

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

**CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN CHIMICA**

CURRICULUM: SCIENZE CHIMICHE

**L'EFFETTO DI AMMINOACIDI, COMPOSTI TIOLICI E INORGANICI  
SULLA STABILITA' CONFORMAZIONALE DELL'INSULINA**

“THE EFFECT OF AMINO ACIDS, INORGANIC AND THIOLIC  
COMPOUNDS ON CONFORMATIONAL STABILITY OF INSULIN”

**Relatore: Prof.ssa Claudia Giorgi**

**Correlatore: Prof. Paolo Paoli**

**Candidato: Martina Crulli**

A.A. 2011/2012

## Sommario

1. INTRODUZIONE .....	1
1.1. BIOSINTESI DELL'INSULINA E LE SUE DIFFERENTI FORME STRUTTURALI .....	2
1.2. RUOLO METABOLICO DELL'INSULINA .....	6
1.3. I RECETTORI DELL'INSULINA E L'INSULINO- RESISTENZA.....	9
1.4. IL DIABETE MELLITO .....	12
1.4.1. DIABETE DI TIPO I .....	13
1.4.2. DIABETE DI TIPO II .....	14
1.5. OMOCISTEINA E L'IPEROMOCISTEINEMIA.....	18
2. MATERIALI E METODI.....	25
2.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI .....	25
2.2. ANALISI DI AGGREGAZIONE .....	25
2.3. ANALISI SPETTROFLUORIMETRICHE.....	26
2.4. DICROISMO CIRCOLARE (CD) .....	27
2.5. LIGHT SCATTERING DINAMICO .....	28
2.6. PROGRAMMA DI SIMULAZIONE SWISSDOCK .....	29
3. RISULTATI .....	31
4. DISCUSSIONE.....	46
5. BIBLIOGRAFIA.....	49

## Ringraziamenti

*Questo percorso universitario triennale è stato per me molto faticoso e impegnativo e più di una volta mi è passato per la mente il pensiero di lasciare questo tipo di studi.*

*Vorrei quindi ringraziare tutte persone che mi hanno sostenuto in questi tre anni e che mi hanno permesso di diventare una persona più sicura di sé e delle sue capacità, facendomi arrivare alla fine alla laurea.*

*Per primi ringrazio la prof.ssa Giorgi, che mi ha incoraggiata a seguire questa strada durante un colloquio di orientamento e che poi mi ha seguita in tesi, e il prof. Paoli, il quale è stato per me non solo un ottimo insegnante di biochimica, ma anche una persona squisita che mi ha accompagnata in questo percorso di tesi insegnandomi a muovere i primi passi in un ambito totalmente diverso dal mio, la biologia.*

*Ringrazio i dottorandi e i tesisti del Dipartimento di Biochimica, che sono stati eccezionali nel consigliarmi e nell'aiutarmi a vivere quest'esperienza interdisciplinare nel migliore dei modi.*

*Ringrazio poi i miei genitori e tutta la mia famiglia, che mi hanno sempre spronata a seguire la mia strada e a non scoraggiarmi davanti alle difficoltà di ogni singolo giorno.*

*Un grazie speciale alla mia carissima amica Valentina e a Maurizio, che in tutti questi lunghi anni di amicizia mi sono sempre stati vicini, anche a distanza, sia nei momenti più belli e che in quelli più tristi sostenendomi e aiutandomi in ogni momento.*

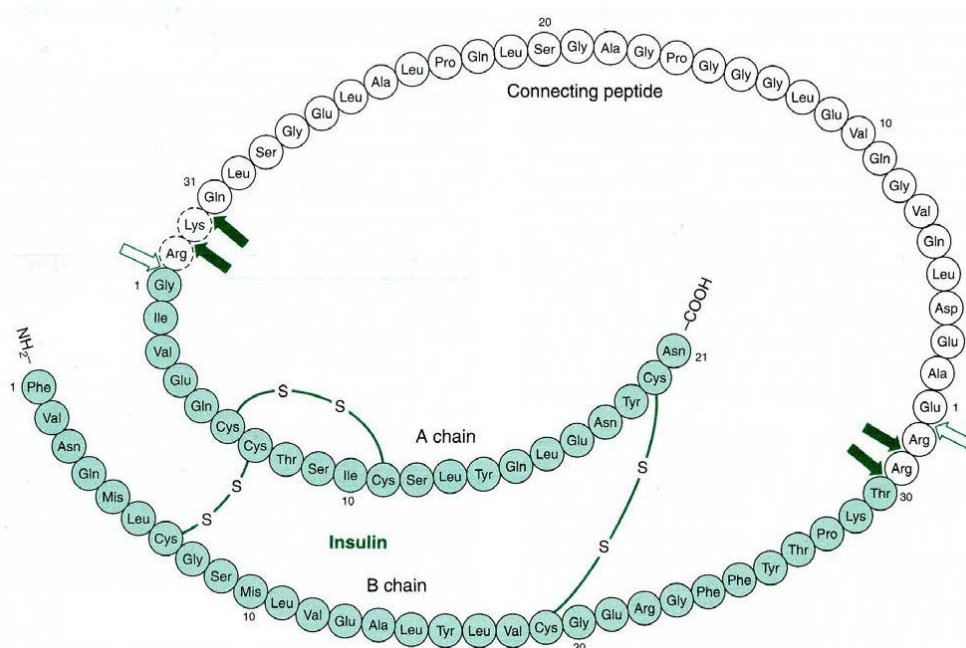
*Un grazie speciale anche al mio fidanzato Marco, che in questi ultimi due anni mi ha aiutata a superare le mie paure, ad avere più fiducia in me stessa, ad affrontare al meglio gli esami e a farmi forza durante il periodo del tirocinio, dandomi anche un enorme sostegno nella rimessa a punto della tesi.*

*Per finire un ringraziamento anche alle mie amiche Carolina e Silvia, affettuose e sempre presenti, con le quali ci siamo anche risentite più volte le rispettive materie di studio, e un grazie generale a tutti gli amici dell'università e a quelli vicini di casa per il loro sostegno.*

## 1.INTRODUZIONE

**“A sparrow may be a small bird, but it is fully equipped to act as a bird. Insulin, as a protein, can be viewed in a similar way: it is a small but fully functional protein”**: così afferma Qingxin Hua nella review “Insulin: a small protein with a long journey”<sup>1</sup> per sottolineare l’importanza fisiologica di questo ormone, a dispetto delle sue piccole dimensioni rispetto ad altre proteine.

Infatti l’insulina (nel nostro caso quella umana) è una piccola proteina globulare di 5807 Da costituita da due catene polipeptidiche A e B, rispettivamente formate da 21 e 30 residui, e collegata da tre ponti disolfuro (due intercatena: A7-B7 e A20-B19; uno intra-catena: A6-A11). E’ presente in diverse forme isomeriche in natura, anche se è possibile individuare alcuni elementi in comune caratteristici di struttura secondaria: tre  $\alpha$ -eliche (B9–B19, A2–A8 e A13–A19) e un foglietto  $\beta$  (B24–B28).



**Fig. 1.1: Molecola di Proinsulina.** In azzurro è riportata la molecola di insulina.

<sup>1</sup> Qingxin Hua, Protein & Cell, 1(6), (2010): p 537

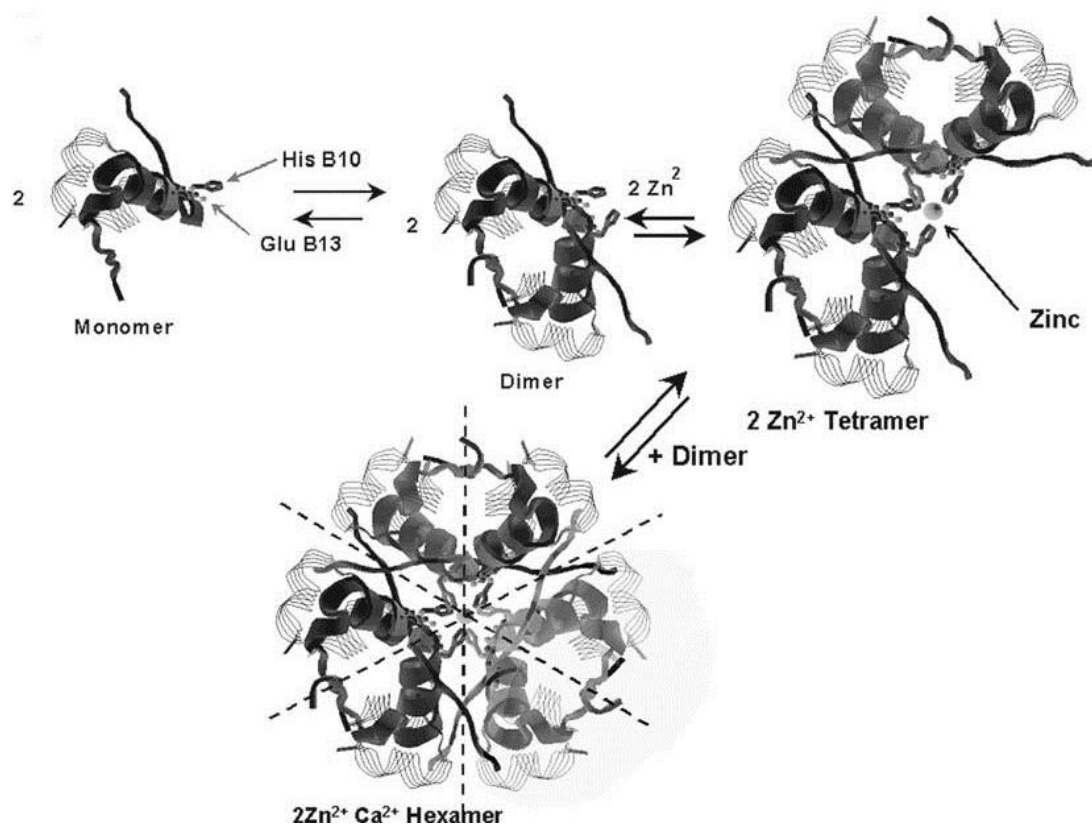
La proteina presenta un nucleo idrofobico ordinato in cui figurano un'elica centrale della catena B (B9-B19), un ponte disolfuro per la maggior parte eclissato (A20-B19), un'elica C-terminale della catena A (A13-A19) e un  $\beta$ -turn della catena B (B20-B23). L'insulina è una proteina termodinamicamente stabile, grazie alla presenza di interazioni deboli, come i legami ad idrogeno e interazioni di Van der Waals.

### **1.1. BIOSINTESI DELL'INSULINA E LE SUE DIFFERENTI FORME STRUTTURALI**

L'insulina viene sintetizzata dalle cellule  $\beta$  presenti nelle Isole di Langerhans del pancreas. Essa è sintetizzata come proinsulina, una catena polipeptidica di 109 amminoacidi, dei quali i primi 23 costituiscono la sequenza segnale necessaria per la sua traslocazione nel reticolo endoplasmatico. Qui la sequenza segnale viene rimossa generando la proinsulina, di 86 amminoacidi, che viene così inviata all'apparato del Golgi, dal quale viene poi trasferita all'interno di vescicole di stoccaggio, complessata con ioni  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  generando strutture esameriche stabili del tipo  $(Zn^{2+})_2(Ca^{2+})(Proin)_6$ . Nelle vescicole di secrezione avviene poi la rimozione specifica del peptide C ( un piccolo peptide di 31 amminoacidi che collega le catene A e B) da parte dell'enzima "proinsulin converting enzyme" generando la forma matura dell'ormone,  $(Zn^{2+})_2(Ca^{2+})(Ins)_6$ . La biosintesi della Proinsulina esamerica si pensa che segua una via di assemblaggio simile a quella dell'insulina esamerica: la coordinazione di due insuline dimeriche, risultato della dimerizzazione di insuline monomeriche, avviene con due ioni  $Zn^{2+}$  in modo da dare il tetramero  $(Zn^{2+})_2(Ins)_4$ , in cui i due ioni  $Zn^{2+}$  interagiscono con due residui di His10 delle catene B. Infine in presenza di un'altra insulina

dimerica, si verifica l'inserimento del  $\text{Ca}^{2+}$  in corrispondenza dei quattro residui Glu13 delle catene B<sup>2</sup>.

Il passaggio dalla specie  $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Proin})_6$  alla specie  $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Ins})_6$  comporta un cambiamento della solubilità dando luogo alla conseguente cristallizzazione dell'insulina esamerica, generando così una struttura molto stabile e resistente. L'insulina esamerica in realtà è una proteina che è presente in tre stati conformazionali allosterici, definiti di tipo  $T_6$ ,  $R_3T_3$  e  $R_6$ , rispettivamente, che seguono il modello **S.M.B** di cooperatività positiva e negativa, proposto dagli studiosi **Seydoux**, **Malhotra** e **Bemhard**, oramai ampiamente accettato<sup>3</sup>.



**Fig. 1.2: Equilibri tra le varie conformazioni dell'insulina.**

<sup>2</sup> (Coffman & Dunn 1988; Kadima *et al.* 1992) citati da M.F. Dunn, *BioMetals*, 18 (2005): p 297

<sup>3</sup> (Seydoux *et al.* 1974) citato da M.F. Dunn, *BioMetals*, 18 (2005): p 301

Le tre strutture sono caratterizzate da due tipi di siti allosterici, ovvero tasche idrofobiche in grado di ospitare ligandi fenolici (es. fenolo, resorcinolo, cresolo) e tasche in grado di complessare anioni monovalenti (es. alogenuri, pseudo alogenuri, carbossilati organici). La transizione dalle unità  $T_6$  a quelle  $R_6$  consiste nella conversione dei residui 1-9 delle catene B da una conformazione allungata ad una ad elica e quindi il passaggio da una situazione di esposizione del sito dello  $Zn^{2+}$ -HisB10 ad una di eclissamento dello stesso, con formazione di tasche idrofobiche <sup>4</sup>. In assenza di leganti allosterici, i tre stati differiscono, da un punto di vista chimico-fisico, per stabilità nell'ordine:  $R_6 \gg T_3R_3 \gg T_6$ . Quale delle tre forme allosteriche sia presente in forma cristallina nelle vescicole di stoccaggio non è ancora chiaro, anche se risultano molto più probabili gli stati  $R_6$  e  $T_3R_3$ , sia per il fatto che sono gli unici rimasti preservati durante l'evoluzione dei vertebrati, sia per la loro grande stabilità rispetto alla specie  $T_6$ .

L'esocitosi dell'insulina, cioè l'espulsione dell'insulina dalle cellule pancreatiche, avviene in risposta all'aumento dei livelli di glucosio nel sangue. In seguito al suo rilascio, si assiste alla dissoluzione dei cristalli di insulina e alla dissociazione dell'esamero in monomero. Si pensa che tale evento sia favorito da vari fenomeni quali la variazione di pH nel passaggio all'ambiente extracellulare, la perdita dei leganti allosterici dovuta alla diluizione e infine il sequestro degli ioni  $Zn^{2+}$  da parte di chelanti endogeni<sup>5</sup>.

