



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

**Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE**

TITOLO TESI (Italiano)

IL LEGAME DELLA GLICOPROTEINA α 1-ACIDA ALLA MEMBRANA COMPORTA UN
PARTICOLARE CAMBIAMENTO STRUTTURALE CON RILASCIO DEL LIGANDO

TITOLO TESI (Inglese)

BINDING OF α 1-ACID GLYCOPROTEIN TO MEMBRANE RESULTS IN A UNIQUE STRUCTURAL
CHANGE AND LIGAND RELEASE

Tesi di Laurea di:

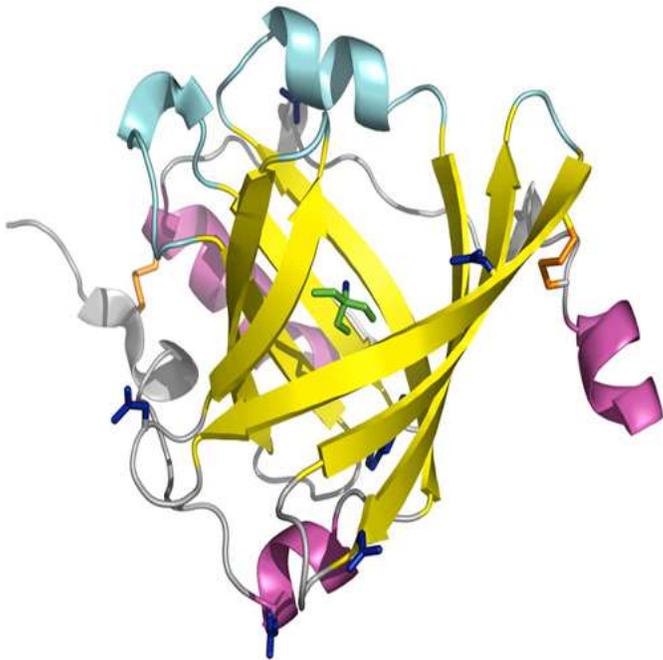
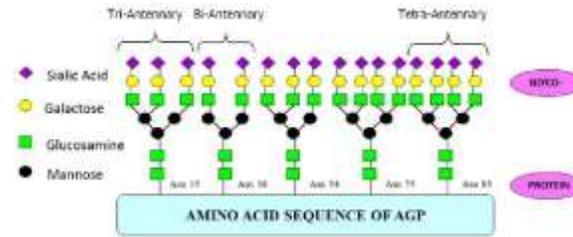
GRIFONE CESARE

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

SCIRE' ANDREA ANTONINO

Sessione STRAORDINARIA

Anno Accademico 2018/2019



L'alfa 1-glicoproteina acida è una proteina secreta dal fegato, composta da 183 residui amminoacidici e 5 catene di carboidrato con 2 ponti disolfuro (40% del peso totale della proteina), si lega bene a ligandi basici e neutri come l'ormone progesterone. L'AGP ha una conformazione B-foglietto in soluzione acquosa, ma è stato osservato che si trova associato alla superficie delle membrane di granulociti, monociti e linfociti e l'interazione con la membrana influenza eventi intracellulari. L'interazione con le membrane (anionici o neutri fosfolipidi) sembra dovuto ad un cambio strutturale della proteina con una transizione da b-foglietto ad a-elica e una riduzione della capacità di legame per il ligando con conseguente rilascio del ligando dovuta ad una minore affinità (transizione dovuta a interazioni elettrostatiche e cambiamenti locali di pH). La comprensione del processo è molto utile per capire la farmacocinetica dei ligandi dell'AGP e le funzioni di essa.

- Vengono preparati vari buffer a diversi ph (4.5-5.5 e 6.0-7.4) e liposomi unicellulari con fosfolipidi con diversa carica (PG,PS,PE,PC).
- Si effettuano misure per vedere il cambio di struttura, analizzando lo spettro dato dal metodo del dicroismo circolare e analisi allo spettrofotometro per valutare l'emissione di TRP e ANS (ANS per valutare le zone idrofobiche generalmente nelle parti interne delle proteine che si trovano in soluzioni acquose).
- Si esegue un esperimento di centrifugazione con AGP e liposomi unilamellari.
- Attraverso il metodo dell'ultrafiltrazione con successivo HPLC si quantifica la quantità di progesterone legato all'AGP dopo aver saturato i liposomi.

