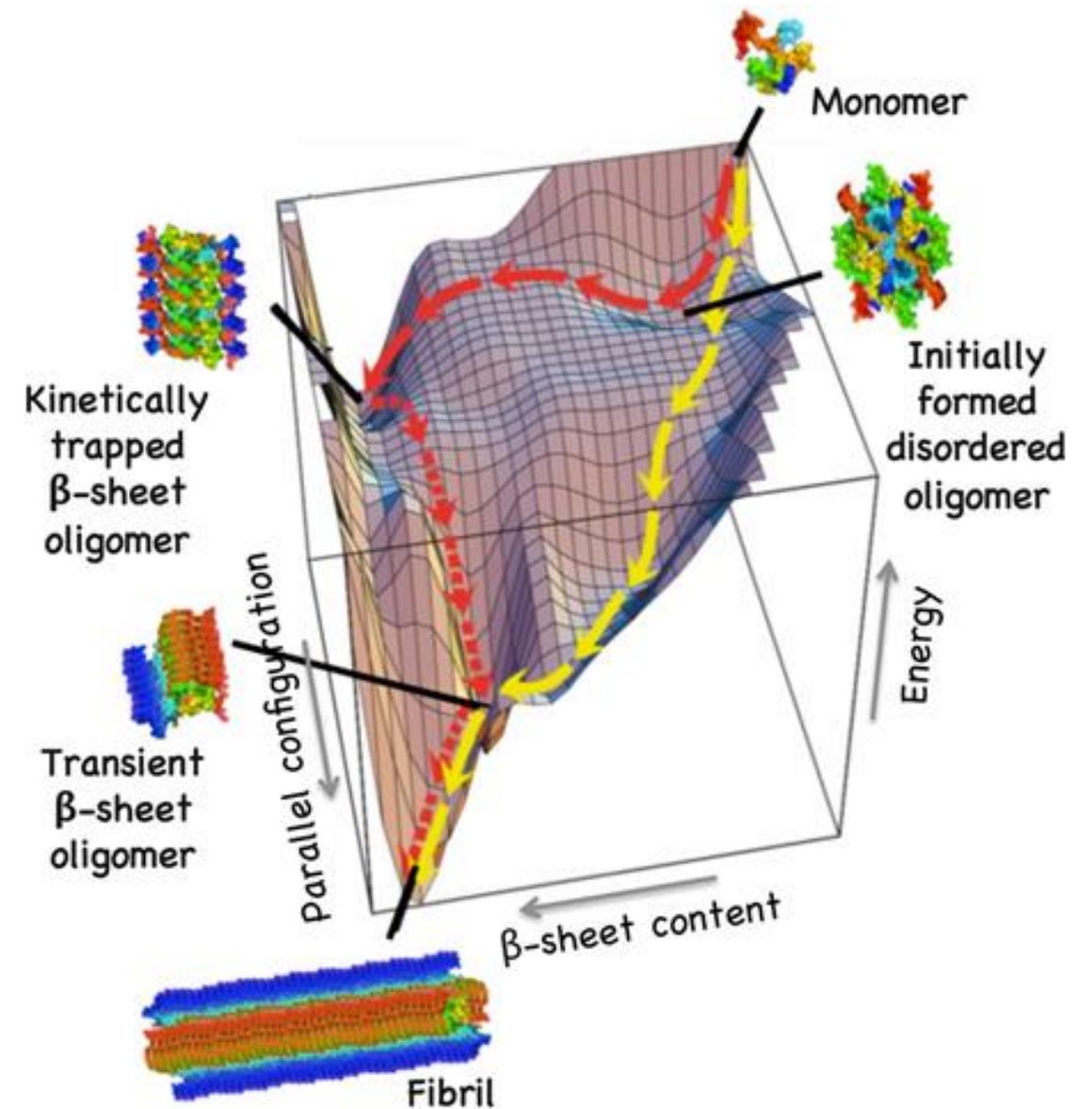
L'aggregazione amiloide può avvenire mediante percorsi multipli in cui sono coinvolte distinte specie oligomeriche.

Da questi percorsi si possono formare:

- specie oligomeriche transitorie che si allungano rapidamente e si convertono in fibrille
- Specie oligomeriche cineticamente intrappolate che si accumulano; presentano una configurazione strutturale non ottimale per l'allungamento che potrebbe trasformarsi in fibrille solo dopo riarrangiamenti strutturali.

Saggi immunologici e radiochimici hanno confermato l'idea che la polimerizzazione genera una serie di intermedi a vita breve che formano le protofibrille; le protofibrille agiscono da fulcri per la crescita di fibrille mature. È stato osservato inoltre che le caratteristiche strutturali degli oligomeri vengono riprodotte nelle fibrille in crescita. Si suppone che questa attività auto propagante sia presente nella maggior parte delle proteine amiloidi e che sia conseguenza ultima della struttura a cross- $\beta$ .

Questo processo di nucleazione e propagazione è stato proposto come punto di partenza attraverso il quale la proteina prionica mal ripiegata funge da agente di propagazione delle malattie da prioni e probabilmente anche delle altre malattie amiloidogeniche.



# CONCLUSIONI E POSSIBILI STRATEGIE TERAPEUTICHE

---

- ❖ La geometria  $\beta$ -sheet e la diversa velocità di nucleazione possono giocare un ruolo importante nel processo di misfolding e autoassemblaggio delle proteine amiloidi, determinando la stabilità cinetica e la potenziale tossicità delle differenti forme di aggregati.
- ❖ Gli oligomeri amiloidi possono formare diverse strutture a seconda di vari processi che avvengono durante le prime fasi del processo di autoassemblaggio e diversi oligomeri possono formare diversi tipi di tossine. Le diverse fasi di assemblaggio associate a quelle di ripiegamento si traducono in un insieme di oligomeri con differenti arrangiamenti  $\beta$ -sheet, tassi di allungamento e tossicità che possono generare specie con ruoli patologici differenti e che dipendono dai processi random che si verificano durante il processo di autoassemblaggio.
- ❖ L'immunoterapia con antibiotici contro una specifica proteina amiloide è stata suggerita come potenziale trattamento terapeutico per le malattie amiloidi. L'obiettivo dell'immunoterapia è quello di ridurre i livelli di aggregati amiloidi tossici o di impedire agli aggregati amiloidi tossici di entrare nelle cellule e diffondersi in nuove regioni. Nei modelli di topo l'immunizzazione passiva riduce il carico amiloide cerebrale e mitiga la neurodegenerazione.

PRINCIPALI PROBLEMI: gli anticorpi utilizzati fin ora non discriminano tra i diversi tipi di aggregati proteici e il legame antibiotico-proteina potrebbe perturbare la funzione della proteina stessa.

Gli obiettivi futuri mirano allo sviluppo di immunoterapie in grado di colpire selettivamente le specie amiloidi più tossiche