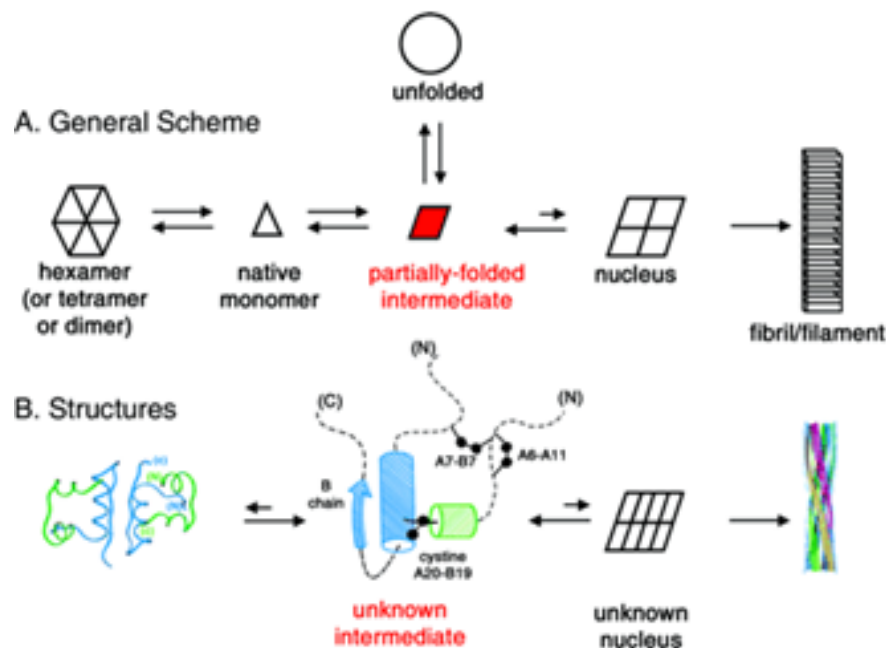
A questo punto, una volta rimossi gli ioni  $Zn^{2+}$ , si susseguono il veloce passaggio al dimero e poi quello terminale al monomero, l'unica forma biologicamente attiva in grado di legarsi agli specifici

---

<sup>4</sup> (Smith *et al.* 1984; Derewenda *et al.* 1989; Smith & Dodson 1992; Ciszak & Smith 1994) citati da M.F. Dunn, *BioMetals*, 18 (2005): p 301

<sup>5</sup> E' stato stimato che questo processo, fino al raggiungimento del fegato, ha una durata di circa 10 s (Michael F. Dunn, *BioMetals* (2005) 18, p 300)

recettori. Questa struttura mostra tuttavia un'elevata instabilità in soluzione rispetto a quella esamerica ed è stato dimostrato in numerose ricerche effettuate con test *in vitro* sia in campo biologico che in quello medico, che la stabilità e la flessibilità strutturali risultano essere uno step fondamentale nel corretto folding dell'insulina, come di ogni altra proteina.



**Fig. 1.3: Fibrillogenesi dell'insulina.**

Se durante tale processo si verifica la formazione di intermedi che presentano folding solo parziale, essa darà luogo a forme proteiche alterate (misfolded) e biologicamente inattive che possono dar luogo alla formazione di fibrille amiloidi. Generalmente tale processo è favorito dalla transizione di strutture da  $\alpha$ -elica in quelle a foglietto- $\beta$ . Nel caso dell'insulina è stato notato che in certe condizioni, come ad esempio in presenza di urea, guanidina, superfici idrofobiche, alta temperatura, pH molto basso e agitazione <sup>6</sup>, si assiste alla parziale denaturazione dell'insulina con formazione di aggregati pre-fibrillari i quali poi favoriscono l'origine di vere e

<sup>6</sup> (Nielsen *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2003) citati da Qingxin Hua, Protein & Cell, 1(6), (2010): p 546



proprie amiloidi <sup>7</sup>. Nelle comuni formulazioni la denaturazione e l'aggregazione dell'insulina vengono impediti grazie all'aggiunta di  $Zn^{2+}$  e presenza di cresolo, in modo da sequestrare l'insulina in forma monomerica e portarla a quella esamerica, più stabile. Durante gli studi sulla fibrillazione dell'insulina è stato evidenziato anche il particolare comportamento della proinsulina, che risulta essere resistente alla fibrillazione e che è stato preso come modello di riferimento da alcune delle più eminenti ditte farmaceutiche, come la Eli Lilly e la Novo-Nordisk, per creare delle insuline attive resistenti alla fibrillazione (rispettivamente la Humalog e la Novolog). Recentemente è stata sviluppata un'insulina ricombinata attiva formata da una singola catena di 57 residui amminoacidici ad elevatissima stabilità termodinamica, chiamata SCI-57 <sup>8</sup>.

## 1.2. RUOLO METABOLICO DELL'INSULINA

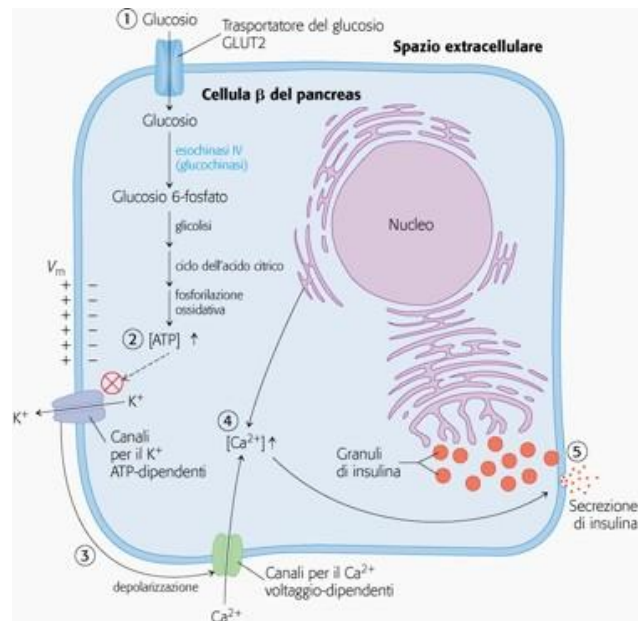
L'insulina ricopre un ruolo fondamentale nel metabolismo cellulare, dal momento che agisce direttamente o indirettamente sui tessuti corporei (i tessuti adiposo e muscolare, il muscolo scheletrico e il fegato, ad eccezione dei tessuti dell'encefalo) e che la sua azione coinvolge più vie metaboliche. E' infatti in grado di aumentare la captazione del glucosio dal sangue e il trasporto di questo alle cellule muscolari e adipose, attivando la glicolisi e inibendo la gluconeogenesi; di stimolare la sintesi delle proteine nei tessuti muscolari, favorendo l'ingresso degli amminoacidi nelle cellule; di attivare la sintesi del glicogeno nel fegato e nel muscolo scheletrico; di avviare la sintesi degli acidi grassi nel fegato e nel muscolo. Dopo un pasto ricco di carboidrati, il glucosio ematico sale rapidamente dal suo normale valore di circa 80-90 mg/dl al valore, nei soggetti non affetti da diabete mellito, di circa 130-150 mg/dl. Questo provoca, in corrispondenza di stimoli nervosi provenienti

---

<sup>7</sup> K. Huang *et al.*, *Biochemistry*, 45 (2006): p 10278-10293

<sup>8</sup> (Hua *et al.*, 2008) citato da Qingxin Hua, *Protein & Cell*, 1(6), (2010): p 546

dalle cellule dell'ipotalamo sensibili alla presenza di glucosio<sup>9</sup>, la secrezione dell'insulina.



**Fig. 1.4:** Rappresentazione del meccanismo di secrezione dell'insulina.

In generale il rilascio dell'insulina è indotto dalla semplice presenza di glucosio ematico, che penetra nelle cellule  $\beta$  pancreatiche grazie all' isoforma 2 del trasportatore di glucosio (GLUT-2), dando luogo alla via metabolica della glicolisi, ovvero alle dieci reazioni chimiche che portano il glucosio a piruvato con produzione di ATP. L'aumento progressivo della concentrazione di ATP in questo processo provoca la depolarizzazione della membrana, ovvero la diminuzione del potenziale di membrana legato al gradiente di concentrazione e di permeabilità di vari ioni, che comporta l'assorbimento nei confronti degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ . L'eccesso di tali ioni infine determina la fuoriuscita dell'insulina dalle vescicole dell'apparato di Golgi nell'ambiente extracellulare (esocitosi). L'insulina, dopo essere stata liberata nel flusso ematico, svolge l'azione di aumentare l'assorbimento del glucosio da parte delle cellule dei tessuti adiposo e muscolare, i quali richiedono un apporto di glucosio considerevole. L'isoforma

<sup>9</sup> Il fabbisogno energetico dell'encefalo umano è di 120 g di glucosio al giorno e tale apporto deve essere continuo per il suo corretto funzionamento. L'isoforma 1 del trasportatore del glucosio che è in grado di portare oltre la barriera ematoencefalica il glucosio è il GLUT-1.

presente in tali tessuti è il GLUT-4, il quale svolge un'azione di trasporto regolato sulla superficie cellulare: infatti quando l'insulina si lega al suo recettore di membrana innesca una serie di cascate di segnalazione intracellulare che portano alla rapida fusione delle vescicole, in cui è contenuto il GLUT-4, con la membrana cellulare. Questa fusione permette poi un aumento dei trasportatori GLUT-4 disponibili per trasferire glucosio all'interno della cellula.

A livello ematico l'insulina aumenta sensibilmente dopo un pasto per ritornare poi ai valori normali nel giro di circa un'ora o due: il picco raggiunto è ovviamente tanto più consistente quanto maggiore è la quantità di glucosio introdotta, mentre hanno scarsa influenza il contenuto proteico e lipidico. In generale i livelli basali di insulina messa in circolazione nel sangue non sono perfettamente stabili: infatti è stata osservata una secrezione oscillatoria con periodi di 4-6 minuti (tempo di dimezzamento). Dopo un pasto invece l'ampiezza di tali oscillazioni aumenta ma la periodicità rimane costante, segno che la sensibilità delle cellule all'insulina deve essere mantenuta regolare.

Un altro aspetto molto importante nel quadro dell'azione metabolica dell'insulina è la sua degradazione, uno step fondamentale nel controllo della risposta cellulare a questo ormone. In generale la rimozione dell'insulina dai tessuti in cui essa agisce può avvenire in due modi: in condizioni fisiologiche, è principalmente mediata da recettori, mentre a concentrazioni più elevate prevalgono processi non specifici. In generale il tempo medio di residenza dell'insulina secreta è di 71 minuti, dei quali 62 trascorsi legata ai recettori del fegato, 6 legata ai recettori periferici e 3 nel sangue o fluidi interstiziali<sup>10</sup>, ovvero l'80% circa dell'insulina totale nel corpo viene trattenuta dai recettori del fegato. Un altro importante sito di rimozione dell'insulina è il rene,

---

<sup>10</sup> (Secondo il modello a cinque scomparti elaborato da Hovorka *et al.*) citato da W.C. Duckworth *et al.*, *Endocrine Reviews*, 19(5) (1998): p 608

dove hanno luogo principalmente due tipi di meccanismi: la filtrazione da parte dei glomeruli renali, caratterizzata sia da diffusione non specifica che da trasporto mediato da recettori, e il riassorbimento da parte dei tubuli prossimali tramite endocitosi (solo una piccola parte dell'insulina è secreta nelle urine). L'insulina viene inizialmente assorbita e accumulata in endosomi, dove ha luogo la prima parte della degradazione, e successivamente i frammenti vengono inviati ai lisosomi dove è presente l'IDE (insuline degrading-enzyme)<sup>11</sup> per terminare la degradazione (un qualsiasi danno renale nei pazienti con diabete di tipo II comporta gravi conseguenze di ipoglicemia e insufficienza nella rimozione dell'insulina). Infine l'insulina non rimossa da fegato e reni è degradata da altri tessuti, come il muscolo, gli adipociti, i fibroblasti, i monociti, i linfociti e le cellule gastrointestinali, sempre tramite meccanismi mediati da recettori (IDE e PDI-proteina disolfuro isomerasi-).

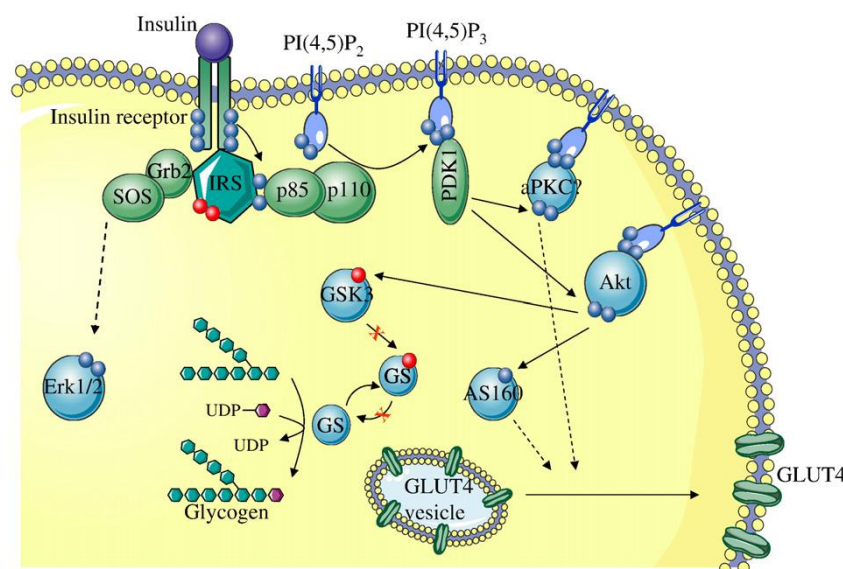
### 1.3. I RECETTORI DELL'INSULINA E L'INSULINO- RESISTENZA

La scoperta degli step intracellulari della via di segnalazione dell'insulina ha permesso di fare sempre più luce sulle caratteristiche dei recettori coinvolti e quindi sui meccanismi molecolari alla base del loro funzionamento e dell'alterazione della loro attività, come nei casi di insulino-resistenza. L'azione dell'insulina inizia con il legame con il suo recettore, chiamato IR, una proteina transmembrana formata da quattro catene ( $\alpha_2\beta_2$ ) legate tra loro attraverso ponti disolfuro. Le catene  $\alpha$  formano la porzione extracellulare del recettore, quella coinvolta nel legame dell'ormone; le catene  $\beta$ , attraversano la membrana e sporgono nel citoplasma della cellula dando origine ad un dominio che possiede

---

<sup>11</sup> Recentemente è stata scoperta la capacità di questo enzima di degradare i peptidi  $\beta$ -amiloidi coinvolti nel morbo di Alzheimer: vedi **Kurochkin IV, Goto S** 1994, FEBS, 345: p 33-37 (citato da Duckworth *et al.*, End. Rev., 19 (5), (1998): p 615.

un'attività chinastica intrinseca. Il legame dell'insulina alla porzione extracellulare causa un forte incremento dell'attività chinastica del dominio citosolico del recettore, causando l'autofosforilazione di numerosi residui di tirosina presenti in esso. Il recettore attivato a sua volta recluta e fosforila su residui di tirosina, una serie di proteine bersaglio; tra queste ricordiamo le proteine IRS (Insulin Receptor Substrates), le quali svolgono il ruolo di molecole adattatrici, in grado cioè di reclutare a loro volta altre chinasi. In tal modo la segnalazione attivata dal recettore si propaga all'interno della cellula, dando luogo alle risposte fisiologiche tipiche dell'insulina. Per esempio è stato osservato che la stimolazione del trasporto del glucosio e altri effetti metabolici dell'insulina sono regolati dall'attivazione dell'enzima PI3K (fosfatidilinositolo 3-chinasi), evento innescato dal legame della subunità regolatrice della PI3K con i residui fosfotirosina presenti sulla proteina IRS-1. L'ultimo passo nel metabolismo del glucosio è il trasporto delle vescicole contenenti il GLUT-4 sulla membrana plasmatica, evento che permette di incrementare la velocità di trasporto del glucosio nelle cellule.



**Fig. 1.5:** Via di segnalazione intracellulare attivata dall'insulina.

Il mancato funzionamento o anche semplicemente un'attenuazione dell'attività chinasi di uno degli enzimi e dello stato di fosforilazione dei substrati coinvolti nella via di segnalazione, comporta delle alterazioni nella sensibilità dei tessuti all'insulina e nell'omeostasi del glucosio, evidenziando quelle che sono le caratteristiche dei soggetti insulino-resistenti<sup>12</sup>.