Risultati

Si osserva l'effetto del cambiamento del pH sulla struttura dell'AGP dato che esso è inferiore vicino le membrane, dovuto al potenziale elettrico, ciò comporterebbe l'interazione tra le proteine e le membrane. Tramite i risultati ottenuti dagli spettri del dicroismo circolare notiamo che la struttura terziaria è cambiata leggermente, ma la secondaria non ha subito cambiamenti al variare del pH.

Mechanism for AGP-Mediated Drug Transport

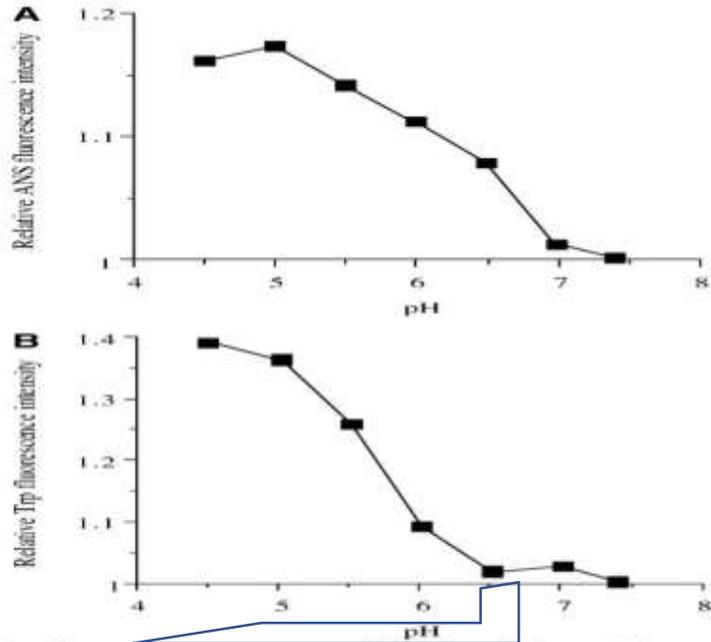
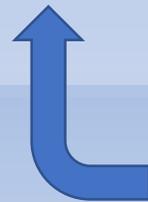


FIGURE 2: Fluorescence spectra of ANS and Trp residues at various pHs. AGP was dissolved at 10 μ M in the appropriate buffers, and ANS was added to a final concentration of 20 μ M (2:1 molar ratio of ANS to AGP). ANS: excitation wavelength, 380 nm; Trp: excitation wavelength, 280 nm.



Aggiungendo i risultati ottenuti tramite l'osservazione delle fluorescenze del Trp e ANS, si nota che esse aumentano al diminuire del PH, dimostrano che l'AGP ha un'unica struttura in condizioni di media acidità anche sulla superficie delle membrane in assenza di interazioni dirette con esse.

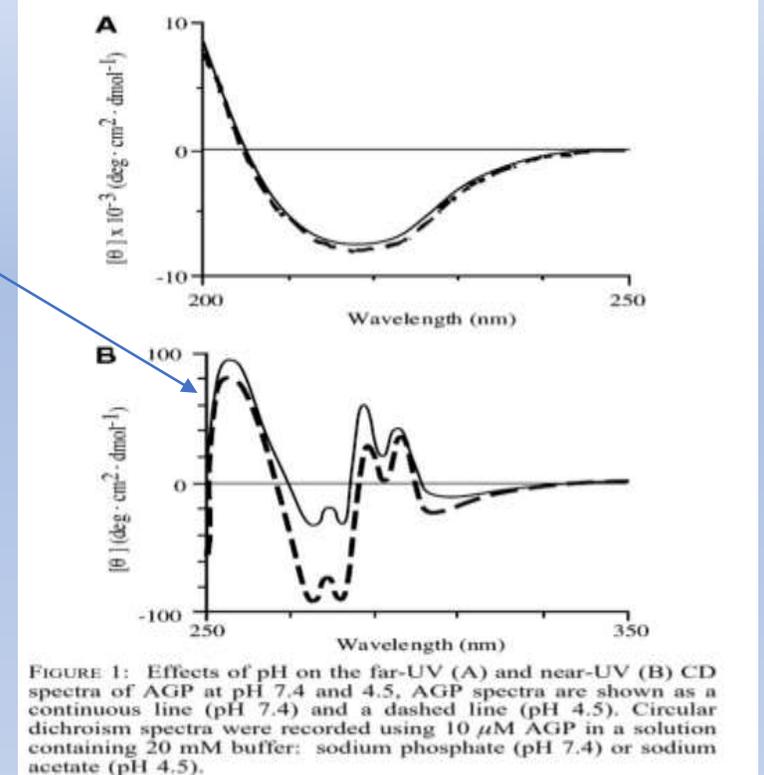


FIGURE 1: Effects of pH on the far-UV (A) and near-UV (B) CD spectra of AGP at pH 7.4 and 4.5. AGP spectra are shown as a continuous line (pH 7.4) and a dashed line (pH 4.5). Circular dichroism spectra were recorded using 10 μ M AGP in a solution containing 20 mM buffer: sodium phosphate (pH 7.4) or sodium acetate (pH 4.5).

Come detto in precedenza l'esterno delle membrane ha carica negativa in aggiunta alle lievi condizioni acide, noi dimostriamo che il legame dell'AGP alle membrane è dovuto a questi fattori elettrostatici di cariche negative.

Analizzando il legame dell'AGP al fosfolipide PG e al fosfolipide PC a vari ph (da 4.5 a 7.4), si nota che l'AGP si lega fortemente alle membrane con PG tra valori di ph 4.5-5.5, mentre non si ottiene lo stesso risultato con membrana neutra PC ad ogni valore di PH.

Come ulteriore prova a conferma delle interazioni elettrostatiche, esaminiamo gli effetti dell'aggiunta di NaCl con l'AGP legato alle membrane PG a ph 4.5. L'NaCl inibisce il legame in maniera concentrazione dipendente.

Si esegue un esperimento con varie tipologie di membrane aventi fosfolipidi differenti per carica dal PG al PC (PG>PS>PE>PC) per osservare la quantità di AGP legante le varie membrane, notando che la quantità di essa diminuisce con il diminuire della carica delle membrane.

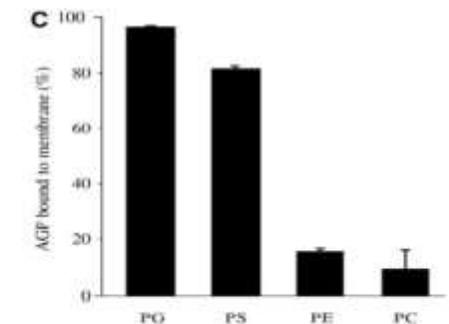
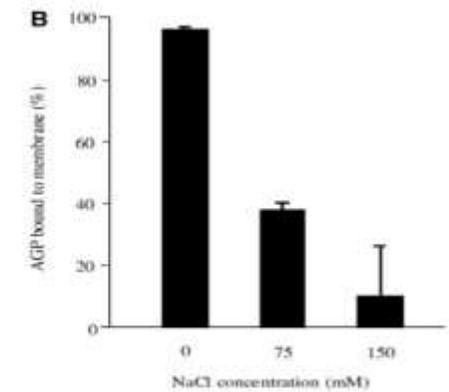
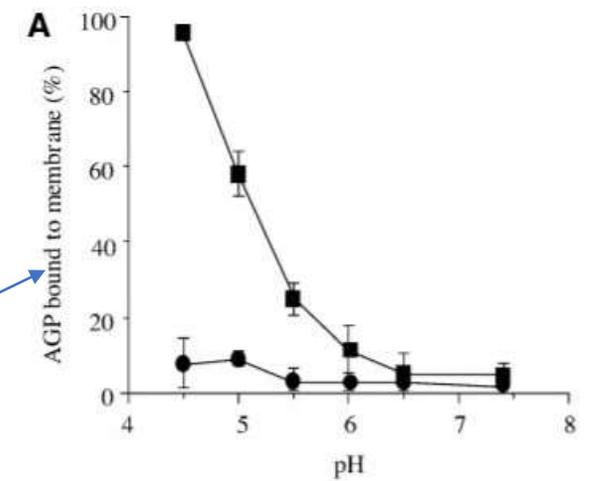


FIGURE 3: Interaction mode of AGP—membrane binding. (A) pH dependence of AGP binding to the membrane [PC (●), PG (■)]. (B) Effect of NaCl on the binding of AGP to the membrane. (C) Binding of AGP to the membrane made from other phospholipids. Experiments were performed using 10 μ M AGP in solutions containing 20 mM buffers as described in Materials and Methods. Phospholipid vesicles were prepared at 400 μ M.

Nel caso del legame AGP-PG l'intensità della fluorescenza del triptofano aumenta con il decremento di ph, ciò suggerisce che i leggeri cambiamenti nella conformazione dell'AGP guiderebbero l'interazione con la membrana, dovuta ad interazioni elettrostatiche.

Notiamo che l'AGP ha un valore di $[\theta]$ di 222nm a PH 4.5 e indica una conformazione ad alfa-elica.