Le cause che determinano il fenomeno dell'insulino-resistenza sono molteplici. Per esempio è stato osservato che il legame dell'insulina è associato a cambiamenti conformazionali che contribuiscono all'attivazione del dominio chinasi: alterazioni nell'autofosforilazione o nell'attività chinasi possono essere dovute all'interazione con composti inibitori o da modifiche post-traslazionali della proteina IR. Per quanto riguarda l'autofosforilazione, nelle biopsie di tessuti del muscolo scheletrico nei soggetti insulino-resistenti obesi o affetti da diabete di tipo II, sono state notate: mutazioni nella posizione della tirosina 972, responsabile del sito di binding con il dominio del substrato IRS-1; interazioni dirette tra la glicoproteina PC-1 (plasma cell membrane glycoprotein-1) e l'IR nelle subunità  $\beta$  dove sono presenti gli amminoacidi 485-599, che impediscono il corretto cambiamento conformazionale indispensabile al processo dell'autofosforilazione<sup>13</sup>; interazioni con proteine tipo LAR (leukocyte common antigen-related phosphatase) e con PTP1-B (protein tyrosine phosphatases 1-B), in grado di defosforilare l'IR agendo sui residui di tirosina 1158,1162 e 1163; la fosforilazione dei residui di serina, in particolare la serina 944, che inibisce l'autofosforilazione e quindi il binding con l'insulina, e la

---

<sup>12</sup> S. Fröjdö *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792 (2009): p 83-92

<sup>13</sup> Ottensmeyer notò questo fenomeno in relazione a forme genetiche di insulino-resistenza: [Ottensmeyer *et al.*, *Biochemistry*, 39 (2000)] citato da J.F. Youngren, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64 (2007): p 877

fosforilazione dei residui di treonina, in particolare la treonina 348, che impedisce la fosforilazione del substrato IRS-2<sup>14</sup>.

Da un punto di vista patologico la mancata attivazione dell'IR o dei suoi substrati causa: accumulo di glucosio nel sangue; assenza di controllo nella gluconeogenesi e nel processo di sintesi del glicogeno; mancato stimolo della liposintesi e mancata inibizione della lipolisi con conseguente aumento degli acidi grassi liberi nel sangue. I soggetti che mostrano tali alterazioni soffrono di una malattia nota con il nome di *diabete mellito* e sono in generale affetti da una situazione persistente di iperglicemia che a sua volta induce altri gravi problemi: fame e sete eccessive, minzione frequente, perdita di peso, affaticamento e perdita costante di glucosio nelle urine. Quest'ultima inoltre provoca il metabolismo forzato delle proteine e dei grassi nel corpo, originando una grande quantità di acetyl CoA, che viene convertito in corpi chetonici comparando nel sangue (*chetonemia*) e nelle urine (*chetonuria*) e dando anche luogo ad *acidosi*, ovvero un abbassamento del pH sanguigno e della capacità tamponante normalmente operata dai tamponi ematici.

#### 1.4. IL DIABETE MELLITO

Come già accennato, il diabete mellito (dal greco: dolce flusso) è un termine che indica un insieme di patologie che danno luogo a stati più o meno gravi di iperglicemia. In generale le forme di diabete mellito si classificano in: diabete di tipo I, diabete di tipo II, diabete gestazionale (diabete che si sviluppa durante i primi mesi di gravidanza), diabete che si origina a seguito della resezione del pancreas e alcuni rari tipi di diabete di origine genetica. Nel paragrafo successivo verranno trattate solo le forme più diffuse di diabete, ovvero i diabeti di tipo I e II, due tipologie patologiche

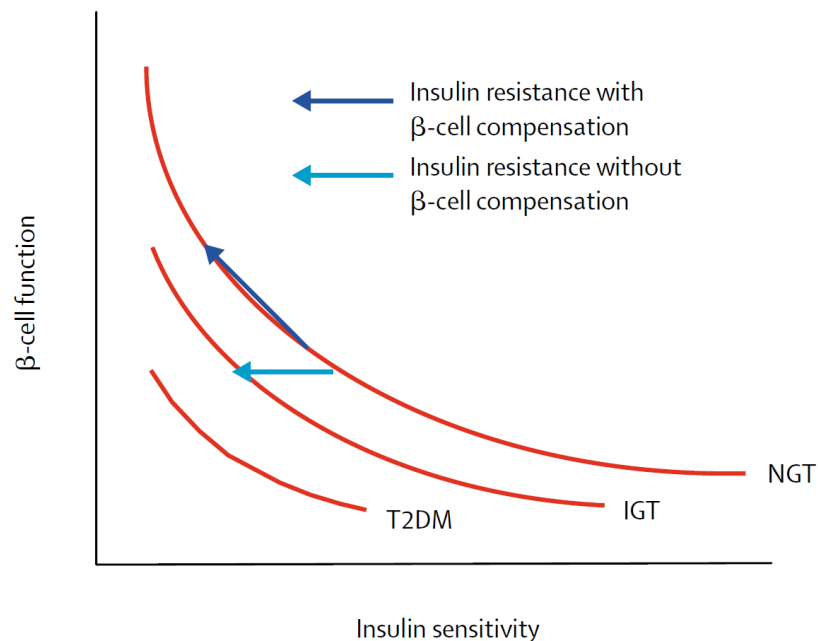
---

<sup>14</sup> J.F. Youngren, Cellular and Molecular Life Sciences, 64 (2007): p 873-891

croniche di cui non esistono terapie efficaci che possano portare ad una guarigione definitiva, ma i cui costanti controlli e cure riescono a permettere ai pazienti che ne soffrono di condurre una vita pressoché normale.

#### 1.4.1. DIABETE DI TIPO I

Il diabete di tipo I si manifesta in genere durante l'infanzia o l'adolescenza, anche se negli ultimi tempi questa forma di diabete è stata riscontrata in diversi casi di pazienti tra i quaranta e i cinquant'anni. E' una patologia che ha come risultato la parziale, o nei casi peggiori, la mancata secrezione dell'insulina da parte delle cellule  $\beta$  del pancreas, che subiscono una progressiva distruzione, determinando una sovrapproduzione di insulina da parte delle cellule sane residue, per compensare la perdita di attività metabolica.



**Fig. 1.6:** Relazione tra il funzionamento delle cellule  $\beta$  e la sensibilità dell'insulina.

Le cause alla base di questo fenomeno sono in alcuni casi di origine sconosciuta (diabete di tipo I-B), mentre nei restanti di origine virale (diabete di tipo I-A). La seconda categoria, la più diffusa, è



un esempio di malattia autoimmune<sup>15</sup>, in cui i pazienti, che di solito risultano predisposti da un punto di vista genetico, manifestano la malattia in seguito ad un'infezione virale delle cellule  $\beta$ : tra i possibili agenti scatenanti la risposta immunitaria sono stati individuati i virus della parotite, il citomegalo-virus, i virus Coxsackie B e dell'encefalomiocardite. In questi casi il loro sistema immunitario inizia a produrre una serie di anticorpi (ICA, GAD e IA-2)<sup>16</sup> in grado di colpire, più o meno gravemente e velocemente a seconda del soggetto, la crescita e la corretta funzionalità delle cellule  $\beta$  pancreatiche<sup>17</sup>.

A differenza del diabete di tipo II, quello di tipo I si manifesta con una sintomatologia ben identificata a seconda dello stadio di avanzamento della patologia: nella fase iniziale i sintomi risultano aspecifici e in generale includono affaticamento, tendenza alle infezioni (quella alla vescica è la più frequente) e un costante senso di malessere; nella fase intermedia invece i pazienti cominciano a mostrare sintomi più evidenti di un diabete in rapido avanzamento, come la perdita di ingenti quantità di glucosio nelle urine; infine nella fase acuta si manifesta il diabete nelle sue caratteristiche più conosciute, come la poliuria, la polidipsia, la polifagia associata tuttavia ad una diminuzione di peso, chetonuria e acidosi. L'unica cura possibile è tramite una somministrazione giornaliera di insulina, tramite iniezioni sottocutanee.

#### 1.4.2. DIABETE DI TIPO II

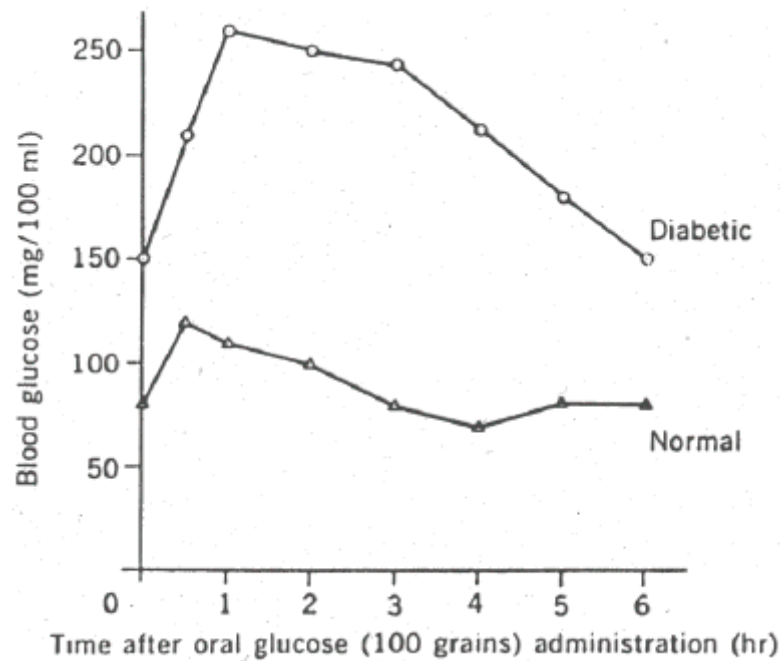
Il diabete di tipo II, a differenza di quello di tipo I, è la forma di diabete più diffusa (circa il 90% dei casi) e si manifesta negli individui in età adulta, anche se non sono pochi i casi di adolescenti

---

<sup>15</sup> Malattia dovuta ad una reazione immunitaria diretta contro l'organismo stesso

<sup>16</sup> Sigle che indicano rispettivamente gli anticorpi anti-citoplasma di insula pancreatica, anti-acido glutammico decarbossilasi e anti-tirosin fosfatasi insulare

<sup>17</sup> R. De Lorenzi e C. Gritti, "Verso il primo farmaco ricombinante: Insulina", 2010, EMBL (ELLS-European Learning Laboratory for the Life Sciences)



**Fig. 1.7:** Test da carico di glucosio in soggetti sani e diabetici.

che sviluppano questo disturbo (come vedremo successivamente, l'obesità risulta essere un fattore determinante). È stato stimato che circa 170 milioni di persone soffrono di diabete di tipo II (soprattutto nell'America Settentrionale) e che tale numero si duplicherà nei prossimi 20 anni, per via dell'incremento di tale malattia nei paesi in via di sviluppo come Africa, Asia e America del Sud. Una delle condizioni tipiche del diabete di tipo II è l'insulino-resistenza: l'insulina, sebbene sia presente nel sangue a livelli normali o addirittura elevati, risulta meno efficace che nei soggetti normoglicemici e ne deriva quindi una ridotta azione ipoglicemizzante oltre al mancato blocco della gluconeogenesi e della glicogenolisi epatica. Analizzando nel dettaglio, nei soggetti ancora allo stadio iniziale, le cellule  $\beta$  del pancreas iniziano a produrre quantità sempre più elevate di insulina in modo da compensare l'insulino-resistenza in aumento: con il progredire della malattia, la perdita di funzionalità delle cellule  $\beta$  determina una riduzione della produzione di insulina. Quando la risposta cellulare all'avanzamento dell'insulino-resistenza non è più sufficiente

(iperglicemia conclamata), allora i soggetti incorrono nel diabete di tipo II vero e proprio. Questa malattia ha una patogenesi multifattoriale che comprende cause di tipo genetico e di tipo ambientale. E' stato osservato che i figli di soggetti che soffrono di diabete di tipo II hanno una maggiore probabilità di sviluppare a loro volta diabete. Il rischio aumenta di circa il 38% se ne è affetto solo un genitore e del 60% se ne sono affetti entrambi<sup>18</sup>. Alcune ricerche hanno rivelato che i fattori genetici che portano al manifestarsi della malattia in genere sono dovuti a variazioni dei geni che codificano molte delle proteine coinvolte sia direttamente che indirettamente nella via di segnalazione dell'insulina: per esempio le forme polimorfe Gly972Arg e Gly1057Asp rispettivamente dell'IRS-1 e dell'IRS-2, varianti del gene dell'adiponectina (un peptide derivato dal grasso bianco degli adipociti in grado di incrementare sia la fosforilazione delle tirosine dell'IR e la sensibilità all'insulina nel muscolo scheletrico sia l'ossidazione degli acidi grassi con conseguente riduzione dell'uscita di glucosio epatico e della sintesi delle VLDL) e la variante Pro12Ala del PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ )<sup>19</sup>. Quest'ultima proteina, la più studiata, è un fattore di trascrizione che è espresso principalmente nel tessuto adiposo responsabile della trascrizione di numerosi geni tra cui quelli in grado di favorire il differenziamento delle cellule adipose: quando risulta attivato, è in grado di incrementare l'eliminazione del glucosio periferico e di abbassare il livello di glucosio epatico prodotto. Tuttavia, in presenza di mutazioni a livello del suo co-attivatore, dà luogo ad alterazioni evidenti nell'ossidazione dei grassi e nella secrezione dell'insulina.

Per quanto riguarda invece i fattori ambientali, l'obesità risulta essere l'elemento chiave di maggior rischio nello sviluppo del

---

<sup>18</sup> M. Stumvoll *et al.*, *Lancet*, 365 (2005): p 1333-1334

<sup>19</sup> B. Panunti *et al.*, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 1 (2), (2004): p 151-157

diabete di tipo II, oltre che di molte altre malattie croniche: in particolare è stato evidenziato che il grasso viscerale è altamente resistente all'azione dell'insulina rispetto al grasso sottocutaneo e conduce, a lungo termine, a condizioni di insulino-resistenza, diabete e a complicazioni cardiovascolari, come infarti, ictus, aterosclerosi e ipertensione<sup>20</sup>. Questo è dovuto al fatto che la lipolisi dei grassi, molto favorita a livello del grasso viscerale, determina il rilascio di acidi grassi liberi che non solo provoca un rapido blocco della via di segnalazione dell'insulina ma anche accesso degli stessi alla circolazione portale, con gravi conseguenze vascolari oltre che metaboliche.

Per quanto riguarda la semeiotica del diabete di tipo II, i pazienti nelle prime fasi manifestano pochi sintomi o addirittura nessuno, tanto che la malattia può rimanere silente per molti anni, motivo per cui risulta evidente in età adulta (la comparsa nei casi di adolescenti o comunque soggetti giovani è dovuta principalmente all'insorgere dell'obesità).