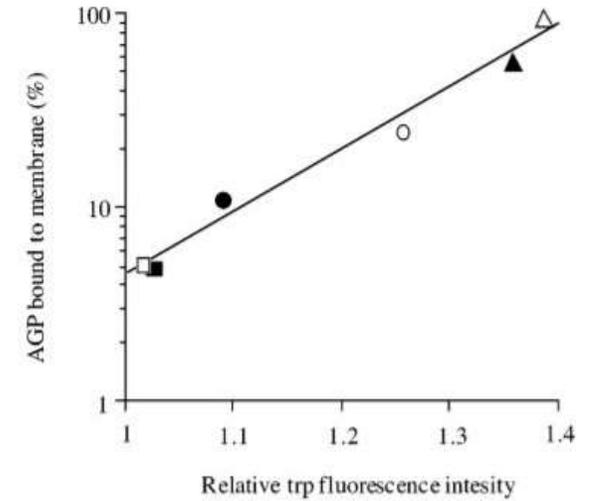
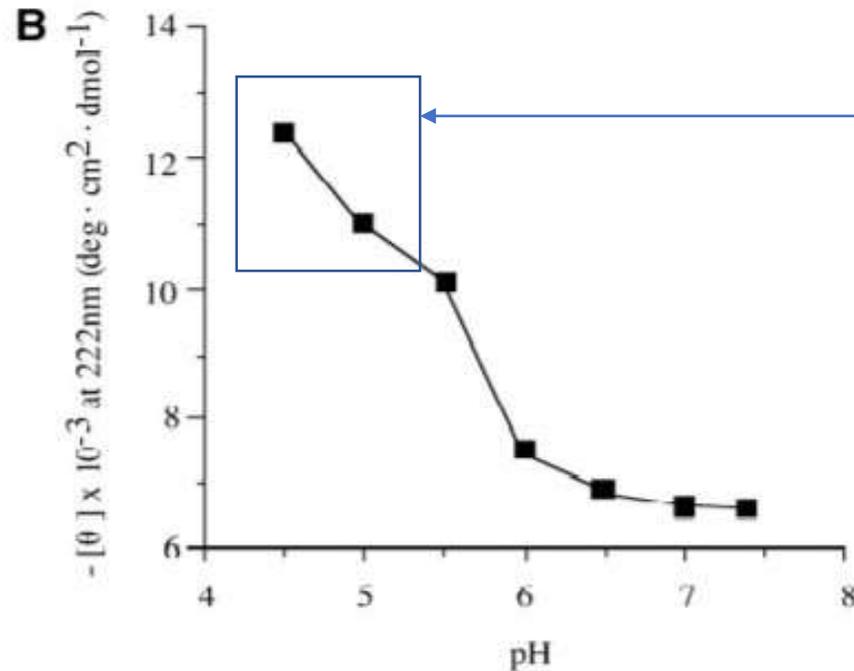
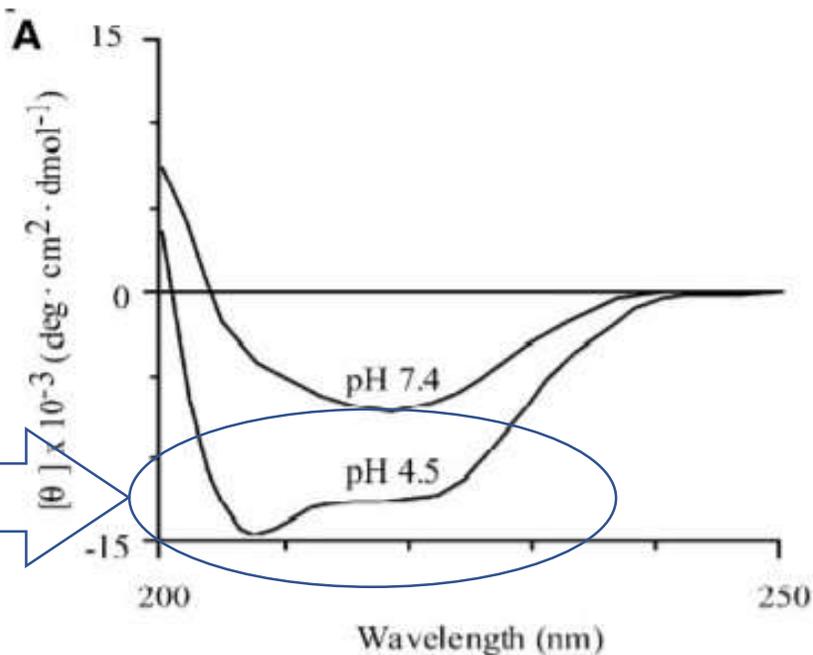


FIGURE 4: Correlation between AGP-membrane interaction and Trp residues of the AGP environment under mild acidic conditions. Each symbol represents the following pH: (■) 7.0, (□) 6.5, (●) 6.0, (○) 5.5, (▲) 5.0, and (△) 4.5.



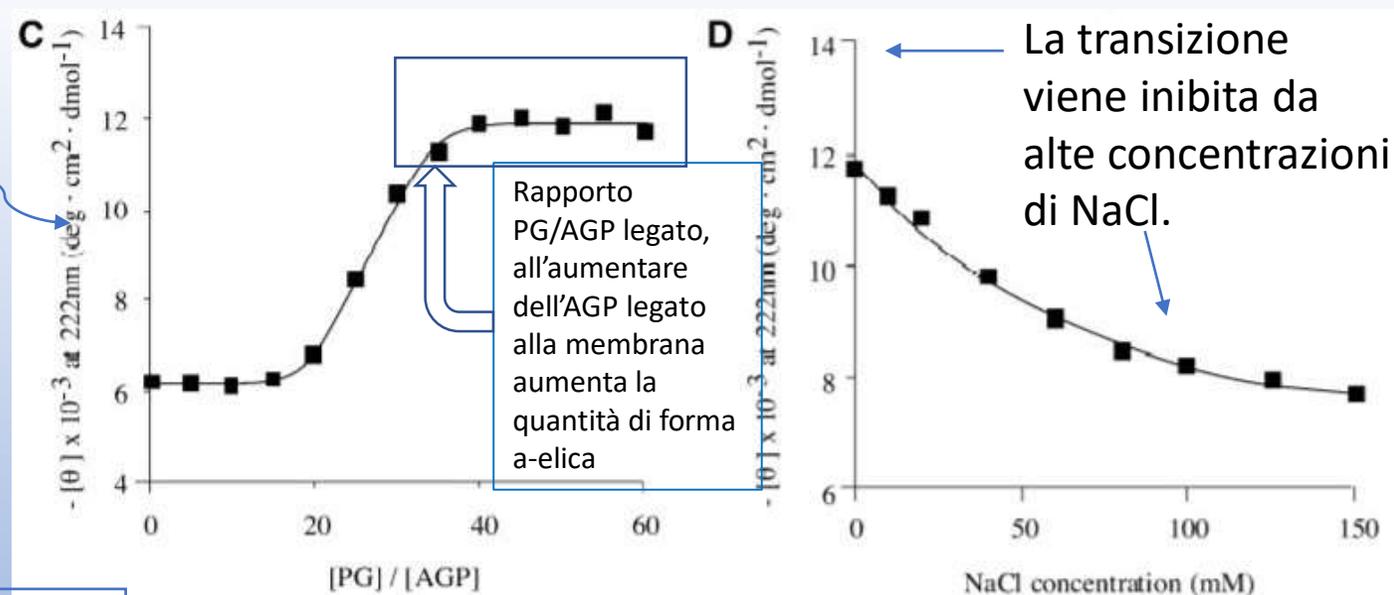
Si osserva dal grafico che quando l'AGP è soggetto a cambiamenti di PH in presenza di PG-membrana cambia struttura secondaria passando da beta-foglietto ad alfa-elica

La quantità di AGP che shifta forma è dipendente dalla concentrazione di PG.

I risultati ottenuti indicano che la transizione avviene all'inizio o durante il legame dell'AGP alle membrane.

L'affinità con il progesterone in assenza di membrane rimane pressochè invariato con il variare del ph.

I risultati indicano che la capacità di legame dell'AGP il ligando (es. progesterone) è fortemente influenzato dall'interazione con le PG-membrane, ma non è affetta dalle lievi condizioni acide.