**Tab. 1.1: Criteri diagnostici per il diabete di tipo II.**

	<b>Normale</b>	<b>Tolleranza al glucosio alterata (o livelli di glucosio a digiuno alterati)</b>	<b>Diabete</b>
<b>Glucosio a digiuno</b>	<110 mg/dl <6.1 mmol/l	110-125 mg/dl 6.1-6.9 mmol/l	≥126 mg/dl ≥7.0 mmol/l
<b>2h dopo oGTT</b>	<140 mg/dl <7.8 mmol/l	140-199 mg/dl 7.8-11.1 mmol/l	140-199 mg/dl 7.8-11.1 mmol/l

E' per questo che risulta fondamentale la valutazione clinica di soggetti ad alto rischio genetico oltre che di quelli che soffrono di obesità conclamata: questo è possibile grazie ad un semplice test (OGTT: oral glucose tolerance test) raccomandato dall'WHO (world health organization), in cui il paziente viene sottoposto prima ad

<sup>20</sup> G. S. Hillis *et al.*, Diabetologia, 55 (2012): p 1283–1290

un'analisi glicemica a digiuno e poi ad un'altra due ore dopo l'assunzione di 75 g di glucosio (in Tab. 1.1 sono riportati i livelli di riferimento). A seconda dello stadio in cui si trova la malattia e della storia clinica del paziente, le cure possono variare notevolmente. Nei casi di diabete di origine genetica (stadio ormai avanzato) vengono adottate terapie che partono dalle semplici iniezioni di insulina a breve durata a ridosso dei pasti o a lunga durata poco prima dei pasti fino alla combinazione dei due tipi di insulina sia il giorno che la notte (per regolare i fenomeni di ipo- e iper-glicemia). Nei casi di diabete dovuto ad obesità, invece le cure si concentrano sulla creazione di un programma di dimagrimento associato ad una dieta appropriata e ad attività fisica mirata accompagnata all'occorrenza da uso di insulina e, nei casi di insulino-resistenza (prediabete), su trattamenti farmacologici a base di Tiazolidinedioni di vario tipo e di Metformina, volti ad incrementare la secrezione di insulina pancreatica e a ridurre la resistenza all'insulina periferica (i reali benefici di tali farmaci sono ancora attualmente argomento di dibattito nella comunità medica europea, data la loro probabile epatotossicità)<sup>21</sup>.

#### 1.5. OMOCISTEINA E L'IPEROMOCISTEINEMIA

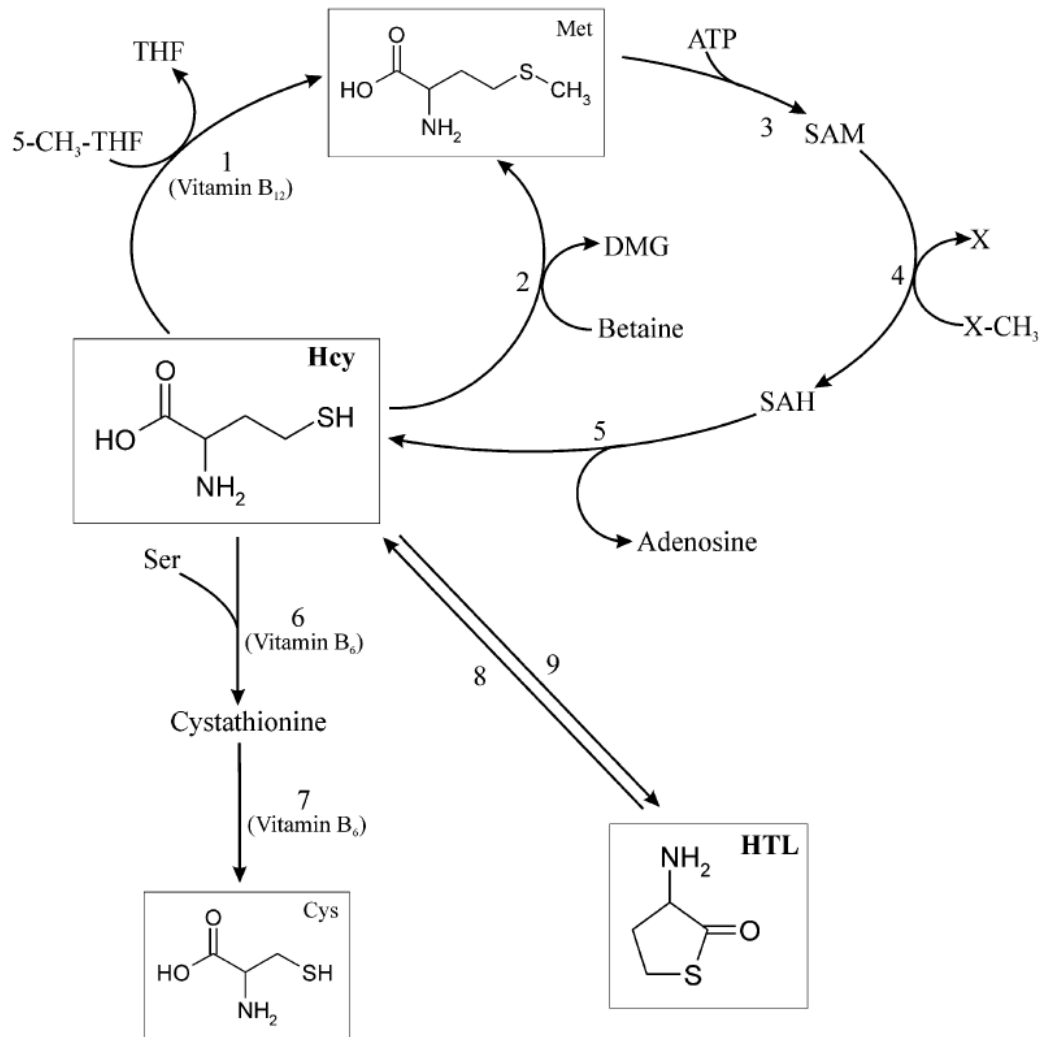
Un aspetto particolarmente interessante nello studio dell'insulino - resistenza e del diabete di tipo II è rappresentato dalla relazione che intercorre tra insulino-resistenza e livelli elevati di omocisteina<sup>22</sup>: per capire i meccanismi che li legano è necessario conoscere la via metabolica in cui è coinvolta l'omocisteina e le conseguenze dovute ad eventuali difetti di tale via. In generale l'omocisteina è un amminoacido solforato non essenziale che si

---

<sup>21</sup> B.J. Goldstein, *Am J Cardiol*, 90 (suppl.), (2002): p 3G-10G

<sup>22</sup> Relazioni con l'insulino-resistenza: E.J. Giltay *et al.*, *Atherosclerosis* 139 (1998): p197-198 ; Relazioni con il diabete di tipo II: K. L. Schalinske, *Nutritional Reviews*, 61 (4), (2003): p 136-138

distingue rispettivamente per i gruppi  $-CH_2$  interno e  $-CH_3$  terminale delle cisteina e metionina, due amminoacidi essenziali



**Fig. 1.8: Metabolismo dell'omocisteina.**

coinvolti nel metabolismo dell'omocisteina stessa. Infatti è generata dalla conversione della metionina a S-adenosilmetionina ad opera della metionina adenosiltransferasi e dalla successiva serie di reazioni di trans metilazione (uso di gruppi metilici attivi) che portano alla formazione della S-adenosilomocisteina (SAH). Dalla sua idrolisi da parte della SAH idrolasi, si liberano l'adenosina e l'omocisteina: quest'ultima può o subire rimetilazione a metionina o essere catabolizzata nella via della trans solforazione ed essere convertita in cisteina da parte della cistationina  $\beta$ -sintasi e della cistationina  $\gamma$ -liasi o addirittura inserirsi nel primo step della

biosintesi proteica. In quest'ultimo processo l'omocisteina viene scambiata, a causa della sua struttura, per la metionina, attivata dalla metionil t-RNA sintetasi (MetRS) e, una volta entrato in funzione il processo di cosiddetto "error-editing" (riconoscimento di un errore a livello dell'attività di un enzima), trasformata in tiolattone (HTL) e riconvertita al suo stato iniziale. Tutti queste vie metaboliche sono dipendenti dai livelli di vitamine, le quali sono richieste come cofattori dagli enzimi coinvolti nel turnover dell'omocisteina, come ad esempio la cobalammina (vitamina B<sub>12</sub>) e i derivati dell'acido folico, usati dalla MetRS, e il piridossal fosfato (vitamina B<sub>6</sub>), usato dalla cistationina β-sintasi e dalla cistationina γ-liasi: una carenza di tali vitamine (per difetti genetici o semplicemente per assenza all'interno della dieta) può dar luogo ad un accumulo di omocisteina a livello intracellulare e vascolare (iperomocisteneimia). Per quanto riguarda le specie in cui è presente l'omocisteina nel sangue umano, essa può esistere sia libera, in forma ridotta, sia legata a complessi proteici, per lo più in forma ossidata. In quest'ultimo caso, la maggiore frazione di omocisteina, circa il 75%, è presente nella forma N-Hcy-emoglobina, la seconda frazione, circa il 22%, nella forma N-Hcy-albumina e l'ultima, circa lo 0,29%, nella forma del metabolita HTL. Nel plasma i livelli di omocisteina sono determinati da diversi fattori, principalmente di tipo genetico, demografico e legati allo stile di vita, tuttavia è possibile individuare degli intervalli-limite di riferimento per valutare la concentrazione totale di omocisteina nei diversi casi clinici: negli adulti sani il range di concentrazione è compreso tra i 5-15 μM; nei pazienti con lieve iperomocisteneimia tra i 15-15 μM; nei pazienti con intermedia iperomocisteneimia tra i 25-50 μM; infine nei pazienti con grave iperomocisteneimia tra i 50-500 μM. Questa condizione può essere dovuta, oltre che a mutazioni genetiche degli enzimi coinvolti nelle vie metaboliche dell'omocisteina e a carenze vitaminiche dovute ad una dieta

scorretta, anche ad insufficienza renale, la quale comporta una diminuzione nel funzionamento dell'attività del 5-metil-tetraidrofolato (derivato dell'acido folico), fonte di gruppi metile coinvolti nella rimetilazione dell'omocisteina ad opera della metionina sintasi<sup>23</sup>.

**Tab. 1.2: Cause dell'iperomocisteinemia.**

<b>Deficit enzimatici</b> Via della rimetilazione Metilene-tetraidrofolato reduttasi Metionina sintetasi Sintesi del coenzima Cobalamina Via della transsulfurazione Cistationina $\beta$ sintetasi	<b>Patologie</b> Anemia Perniciosa Insufficienza renale Ipotiroidismo Neoplasie (linfoblastica acuta, cancro del seno, dell'ovaio e del pancreas) Psoriasi severa
<b>Deficit nutrizionali nei cofattori vitaminici</b> Folati Vitamina B12 Vitamina B6	<b>Farmaci/agenti tossici</b> Antagonisti dei folati (methotrexate, fenitoina, carbamazepina) Antagonisti della Vitamina B6 (teofillina, azarabina, contraccettivi orali contenenti estrogeni) Fumo di sigaretta
<b>Età/Sesso</b> Aumento dell'età Sesso maschile Menopausa	

A livello molecolare sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare l'accumulo di omocisteina nel sangue, come lo stress ossidativo con formazione di radicali liberi e l'attivazione di fattori pro infiammatori, tuttavia le ipotesi più accreditate sono quelle della presenza di alterazioni nella funzione delle cellule endoteliali e di stress a livello del Reticolo Endoplasmatico (RE). Nel primo caso è stato riscontrato che tali cellule, che sono coinvolte nella regolazione e nel mantenimento della corretta efficienza del sistema vascolare, risultano essere molto sensibili ai livelli di omocisteina nel sangue e, dal momento che in esse non è espressa

<sup>23</sup> H. Jakubowski *et al.*, *Amino Acids* (2007) 32: p 562



la forma attiva della cistationina  $\beta$ -sintasi, non possono dar luogo alla via della tran solforazione e quindi smaltire quantità elevate di omocisteina. Questa situazione comporta un cambiamento nel loro carattere biologico da anticoagulanti a procoagulanti, contribuendo a dar luogo ad occlusioni arteriose periferiche e alla formazione di coaguli con rischio crescente di trombosi, oltre che ad altri danni cardio-vascolari, come l'aterosclerosi, infarti e ischemie cardiache<sup>24</sup>. Nel secondo caso invece sembrerebbe che lo stress del RE, ovvero l'accumulo di proteine unfolded e misfolded, sia causato dall'interruzione della formazione dei legami a ponte disolfuro e dal conseguente misfolding o addirittura unfolding delle proteine che devono essere sintetizzate. Tali proteine accumulate attivano un certo numero di fattori di trascrizione che comportano l'avvio della biosintesi dei trigliceridi e del colesterolo invece che l'"error-editing" delle proteine errate, con conseguente steatosi epatica (fegato grasso), particolarmente aggravata se il soggetto fa abuso di alcool (steatosi epatica alcolica: ridotta funzione di  $\beta$ -ossidazione dei lipidi nei mitocondri dell'RE e quindi successivo accumulo degli stessi). Da questa patologia possono derivare danni più o meno gravi, da semplici infiammazioni, ad una minore funzionalità del fegato fino all'apoptosi delle cellule epatiche e alla cirrosi terminale. A prescindere da queste condizioni anche lo stile di vita e il tipo di dieta adottata possono provocare un accumulo di omocisteina: in particolar modo un eccessivo consumo di carne rossa e uova, ricche di metionina che è coinvolta nel metabolismo dell'omocisteina, contribuisce ad innalzare i livelli di quest'ultima, mentre una dieta più equilibrata a base di verdure, cereali e vitamine, abbinata ad attività fisica costante, può aiutare a mantenerli nella norma<sup>25</sup>. A questo punto non resta che cercare di spiegare la relazione interconnessa tra l'iperomocisteinemia e il

---

<sup>24</sup> G. T. Russo e D. Cucinotta, *Ann Ist Super Sanità* 39, 2, (2003): p 156-157

<sup>25</sup> W. Velez-Carrasco *et al.*, *Journal of Nutritional Biochemistry* 19 (2008): p 362-370

diabete di tipo 2, uno dei principali scopi di questo paragrafo. Numerosi studi epidemiologici sono stati effettuati sulla valutazione dei livelli di omocisteina e di insulina nel sangue in soggetti sani e diabetici, normopeso e obesi e anche negli animali (per lo più ratti sani), allo scopo di confermare una possibile relazione tra l'iperomocisteinemia e l'insulino-resistenza, visti i simili meccanismi patogeni e fattori di rischio nelle complicanze cardiovascolari, micro- e macro-angiopatiche. Dai test effettuati in vivo sui ratti, divisi in due gruppi (uno di controllo e uno da testare), è stato notato che quelli di controllo, nutriti normalmente ma con un'aggiunta di acqua giornaliera non trattata, presentavano concentrazioni ematiche di glucosio, insulina e omocisteina nella norma, mentre quelli restanti, nutriti come i precedenti ma con un'aggiunta giornaliera di acqua contenente 100 mg/kg di omocisteina, presentavano dopo 50 giorni un significativo aumento del grado di insulino-resistenza e di iperomocisteinemia<sup>26</sup>. Dai test invece eseguiti invece in vivo su alcuni soggetti adulti (24 in tutto: sani e non obesi, con età media di 24 anni)<sup>27</sup> e su soggetti in età prepubertale (86 in tutto: 43 sani, come controllo, e 43 obesi, sia iperinsulinemici che non, con età comprese tra i 6 e i 9 anni)<sup>28</sup> sono state osservate le seguenti situazioni: nel primo caso il confronto tra i livelli di omocisteina totale a digiuno e dopo un pasto in funzione dell'utilizzo del glucosio, rilevando la presenza di insulino-resistenza (scarso utilizzo di glucosio) in corrispondenza di alte concentrazioni di omocisteina; nel secondo caso invece non sono state notate differenze tra i livelli di omocisteina dei soggetti sani e quelli dei soggetti obesi, ma ne sono state evidenziate di significative tra i bambini obesi iperinsulinemici (alte concentrazioni di omocisteina) e quelli non iperinsulinemici. Dai risultati di tali

---

<sup>26</sup> J. Golbahar *et al.*, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 76 (2007): p 1–5

<sup>27</sup> E.J. Giltay *et al.*, *Atherosclerosis*, 139 (1998): p 197–198

<sup>28</sup> R. Martos *et al.*, *Metabolism Clinical and Experimental*, 55 (2006): p 72– 77

studi, a prescindere dalle condizioni operative, è stata evidenziata l'associazione tra livelli alti di omocisteina e insulino-resistenza, ma certamente non è ancora chiaro quale sia il principio di causa-effetto di tale associazione, ovvero se sia l'iperomocisteinemia ad indurre insulino-resistenza o se sia invece la condizione patologica dell'iperinsulinemia a provocare elevati livelli di omocisteina nel plasma. Sembra però che sia più accreditata la prima ipotesi, ovvero che l'omocisteina ad alte concentrazioni riesca in qualche modo ad indurre l'insulino-resistenza. I risultati di alcuni esperimenti effettuati nel laboratorio che ho frequentato per il periodo del tirocinio e della tesi, hanno dimostrato che l'omocisteina è in grado di interagire con l'insulina determinando un cambiamento della sua struttura tridimensionale e perdita di funzionalità. Scopo di questa tesi è stato quello di studiare in modo più approfondito la natura dell'interazione tra insulina e omocisteina. Abbiamo analizzato le capacità leganti di tutti e 20 gli amminoacidi standard e di altri composti. In aggiunta abbiamo valutato l'abilità di varie forme dell'insulina ad interagire con l'omocisteina.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per i campioni impiegati in questo studio è stata utilizzata un'insulina umana ricombinante della Sigma-Aldrich (Cell culture test: 10 mg/mL in 25 mM di HEPES pH=8.2), diluita in tampone PBS (Dulbecco's phosphate buffer saline) in modo da ottenere la concentrazione 100  $\mu$ M.

Nei test le soluzioni di insulina sono state preparate sia a pH=7,4 che a pH=2. Nel primo caso i campioni di insulina 100  $\mu$ M in PBS sono stati preparati sia da soli, come controllo positivo, sia aggiungendo una quantità equimolecolare dei 20 amminoacidi, dei composti tiolici ridotti e ossidati (omocisteina,  $\beta$ -mercaptoetanololo, glutatione, N-acetilcisteina, acido cisteico) e di solfato. Le soluzioni di partenza dei diversi composti erano 50 mM in PBS e sono state poi diluite fino a 100  $\mu$ M. Nel secondo caso i campioni di insulina 100  $\mu$ M in PBS sono stati trattati con acidi diversi, ovvero con Acido Acetico, Acido Cloridrico, Acido Solforico e Formico, e analizzati sia da soli, come controllo, sia in presenza di omocisteina in quantità equimolecolare. Le soluzioni acide di insulina sono state preparate in modo da essere rispettivamente al 20% (pH=2), 20 mM (pH=1.6), 4 mM (pH=1.7) e 20 mM (pH=3): in presenza di omocisteina la soluzione di partenza era 50 mM ed è stata aggiunta a quelle precedenti in modo da essere diluita a 100  $\mu$ M.

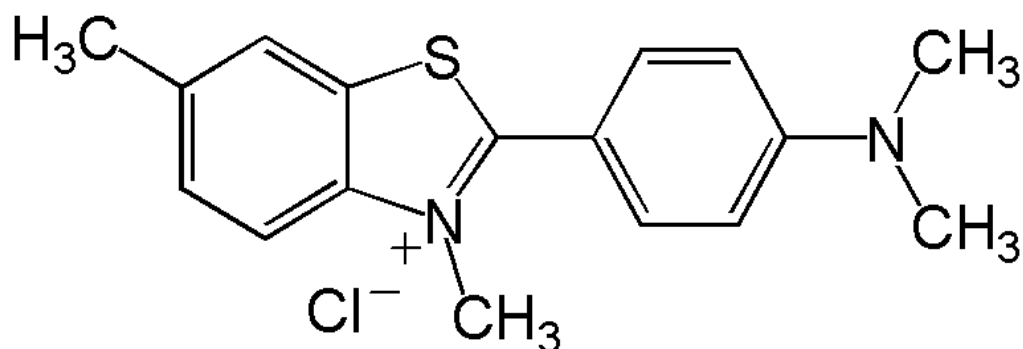
### 2.2. ANALISI DI AGGREGAZIONE

I campioni di insulina di controllo e di insulina trattata con omocisteina a pH=7.4 e a pH=2 (1 mL ciascuno) sono stati inseriti in fiale di vetro, disareati con N<sub>2</sub> e successivamente

sottoposti ad agitazione meccanica in un incubatore a 37 °C ad una velocità di 120 rpm per 24 ore.

### 2.3. ANALISI SPETTROFLUORIMETRICHE

Per questo tipo di analisi sono stati trattati i campioni descritti in precedenza con la Thioflavina T (ThT), una molecola in grado di legarsi selettivamente agli aggregati proteici, determinando un aumento dell'intensità di fluorescenza e uno spostamento del massimo di emissione a lunghezze d'onda maggiori. È stato utilizzato come strumento un fluorimetro Perkin-Elmer LS-55, impostando i seguenti parametri: lunghezza d'onda di eccitazione di 440 nm; range di emissione tra 450 e 600 nm; fenditura tra 4 e 2,5 nm; velocità di scansione 100 nm/min; accumulo (spettri acquisiti per campione) 3<sup>29</sup>; cuvetta con un cammino ottico di 2 mm; volume usato 1 mL. Le soluzioni per l'analisi al fluorimetro sono state preparate inserendo in Eppendorf 25 µL di campione e 975 µL di ThT diluita con tampone fosfato (soluzione di partenza di ThT: 100x) e aggiungendo un controllo positivo di sola Tht, in cui i 25 µL di campione sono stati sostituiti con altrettanti di tampone fosfato.



**Fig. 2.1:** Molecola di Tioflavina T.

<sup>29</sup> Dei tre spettri acquisiti è stata fatta la media.

#### 2.4. DICROISMO CIRCOLARE (CD)

La spettroscopia in dicroismo circolare è una tecnica polarimetrica che permette di misurare la differenza di assorbimento della luce polarizzata circolarmente a destra da quella polarizzata circolarmente a sinistra a differenti lunghezze d'onda, quando questa colpisce un campione otticamente attivo. Gli amminoacidi, ad eccezione della glicina, sono molecole chirali (non sovrapponibili alla propria immagine speculare), per cui anche le proteine, macrostrutture da essi derivate, risulteranno chirali e saranno in grado di interagire con la luce polarizzata.

Lo spettro, riportato in ellitticità  $[\theta]$  ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ) vs lunghezza d'onda (nm), permette di analizzare le conformazioni relative e assolute delle proteine in soluzione: in particolare dallo spettro in CD nel Far UV ( $\lambda < 240 \text{ nm}$ ) è possibile ottenere informazioni sulla proporzione relativa delle strutture secondarie nella proteina ( $\alpha$ -eliche,  $\beta$ -foglietti e random coil). Dallo spettro invece nel Near UV ( $\lambda > 240 \text{ nm}$ ) si rilevano indicazioni circa la struttura terziaria, ovvero l'organizzazione tridimensionale che la proteina adotta per svolgere la sua funzione biologica. Nei test effettuati lo spettro in CD è stato acquisito con uno spettropolarimetro Jasco J-810 nella regione del Near UV con i seguenti parametri: range di emissione tra i 360 e i 240 nm; temperatura 25 °C; velocità di scansione 100 nm/min; Accumulo 3<sup>30</sup>; cuvetta di quarzo con cammino ottico di 1 cm; Volume usato 1,5 mL. L'equazione usata per convertire il segnale in CD

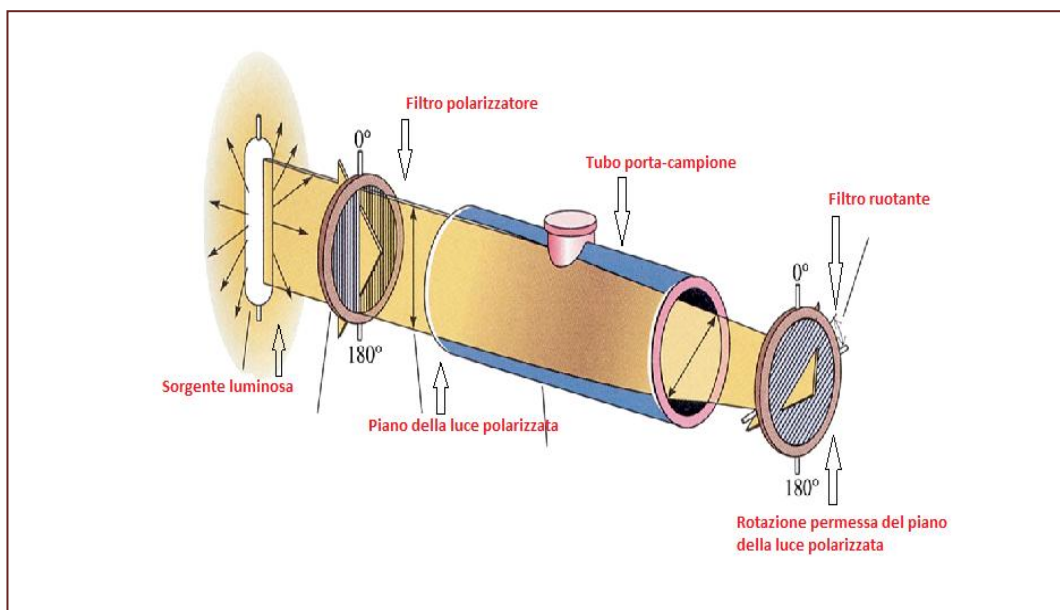
in ellitticità  $[\theta]$  è la seguente:  $[\theta] = \frac{CD}{\frac{mg/mL}{PM} \times 10 \times b \times r}$ , dove con

PM si indica il peso molecolare in g/mol, con 10 la costante dello strumento, con b il cammino ottico della cuvetta, nel nostro caso 1 cm, e con r i residui della proteina, 51 nel caso dell'insulina. Le analisi sugli spettri effettuati sono state basate sulle variazioni di

---

<sup>30</sup> Vedi nota 1

ellitticità dei diversi campioni in corrispondenza del segnale a 276 nm della Tirosina (presente nell'insulina), che sono riconducibili ad una variazione della struttura terziaria.

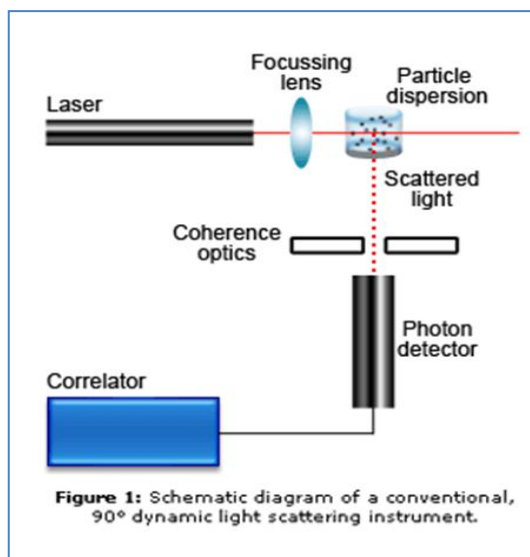


**Fig. 2.2:** Schema di uno spettropolarimetro.

### 2.5. LIGHT SCATTERING DINAMICO

Il Light Scattering è una tecnica fisica che consiste nell'interazione tra una radiazione elettromagnetica incidente su un campione gassoso o liquido e un "centro diffusore" (particelle del campione), portando ad una diffusione della radiazione stessa in tutte le direzioni.

In questa tesi è stata impiegata in particolare la tecnica del Light Scattering Dinamico, che misura le fluttuazioni di intensità della luce diffusa dovuta ai moti Browniani delle particelle del campione e, attraverso una funzione di correlazione, è in grado di metterle in relazione al raggio idrodinamico delle particelle stesse, ovvero il raggio di un ipotetica sfera rigida che diffonde con la stessa velocità della particella in esame.



**Fig. 2.3:** Schema di uno strumento di light scattering dinamico.

Tale raggio, calcolato sulla base delle proprietà diffusive delle particelle in esame, nel nostro caso dell'insulina, è ovviamente indicativo della dimensione apparente della particella solvatata, in quanto in soluzione essa è in realtà un'entità dinamica, con una forma non riconducibile ad un particolare solido geometrico. Nei test effettuati le misure sono state acquisite con lo strumento Zetasizer Nano S (Malvern) con laser He-Ne 633 nm, impostando i seguenti parametri: Accumulo 3<sup>31</sup>; Cuvetta di plastica di 1 cm a volume ridotto; Volume usato 1 mL.

## 2.6. PROGRAMMA DI SIMULAZIONE SWISSDOCK

Il programma di simulazione SwissDock è un web server svizzero che permette di prevedere le interazioni più probabili tra una proteina e una piccola molecola target, impiegando un accurato database di strutture chimico-molecolari ispirato al Ligand-Protein Database dell'Università del Michigan. Tale programma trova innumerevoli applicazioni, che vanno dalla protein engineering al drug design, vista la grande versatilità dei suoi

<sup>31</sup> Lo strumento riporta tre misure, ognuna delle quali è il risultato della media da un minimo di 10 ad un massimo di 40 acquisizioni (il numero varia a seconda dell'intensità del segnale diffuso)

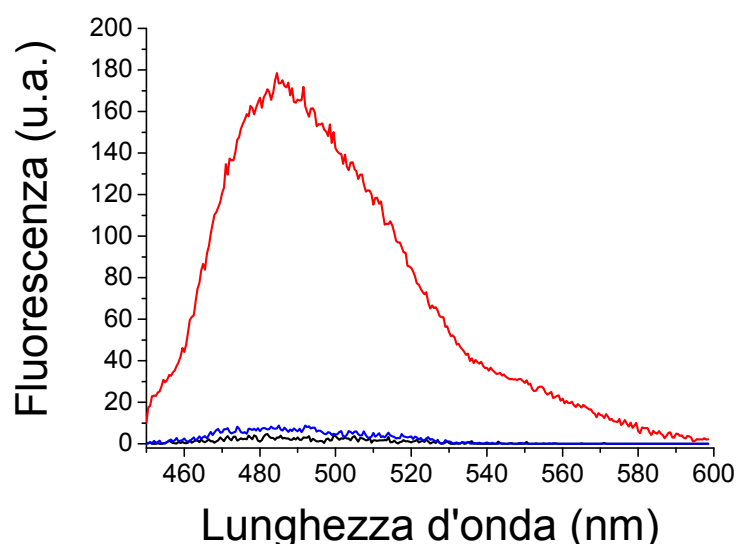


---

software e della sua interfaccia grafica. In questa tesi SwissDock è stato usato per determinare il possibile sito di binding tra l'insulina e l'omocisteina. Il programma in realtà ha indicato una serie di possibili siti di legame: per questo lavoro abbiamo preso in considerazione il sito di legame avente  $\Delta G^\circ$  più favorevole, cioè il modello di simulazione più probabile.

### 3.RISULTATI

Test eseguiti nel laboratorio che ho frequentato durante il periodo di tesi hanno dimostrato che l'omocisteina è in grado d'interagire con l'insulina, determinando una sua parziale inattivazione. Abbiamo quindi deciso di proseguire tali ricerche studiando sia la specificità d'azione che la modalità d'interazione tra omocisteina ed insulina. Dal momento che l'omocisteina è un amminoacido, abbiamo, in prima istanza, voluto verificare se anche altri amminoacidi fossero in grado di interagire con l'insulina.



**Fig. 3.1: Test di aggregazione dell'insulina.** Intensità di fluorescenza riportata in funzione della lunghezza d'onda. Il segnale in rosso (---) appartiene al campione di sola insulina (100  $\mu$ M); il segnale in blu (---) appartiene al campione con insulina e omocisteina (100  $\mu$ M in rapporto equimolecolare); il segnale in nero (---) appartiene infine al campione di sola Tioflavina T.