Mechanism for AGP-Mediated Drug Transport

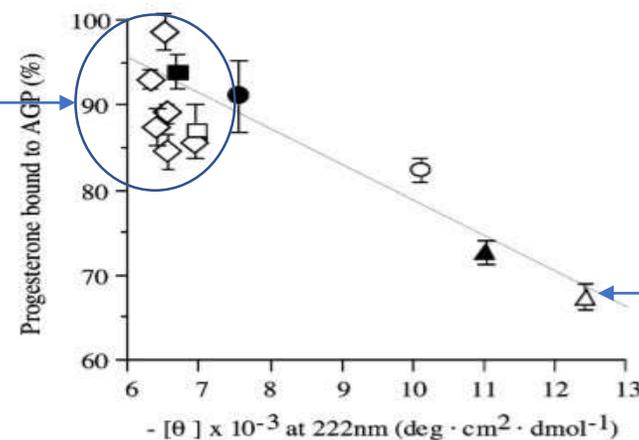


FIGURE 6: Binding of progesterone to AGP interacting with the membrane. AGP and PG concentrations were set at 10 and 400 μ M, respectively. AGP-progesterone-binding experiments in the presence of liposomes were performed at a final progesterone concentration of 10 μ M (1:1 molar ratio of progesterone to AGP) after liposomes were saturated in progesterone. The experiment was performed in a solution containing 20 mM appropriate buffer. Each symbol represents the following pH: (■) 7.0, (□) 6.5, (●) 6.0, (○) 5.5, (▲) 5.0, (△) 4.5, and (◇) 7.0-4.5 in the absence of PG-membrane.

l'associazione alla membrana comporta un decremento dell'affinità per il progesterone, con l'abbassarsi del ph, contemporanea mente un aumento della struttura alfa-elica

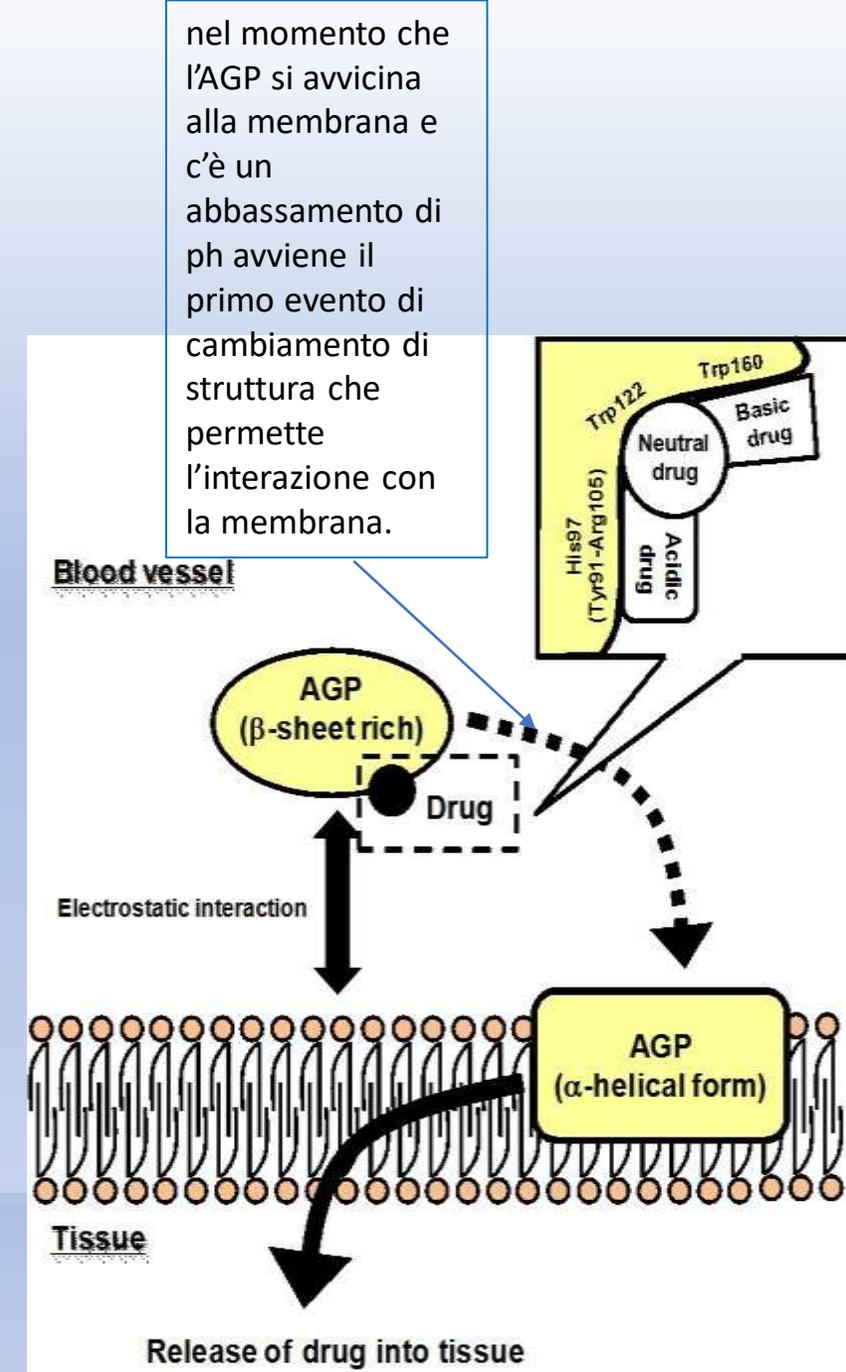
L'ipotesi che l'assunzione (trasporto della sostanza nella cellula) del farmaco dipenda dalla concentrazione di sostanza non legata alle proteine, quindi libera, è ampiamente accettata, anche se il meccanismo di legame e rilascio dei ligandi dell'AGP e albumina è molto più efficiente del modello proposto. Una spiegazione per questo fenomeno è che la proteina carrier (es AGP) cambia struttura con l'interazione della superficie cellulare e il ligando viene rilasciato contemporaneamente al cambio strutturale. L'idea è supportata dai dati ottenuti per l'albumina che subisce cambiamenti strutturali quando interagisce con gli epatociti.