Per far questo abbiamo deciso di utilizzare, al posto della calorimetria, una tecnica più semplice e rapida, cioè un test di inibizione dell'aggregazione dell'insulina. Infatti è noto che l'insulina è una proteina dotata di relativa stabilità

conformazionale e, in condizioni di blanda agitazione, può essere facilmente indotta ad aggregare. In presenza di ligandi in grado di complessarsi all'insulina, tale fenomeno risulta rallentato o addirittura inibito. Per confermare l'ipotesi del legame dell'omocisteina all'insulina, abbiamo eseguito un test preliminare utilizzando un campione contenente la sola insulina ed un campione contenente insulina ed una quantità equimolecolare di omocisteina. Le soluzioni sono state trasferite in fiale di vetro le quali sono state sigillate e trasferite in un agitatore orbitale termostato alla temperatura di 37°C. Dopo 24 ore di agitazione a 37°C, i campioni sono stati recuperati ed analizzati utilizzando la Tioflavina T, una sonda fluorescente in grado di monitorare la presenza di aggregati proteici. I risultati ottenuti sono riportati nelle Fig. 3.1. Come possiamo osservare, gli spettri di fluorescenza mostrano, nel caso del campione contenente la sola insulina, un segnale di forte intensità, mentre, nel caso del campione incubato in presenza di omocisteina, un segnale di fluorescenza molto debole, e comparabile con quello della stessa Tioflavina T. Tale risultato dimostra che l'omocisteina ha determinato la completa inibizione del processo di aggregazione. Alla luce dei dati a nostra disposizione, possiamo affermare che tale effetto è attribuibile ad una maggiore stabilità dell'insulina determinata dal legame con l'omocisteina.

In base a tale principio abbiamo effettuato altri test per valutare le proprietà antiaggreganti dei 20 amminoacidi standard. Il test consisteva nel diluire una aliquota di insulina in presenza di una quantità equimolecolare dei vari amminoacidi. I risultati sono riportati in Fig. 3.2 (A e B).

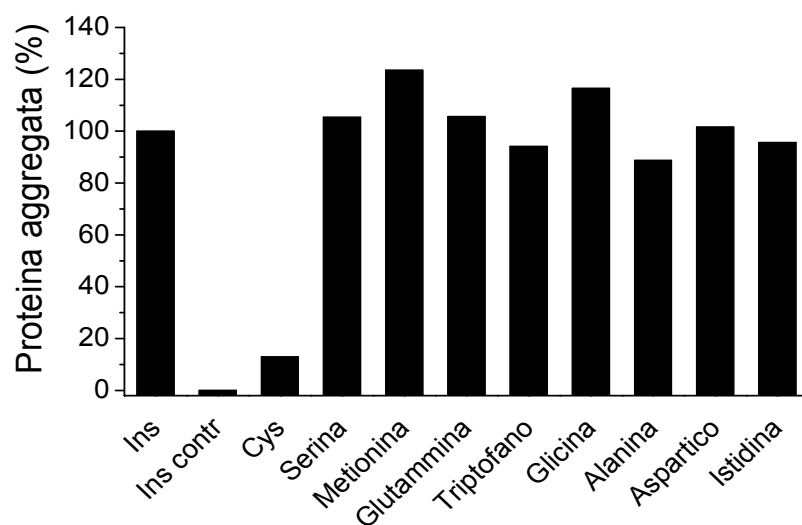


Figura 3.2.A

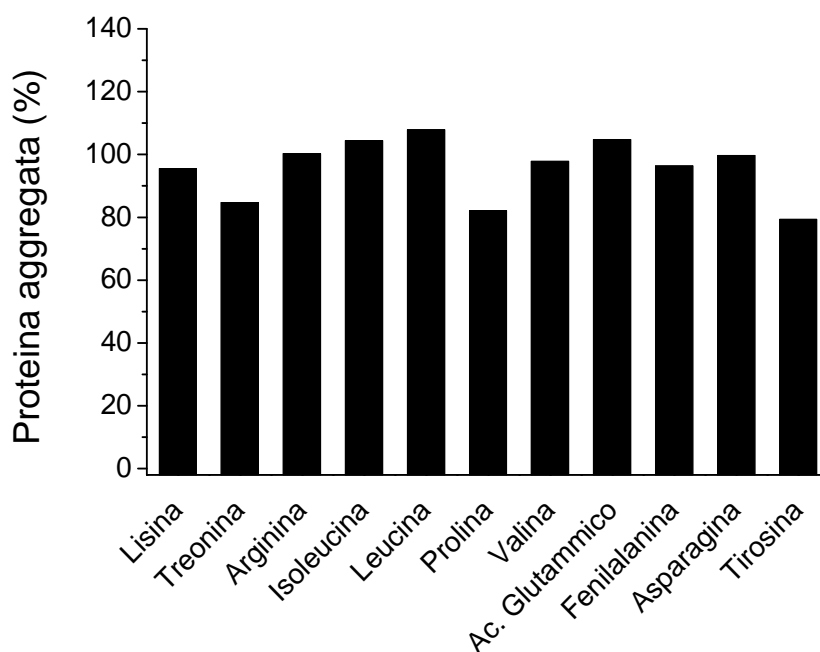


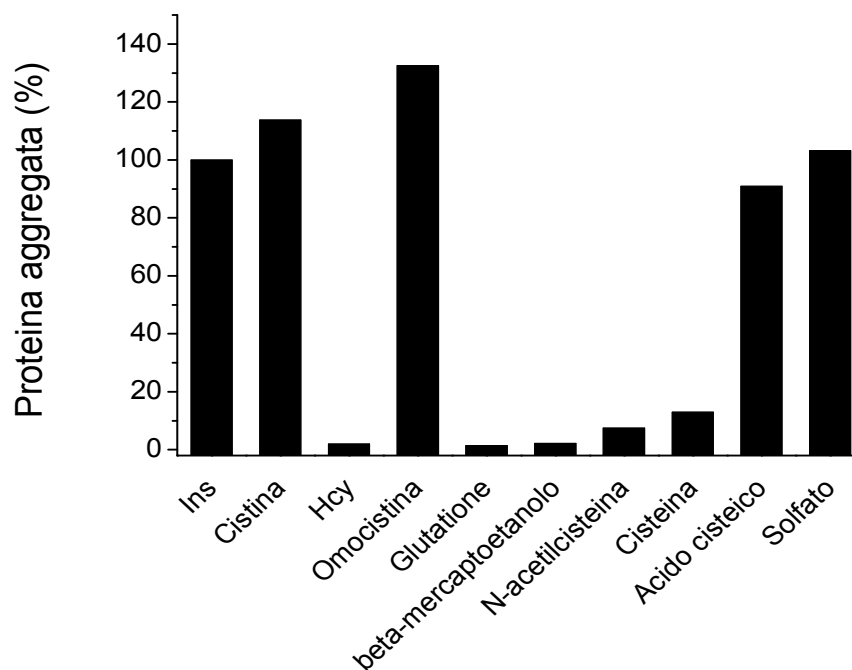
Figura 3.2.B

**Fig. 3.2 (A e B): Test di aggregazione dell'insulina.** Grafici ad istogramma della quantità percentuale di insulina aggregata relativa ai campioni contenenti i 20 amminoacidi standard. Nella figura A sono anche riportati, a sinistra, due istogrammi relativi al campione contenente insulina da sola, agitato e incubato a 37°C, e al campione contenente sempre insulina, incubato a 37°C ma non sottoposto ad agitazione. [I grafici sono stati ottenuti dalla normalizzazione dei dati di intensità di fluorescenza a 485 nm rispetto al campione agitato contenente insulina da sola, tramite il programma Origin].

Come possiamo osservare, dopo 24 ore, in campione contenete la sola insulina risulta completamente aggregato. Al contrario, il campione contenente la medesima quantità di insulina, ma non agitato, dopo 24 ore non presenta aggregati. Con l'eccezione della sola cisteina, tutti gli amminoacidi testati, non sembrano in grado di inibire, in modo sostanziale, il fenomeno dell'aggregazione. Al contrario la cisteina è in grado di ridurre di circa il 90% l'aggregazione dell'insulina. Da tali risultati sembra quindi che la capacità d'inibire l'aggregazione sia legata alla presenza di un gruppo tiolico. In aggiunta è interessante osservare che la metionina, l'altro amminoacido solforato, è privo di attività inibitoria; un risultato del tutto simile è stato osservato utilizzando la serina, un amminoacido analogo alla cisteina ma che presenta un gruppo -OH al posto del gruppo tiolico. Questo risultato rafforza ancora di più l'ipotesi dell'importanza del gruppo tiolico nel legame con l'insulina.

Da qui il passo successivo è stato quello di effettuare la stessa tipologia di test anche per altri composti, sia tiolici, come la cisteina e l'omocisteina, che inorganici, ma sempre contenenti l'elemento zolfo. La scelta di tali composti è ricaduta sia su molecole di interesse fisiologico e non, presenti in forma tiolica ridotta aventi strutture più o meno complesse (glutathione,  $\beta$ -mercaptoetanololo e N-acetilcisteina), in forma tiolica ossidata derivate dalla cisteina e dall'omocisteina (cistina e omocistina), e infine in forme in cui lo zolfo figura in differenti stati di ossidazione (acido cisteico e solfato). Questa selezione è stata effettuata analizzando i vari gruppi funzionali presenti sull'omocisteina e individuando molecole in cui fosse possibile isolare ciascuno di essi, in maniera tale da riuscire ad evidenziare il gruppo o i gruppi coinvolti nel legame tra l'insulina e

omocisteina. Per esempio il  $\beta$ -mercaptoetanolo è stato scelto perché presenta la stessa catena alifatica dell'omocisteina ma è privo dei gruppi carbossilico e amminico tipici degli amminoacidi. Il risultato dei test effettuati con i nuovi composti è riportato nella Fig. 3.3.



**Fig. 3.3: Test di aggregazione dell'insulina.** Grafico ad istogramma della quantità percentuale di insulina aggregata relativa ai campioni contenenti i diversi composti tiolici e non. Nel grafico è anche riportato, a sinistra, l'istogramma relativo al campione contenente insulina da sola, agitato e incubato a 37°C. [I grafici sono stati ottenuti dalla normalizzazione dei dati di intensità di fluorescenza a 485 nm rispetto al campione di sola insulina, tramite il programma Origin].

Risulta quindi chiaro che gli unici composti in grado di impedire in maniera sostanziale l'aggregazione dell'insulina sono proprio i tioli, ovvero il glutazione, il  $\beta$ -Mercaptoetanolo e l'N-acetilcisteina, con valori di proteina aggregata intorno al 3-8%. Al contrario le forme tioliche ossidate, così come l'acido cisteico e il solfato sembrano del tutto inefficaci. Questo risultato sembrerebbe

pertanto indicare che la chiave per comprendere il legame dell'omocisteina con l'insulina sia riposta nel gruppo funzionale idrofobico -SH.

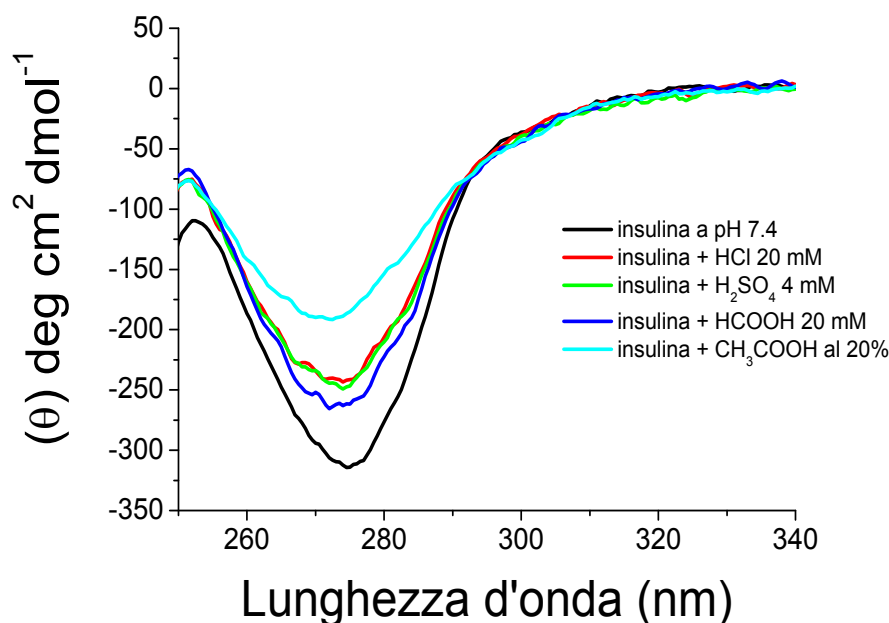
Per completare il quadro sugli effetti dell'omocisteina sull'inibizione dell'aggregazione dell'insulina, abbiamo poi concentrato l'attenzione anche sulle diverse forme in cui si può presentare l'insulina in soluzione (monomeric, dimeric, tetrameric ed esameric), al fine di poter individuare quale delle diverse strutture fosse in grado o meno di interagire con l'omocisteina. L'isolamento di tali forme è stato possibile lavorando a pH acido in presenza di acidi diversi, ricreando le condizioni operative adottate negli esperimenti riportati negli studi sulle strutture acide dell'insulina condotti da L. Nielsen *et al.* e da J. L. Whittingham *et al.*<sup>32</sup>, a cui abbiamo fatto riferimento in questa parte della tesi. Per prima cosa abbiamo riconfermato i dati riportati nei due precedenti studi, in particolare gli esperimenti effettuati in Dicroismo Circolare, per valutare l'effettiva presenza di tali specie in soluzione<sup>33</sup>. Per eseguire il test in CD abbiamo preparato un campione a pH=7.4 contenente insulina da sola e quattro campioni a pH acido contenenti acido acetico al 20%, acido cloridrico 20 mM, acido formico 20 mM e acido solforico 4 mM, in maniera tale da isolare rispettivamente la forma esameric, monomeric, dimeric, tetrameric e un equilibrio di forme dimeriche e monomeric. Confrontando lo spettro in CD ottenuto con quelli riportati in letteratura, è stato possibile confermare la presenza effettiva delle diverse specie in tali condizioni operative e valutare le piccole ma significative differenze di segnale di ellitticità  $[\theta]$ ,

---

<sup>32</sup> L. Nielsen *et al.*, *Biochemistry*, Vol. 40, 20, (2001): p 6036-6046; J. L. Whittingham *et al.*, *Journal of Molecular Biology*, 318, (2002): p 479-490

<sup>33</sup> L. Nielsen *et al.*, *Biochemistry*, Vol. 40, 20, (2001): p 6041

dovute a minime ma importanti differenze nella struttura terziaria dei diversi campioni (Fig. 3.4).

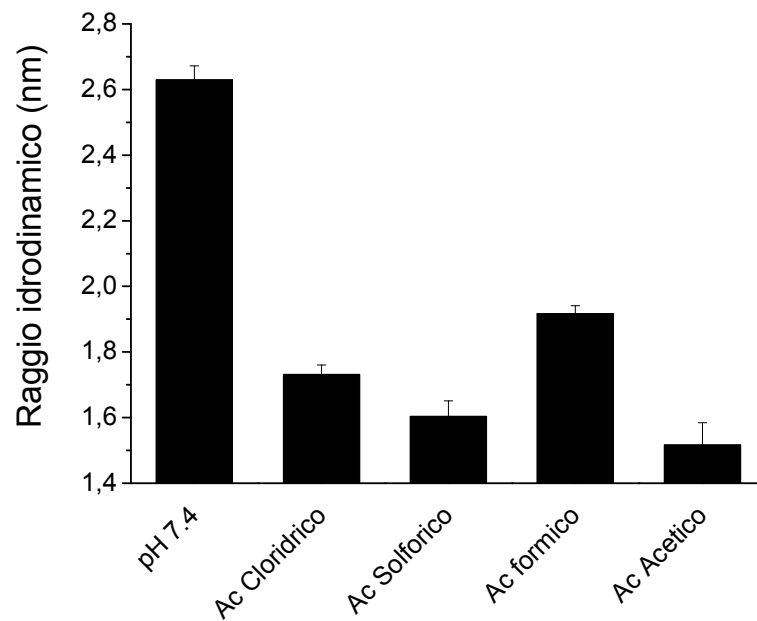


**Fig. 3.4: Test in CD.** Ellitticità  $[\theta]$  dei vari campioni a pH acido riportata in funzione della lunghezza d'onda. [I dati di ellitticità sono stati ottenuti dai valori registrati in CD, applicando la formula matematica presente nel capitolo "Materiali e Metodi", tramite il programma Origin].

Tale test è stato poi ulteriormente riconfermato dagli esperimenti di light scattering dinamico, dai quali è stato possibile ricavare informazioni sul raggio idrodinamico delle specie presenti negli stessi campioni preparati per il CD. I risultati sono riportati in Fig. 3.5. Dai dati ottenuti è evidente che il raggio idrodinamico maggiore, 2.6 nm, risulta quello del campione contenente insulina da sola a  $\text{pH}=7.4$ , riconducibile alla specie esamerica e che il raggio idrodinamico minore, 1.5 nm, risulta invece quello del campione di insulina in presenza di acido acetico, riconducibile evidentemente alla specie monomerica. I raggi idrodinamici intermedi invece, ovvero quelli dei campioni in



presenza di acido formico (1.9 nm) e di acido cloridrico (1.7 nm), hanno dimensioni che, se considerate in rapporto proporzionale a quelle delle altre forme strutturali, confermerebbero la presenza rispettivamente delle specie tetrameriche e dimeriche.

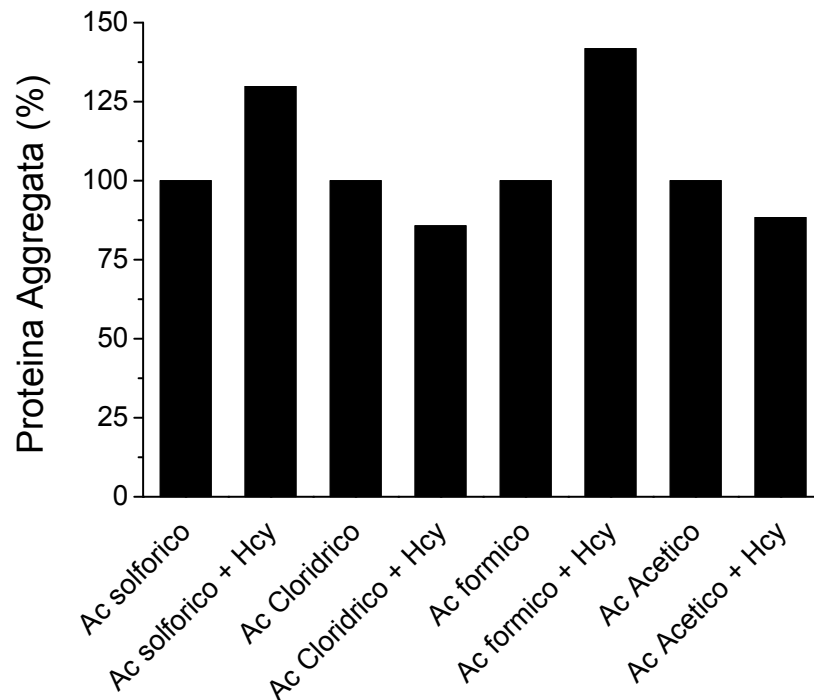


**Fig. 3.5: Test di light scattering.** Raggio idrodinamico riportato per i campioni a pH=7.4 e a pH acido con il relativo errore associato. [Delle varie misure ottenute con lo strumento sono stati calcolati la media e l'errore associato tramite il programma Origin]

Per quanto riguarda il raggio idrodinamico del campione di insulina in acido solforico, è importante notare che, sebbene il risultato ottenuto non sia riconducibile a nessuna delle specie precedenti, il valore 1,6 nm è in grado di confermare la presenza di un equilibrio tra forme diverse (monomeriche e dimeriche) affermata precedentemente, in quanto intermedio tra 1,7 nm (forma dimerica) e 1,5 nm (forma monomeriche).

A questo punto è stato possibile ripetere i test di aggregazione precedenti, lavorando però nelle nuove condizioni operative a pH acido con i diversi acidi, in modo da valutare la tendenza o meno dell'omocisteina ad inibire l'aggregazione rispettivamente delle

forme monomeric, dimeric e tetrameric. Il test è stato effettuato utilizzando campioni contenenti insulina da sola in presenza degli acidi elencati in precedenza e campioni contenenti insulina trattata con l'omocisteina in presenza dei suddetti acidi, incubati sempre a 37°C per 24 ore.



**Fig. 3.6: Test di aggregazione a pH acido.** Grafico ad istogramma percentuale di insulina aggregata relativa ai campioni acidi e trattati in presenza di omocisteina con i suddetti acidi. [I grafici sono stati ottenuti dalla normalizzazione dei dati di intensità di fluorescenza a 485 nm dei campioni trattati con omocisteina rispetto ai campioni di insulina trattati solo con acidi, tramite il programma Origin]

A conferma di quanto affermato nello studio di J. L. Whittingham *et al.*<sup>34</sup>, tutte le soluzioni di insulina a pH acido presentavano una notevole tendenza all'aggregazione, con la sola differenza nella velocità (alta in presenza di Acido Solforico, media nel caso

<sup>34</sup> J. L. Whittingham *et al.*, Journal of Molecular Biology, 318, (2002): p 480

dell'HCl e dell'Acido Formico, molto lenta in Acido Acetico<sup>35</sup>). I risultati ottenuti sono riportati in Fig. 3.6.

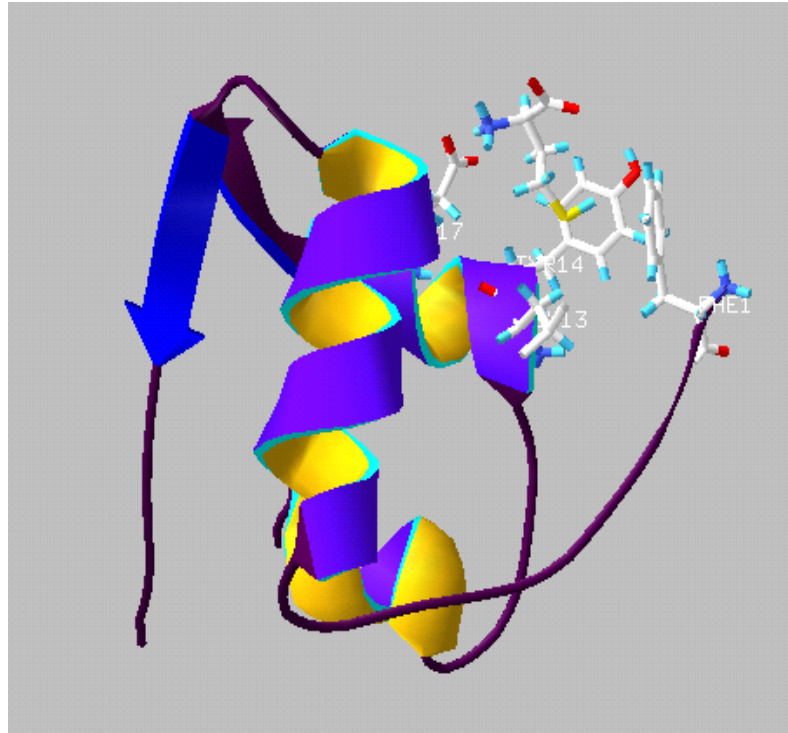
Dall'analisi dei dati di fluorescenza risulta evidente che l'omocisteina a pH acido, a differenza di quanto invece notato nei campioni contenenti insulina trattata con l'omocisteina a pH=7.4, non è in grado di inibire il fenomeno dell'aggregazione dell'insulina. L'ipotesi che si potrebbe supporre, alla luce dei risultati ottenuti, è che probabilmente a pH acido l'insulina possa aver subito una qualche modifica strutturale (protonazione di residui amminoacidici, eventuali spostamenti di elementi di struttura secondaria ecc...), in grado di alterare il sito di legame dell'omocisteina e di conseguenza la sua capacità di stabilizzare l'insulina.

Come ultima analisi, utilizzando un programma di simulazione Swiss-PDBViewer<sup>36</sup>, abbiamo cercato di individuare il sito di interazione tra l'insulina e l'omocisteina. A tale scopo è stata usata, per comodità di visualizzazione, la struttura del monomero tridimensionale dell'ormone a pH=7.4 e un modello di struttura dell'omocisteina. Le immagini ottenute sono state riportate nella Fig. 3.7. Il programma di simulazione ha individuato diversi siti di legame, in base al livello di affinità tra l'omocisteina e l'ormone. Il sito di maggior affinità vede l'omocisteina in corrispondenza dell'N- terminale della catena B dell'insulina. Analizzando l'immagine possiamo notare che il gruppo tiolico dell'omocisteina è collocato in una tasca formata dai residui fenilalanina B1, leucina A13, tirosina A14 ed Acido glutammico A17 (vedi particolare in Fig. 3.8).

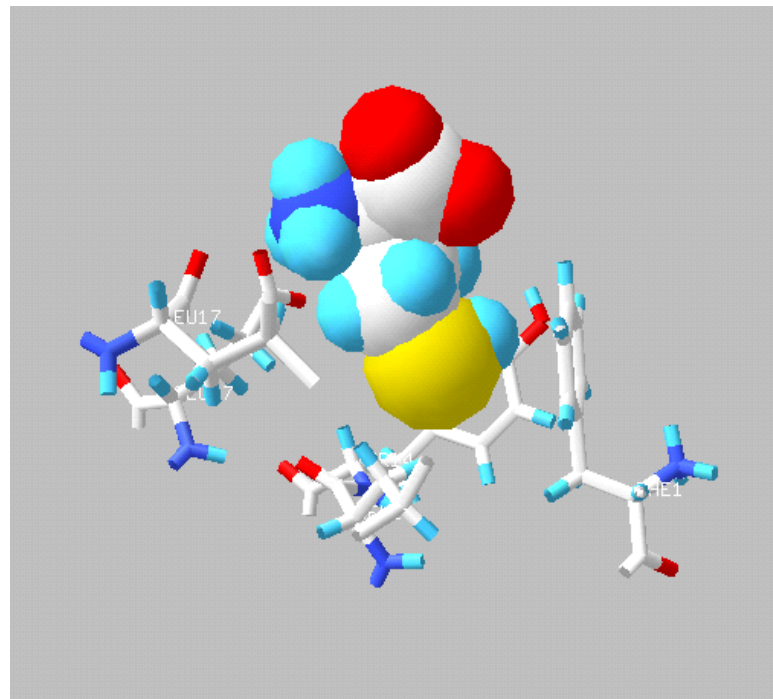
---

<sup>35</sup> Tramite controllo durante la fase di incubazione a 37 °C nelle 24 ore

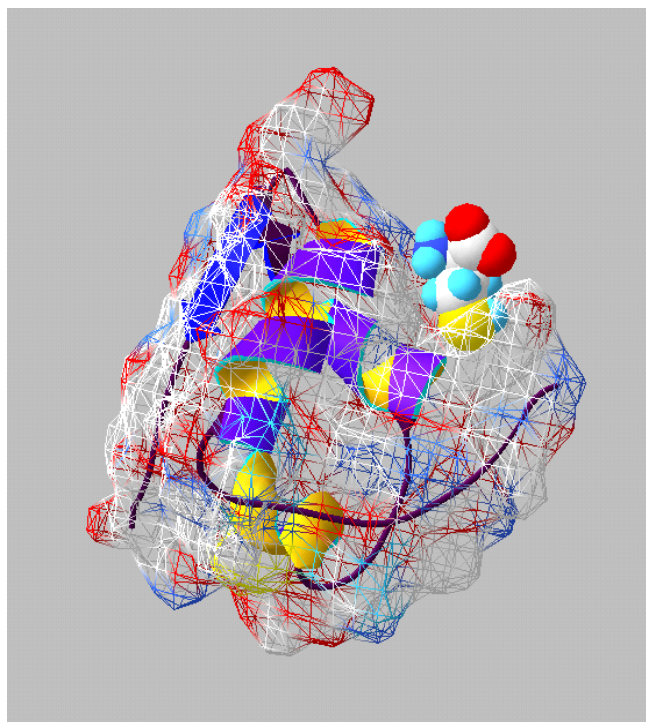
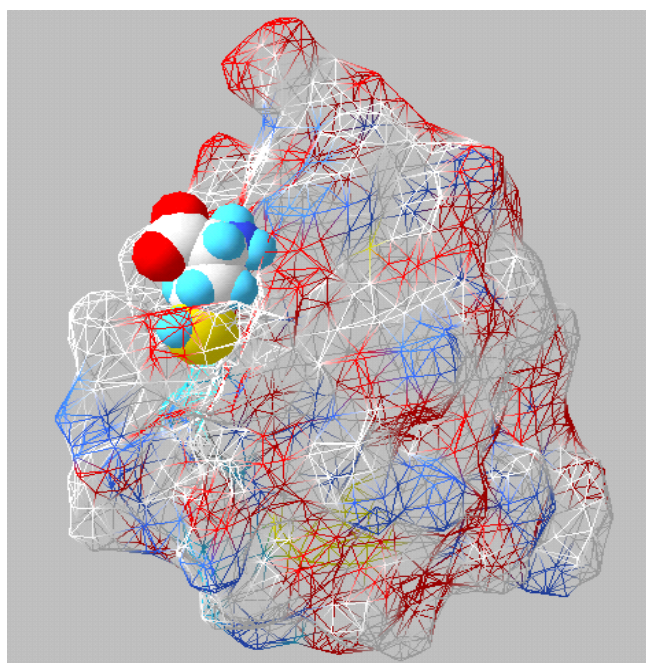
<sup>36</sup> Guex, N. and Peitsch, M.C., *Electrophoresis* **18**, (1997) : p 2714-2723.



**Fig. 3.7: Struttura tridimensionale dell'insulina complessata con l'omocisteina.** Nella figura sono messi in evidenza i residui dell'ormone posti nelle vicinanze dell'omocisteina con le classiche strutture a bastoncini bianchi, rossi, blu, azzurri e gialli in figura (da sinistra a destra: PheB1, LeuA13, TyrA14, GluA17).

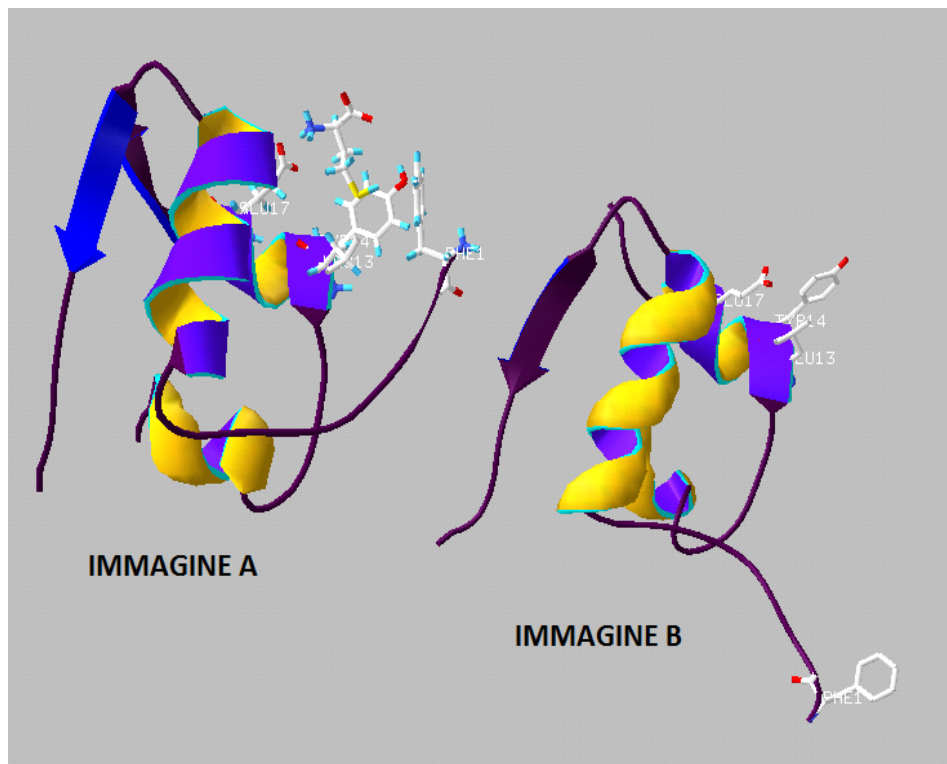


**Fig. 3.8: Particolare della struttura tridimensionale.** In figura è stato riportato l'ipotetico sito di binding della Fig. 3.7, in cui però l'omocisteina, per evitare confusione, è stata qui evidenziata con la struttura a balloon.