Dai dati ottenuti notiamo che l'AGP subisce cambiamenti nella struttura secondaria in lievi condizioni acide e quando si interfaccia con le membrane anioniche come il PG, ciò dovuto ad abbassamenti di pH di 1.6-2.7 unità dal pH della soluzione acquosa. Abbassamenti dovuti alla carica della membrana e al potenziale elettrico delle cellule.

Inoltre in assenza di interazioni con le membrane, la capacità di legare il ligando rimane invariata con il variare del pH, cambia leggermente la struttura terziaria, ma rimane invariata la secondaria.

È comune in molte proteine che il variare del pH comporta cambiamenti strutturali significativi perché permettono il rilascio del ligando o la fusione con la membrana. Esempio la transferrina, passando dal circolo sanguigno a pH neutro all'interno della cellula a pH acido porta ad un'apertura della struttura proteica con rilascio di ferro.

Quindi il leggero cambiamento nella struttura terziaria dell'AGP in presenza di lievi condizioni acide potrebbe avviare gli eventi quali il legame alla membrana cellulare e i cambiamenti di struttura che sono stati descritti precedentemente.



Risultati ottenuti sulla fluorescenza del TRP e ANS suggeriscono che l'interazione dell'AGP con la membrana sotto lievi condizioni acide potrebbe promuovere il leggero cambiamento strutturale, ma non una grande esposizione delle catene idrofobiche.

Nel caso dell'Asialo-AGP e la sua capacità di legame con la membrana si nota un decremento di affinità rispetto all'AGP a pH 4.5. ciò è dovuto a un incremento della stabilità conformazionale dell'Asialo-AGP. Rimuovendo i residui di acido sialico non c'è stato un significativo impatto sul core proteico.

I risultati indicano che le catene di acido sialico influenzano l'orientamento dell'AGP sulle membrane contenente PG e presentare il sito di legame ad esse. È probabile che gli eventi che osserviamo sull'AGP coinvolgono residui che sono presenti o strettamente associati alla membrana.

Come viene metabolizzato l'AGP e le varianti di AGP prodotte.