**Figura 3.9.A****Figura 3.9.B**

**Fig. 3.9 (A e B): Rappresentazione delle superfici elettrostatiche della proteina.** Nell'immagine la tasca idrofobica in cui si inserisce il gruppo tiolico dell'omocisteina è evidenziata con la struttura a balloon. La figura A riporta una prospettiva frontale con il gruppo amminico in azzurro e bianco in avanti; la figura B riporta invece una prospettiva da dietro con il gruppo carbossilico in rosso e bianco in avanti.

Per rendere ancora più chiaro il tipo di interazione, abbiamo evidenziato con il programma le superfici elettrostatiche del complesso proteico, ovvero la fitta trama di cariche dei residui amminoacidici della proteina. Le immagini relative sono riportate nella Fig. 3.9 (A e B), che mostrano due prospettive diverse di visualizzazione dell'omocisteina. Risulta subito visibile come il gruppo tiolico dell'omocisteina si inserisca perfettamente nella tasca fortemente idrofobica creata dai residui suddetti, dando luogo ad una struttura fortemente stabilizzata.



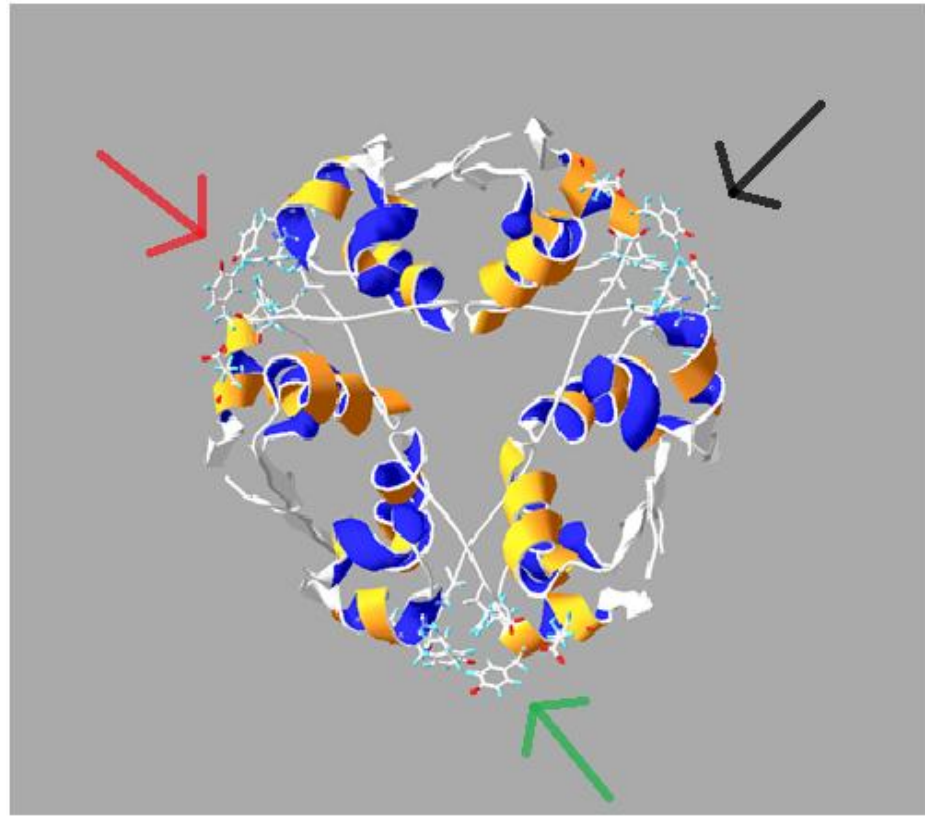
**Fig. 3.10: Struttura tridimensionale del monomero dell'insulina a pH 7.4 (Immagine A) e a pH acido (Immagine B).** Nell'immagine B risulta evidente come il sito di binding si perda completamente per via dell'allontanamento del loop della catena B in cui è presente il residuo di fenilalanina (Phe1).

Confrontando le strutture tridimensionali dell'insulina ottenuta a pH 7.4 con quella ottenuta a pH acido (vedi Fig. 3.10), possiamo notare che le due strutture sono molto simili, anche se alcune

differenze risultano evidenti. A pH acido, la zona compresa tra i residui B1-B8 assume una conformazione differente a quella osservata a pH 7.4: in questa nuova configurazione il residuo B1 non partecipa più alla formazione della tasca di legame per l'omocisteina. Questa osservazione potrebbe in parte contribuire a spiegare alcuni tra i risultati osservati, per esempio la mancata protezione dall'aggregazione a pH acido.

Infine, per completare il quadro strutturale relativo al binding dell'insulina con l'omocisteina, abbiamo inserito anche l'immagine della struttura esamerica dell'insulina a pH=7.4, evitando di riportare, come fatto in precedenza, i nomi dei residui amminoacidici coinvolti e la struttura dell'omocisteina per maggiore chiarezza visiva. L'immagine è riportata in Fig. 3.11.

Risulta subito evidente nella figura la presenza di tre siti ipotetici di binding, uguali tra loro, in grado di interagire con il gruppo tiolico dell'omocisteina. In particolare è importante osservare che i residui coinvolti nella formazione di ciascuna tasca idrofobica, nella struttura esamerica, sono posizionati in catene polipeptidiche adiacenti, che non appartengono allo stesso dimero bensì a dimeri diversi. Questo dato potrebbe suggerire la presenza di una qualche forma di cooperatività di legame tra l'omocisteina e l'insulina. Tale fenomeno potrebbe contribuire a rafforzare il legame del tiolo con l'ormone, determinando così una fortissima stabilizzazione conformazionale dell'insulina esamerica, evento che potrebbe spiegare i risultati osservati.



**Fig. 3.11: Struttura dell'esamero dell'insulina.** Con le tre frecce nera, rossa e verde sono stati indicati i tre ipotetici siti di binding con l'omocisteina, uguali tra loro, i cui residui sono stati riportati con la classica struttura a bastoncini bianchi, rossi, blu e azzurri.



## 4. DISCUSSIONE

L'insulina è un ormone che, sebbene di piccole dimensioni, ricopre un ruolo estremamente importante nella regolazione del metabolismo del glucosio a livello cellulare. È stato osservato che cambiamenti conformazionali nella struttura dell'insulina o la mancata attivazione delle proteine coinvolte nella sua via di segnalazione, siano essi dovuti a fattori genetici o ambientali, possono comportare una parziale o addirittura totale perdita dell'attività metabolica dell'ormone. A livello dell'organismo tale fenomeno manifesta effetti fisiopatologici quali l'insulino-resistenza e, in ultima istanza, il diabete mellito di tipo II. Questi in generale risultano caratterizzati da elevati valori di glicemia e alterazioni delle vie metaboliche degli acidi grassi, della glicogenolisi, della gluconeogenesi, che a lungo andare, se non tenuti sotto controllo, possono portare a gravi conseguenze cardiovascolari e cerebrali. I meccanismi molecolari che innescano il fenomeno dell'insulino-resistenza non sono, ad oggi, ancora del tutto chiare. Alcune ricerche hanno anche messo in evidenza una relazione tra l'insulino-resistenza e l'iperomocisteinemia, una patologia associata ad elevati livelli di omocisteina nel sangue. Le ipotesi proposte per spiegare le cause di tale relazione sono molte: dalle disfunzioni a livello della via metabolica della metionina, allo stress ossidativo del reticolo endoplasmatico, fino all'attivazione di fattori pro infiammatori e all'alterazione della funzionalità delle cellule endoteliali.

In questa tesi abbiamo cercato di proporre un'ulteriore ipotesi alla relazione tra l'insulino-resistenza e l'iperomocisteinemia. Nel laboratorio nel quale effettuato il lavoro di tesi, è stato osservato

che l'omocisteina è in grado di interagire con l'insulina ed alterarne la funzione. Tuttavia, nessun dato è ancora disponibile riguardo alla natura dell'interazione tra insulina ed omocisteina. Nell'ambito di questa tesi abbiamo utilizzato un semplice test di inibizione dell'aggregazione per analizzare la capacità di legame con l'insulina, oltre dell'omocisteina, dei 20 amminoacidi standard. Abbiamo così osservato che, ad eccezione della cisteina, nessuno degli amminoacidi è in grado di interagire con l'insulina. Il passo successivo è stato poi quello di analizzare il comportamento di altre molecole in cui fosse presente lo zolfo in maniera tale da valutare quale forma solforata fosse in grado di inibire l'aggregazione. I test effettuati hanno dimostrato che solo i composti che presentano in gruppo tiolico (-SH) sono in grado di interagire con l'insulina ed inibire l'aggregazione. Per completare il quadro abbiamo poi voluto determinare l'abilità delle varie forme strutturali in cui si presenta l'insulina (monomerica, dimerica, tetrameric ed esamerica) ad interagire con l'omocisteina, dopo aver confermato la loro effettiva presenza in soluzione. Per far questo abbiamo lavorato in condizioni di pH neutro (forma esamerica) e di pH acido ottenute usando acidi diversi per arricchire il campione delle varie forme dell'insulina: monomerica, dimerica e tetrameric. Il risultato è stato che a pH acido non è presente alcun tipo di protezione dall'aggregazione dell'insulina. Ciò suggerisce che a pH acido l'insulina possa aver subito una qualche modifica strutturale in grado di alterare l'interazione con l'omocisteina. Infine, con la simulazione effettuata utilizzando il programma SwissDock siamo riusciti ad individuare un possibile sito di binding tra l'omocisteina e l'insulina a pH=7.4. Il sito di binding risulta formato dai residui PheB1, LeuA13, TyrA14 e GluA17. Questi insieme formano una tasca fortemente idrofobica in cui il gruppo

tiolico dell'omocisteina si inserisce perfettamente, stabilizzando l'intera struttura. Tale tasca invece si perde a pH acido, in quanto il loop contenente la PheB1 risulta maggiormente distanziato dalla catena A dove sono presenti gli altri residui. Nella struttura esamerica, in particolare, i residui coinvolti nel legame con l'omocisteina si posizionano in modo tale da generare tre siti identici di binding. Per tale motivo l'omocisteina, legandosi a tali siti, potrebbe determinare una forte stabilizzazione dell'insulina esamerica impedendo così la sua dissociazione nel monomero, la forma biologicamente attiva. Ciò potrebbe spiegare la diminuzione dell'attività e, di conseguenza, il fenomeno dell'insulino resistenza associata ad alti livelli plasmatici di omocisteina.

Se confermati, tali risultati potrebbero fornire una spiegazione ancora più approfondita del perché l'insulina, in condizioni di iperomocisteinemia a livello fisiologico, non funzioni più correttamente.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad A., Millett I. S., Doniach S., Uversky V. N., Fink A. L.; "Partially Folded Intermediates in Insulin Fibrillation"; *Biochemistry*; 2003.
- De Lorenzi R., Gritti C.; "Verso il primo farmaco ricombinante: Insulina"; EMBL for ELLS (European Learning Laboratory for Life Sciences); 2010.
- Duckworth W. C., Bennett R. G., Hamel F. G.; "Insulin Degradation: Progress and Potential"; *Endocrine Reviews*; 1998.
- Dunn M. F.; "Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer – a review"; *Bio Metals*; 2005.
- Fröjdö S., Vidal H., Pirola L.; "Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of the current evidence from humans", *Biochimica et Biophysica Acta*; 2009
- Giltay E.J. , Hoogeveen E.K. , Elbers J.M.H., Gooren L.J.G., Asscheman H., Stehouwer C.D.A.; "Insulin resistance is associated with elevated plasma total homocysteine levels in healthy, non-obese subjects"; *Atherosclerosis*; 1998
- Golbahar J. , Aminzadeh M. A., Kassab S. E. , Omrani G. R.; "Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male Sprague-Dawley rats"; *Diabetes Research and clinical practise*; 2007.
- Goldstein B.J.; "Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus"; *Am J Cardiol*; 2002.
- Grosdidier A., Zoete V., Michielin O.; "SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS" and "Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS"; Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Quartier Sorge, Bâtiment Génopode, CH-1015 Lausanne, Switzerland.
- Guex N., Peitsch M. C.; "Swiss-Model and the Swiss-PDBViewer: An environment for comparative protein modeling"; *Electrophoresis*; 1997.
- Hua Q.; "Insulin: a small protein with a long journey"; *Protein & cell*; 2010.
- Huang K., Maiti N. C., Phillips N. B., Carey P. R., Weiss M. A.; "Structure-Specific Effects of Protein Topology on Cross- $\beta$ - Assembly: Studies of Insulin Fibrillation"; *Biochemistry*; 2006.
- Hillis G. S., Woodward M., Rodgers A., Chow C.K., Li Q., Zoungas S., Patel A., Webster R., Batty G. D., Ninomiya T., Mancina G., Poulter N. R., Chalmers J.; "Resting heart rate and the risk of death and cardiovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus"; *Diabetologia*; 2012.
- Jakubowski H., Twardowski T., Perla-Kajàn J.; " Mechanisms of homocysteine toxicity in humans"; *Amino Acids*; 2007.

- Lehninger A. L.; "Biochimica: le basi molecolari della struttura e della funzione cellulare"; Zanichelli; 1979
- Martos R.T., Valle M., Morales R., Canête R., Gavilan M. I., Sàncnez-Margalet V., Kang S.S., Wong P.W., Malinow M.R.; "Hyperhomocysteinemia correlates with insulin-resistance and low-grade sistemi infammation in obese prepubertal children"; Metabolism Clinical and Experimental; 2006.
- Nielsen L., Khurana R., Coats A., Frokjaer s., Brange J., Vyas S., Uversky V. N., Fink A. L.; "Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism"; Biochemistry; 2001.
- Panunti B., Jawa A. A., Fonseca A.A.; "Mechanisms and therapeutic targets intype 2 diabetes mellitus"; Drug discovery Today: Disease Mechanisms; 2004.
- Russo G. T., Cucinotta D., "Iperomocisteinemia e rischio cardiovascolare nel diabete mellito"; Ann Ist Super Sanità; 2003.
- Schrijvers E.M.C., Witteman J.C.M., Sijbrands E.J.G., et al.; "Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: The rotterdam Study"; Neurology; 2010.
- Stumvol M., Goldstein B. J., van Haeften T. W.; "Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy"; The Lancet; 2005.
- Schalinske K. L.; "Interrelationship between Diabetes and Homocysteine metabolism: Hormonal regulation of Cystathionine  $\beta$ -Synthase"; nutritional Reviews; 2003.
- Velez-Carrasco W., Merkel M., Twiss C. O., Smith J. D.; "Diethary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice"; Journal of nutritional Biochemistry; 2008.
- Whittingham J. L., Scott D. J., Chance K., Wilson A., Finch A., Brange J., Dodson G. G.; "Insulin at pH 2: Structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation"; Journal of Molecular Biology; 2002.
- Wilson K., Walker J.; "Metologia biochimica: le bioscienze e le biotecnologie"; edizione italiana a cura di Pilone M. S. e Pollegioni L.; Cortina Raffaello; 2001.
- Youngren J. F.; "Regulation of insulin receptor function"; Cellular and Molecular Life Sciences; 2007.