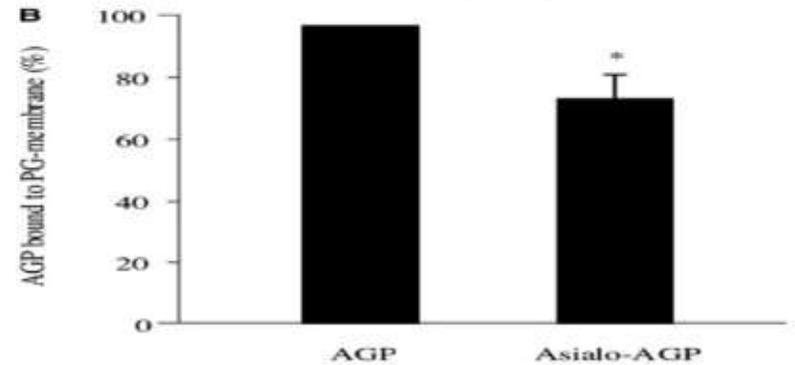
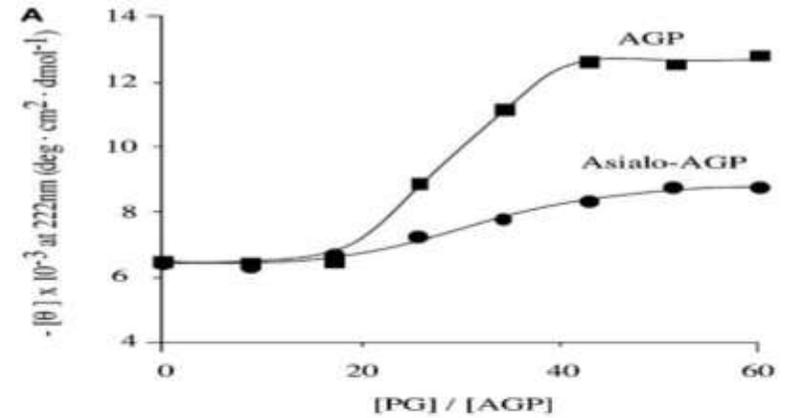
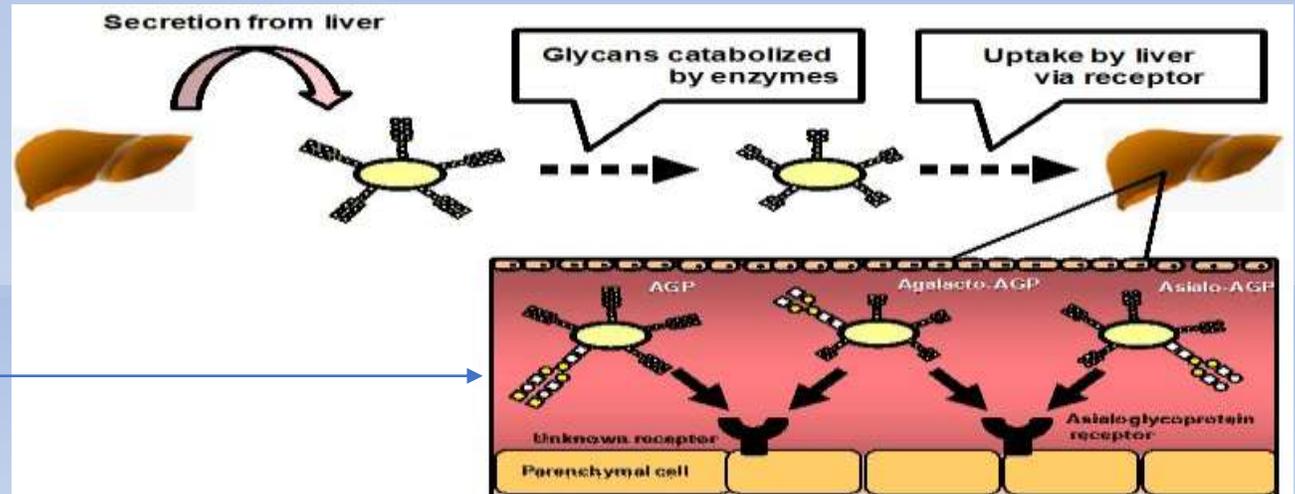


FIGURE 7: Effect of sialic acid on the interaction between AGP and PG-membrane. The degree of conformational transition of AGP (■) and asialo-AGP (●) interacting with PG-membrane (A) and the binding of AGP and asialo-AGP to PG-membrane (B) were monitored as in Figures 3 and 5.



In numerose proteine l'inserzione nelle membrane sembrerebbe indurre una transizione ad α -elica, nel caso dell'AGP l'area di ligando potrebbe coinvolgere regioni che formano un α -elica e sono inserite nella membrana, dato che la fluorescenza del triptofano shifta a blu in presenza di membrane-PG.

L'AGP in soluzioni di alcool idrofobo (propanolo, metanolo ecc.) cambia struttura secondaria diventando α -elica, ciò suggerisce che l'interazione con le parti idrofobiche contribuiscano alla formazione dell' α -elica in presenza di membrane.

È stato osservato che una transizione da α -elica a β -foglietto induce una propagazione di proteine prioniche che causano malattia come encefalopatia spongiforme. Questa transizione sarebbe dovuta all'interazione con le membrane con conseguente cambio leggero di struttura.

Non sono state ancora chiarite tutte le funzioni dell'AGP, essa interviene in numerose attività fisiologiche ed è un buon carrier di farmaci terapeutici. Interviene negli eventi intracellulari come il controllo dell'agglutinabilità trombocitica, controllo dell'agglomerato batterico e l'inibizione della crescita dei linfociti. È stato rilevato sulla superficie dei normali linfociti umani, granulociti e monociti.

Gli eventi chiave dell'AGP sono come si interfaccia alle membrane in ambiente leggermente acido e il cambio di affinità per il ligando trasportato cambiando struttura da β -foglietto ad α -elica.