



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica
Curriculum Scienze Chimiche

Effetto dello ione specifico sull'aggregazione dell'Insulina in fibrille amiloidi

Specific ion effect on the aggregation of Insulin in amyloid fibrils

Relatore

Pierandrea Lo Nostro

Correlatore

Gabriella Caminati

Candidato

Viola Tinti

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	- 1 -
1.1 LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE	- 1 -
1.2 AGGREGAZIONE DI PROTEINE IN FIBRILLE AMILOIDI	- 5 -
1.3 SERIE DI HOFMEISTER	- 9 -
1.4 FENOMENI DI AGGREGAZIONE DELL'INSULINA	- 12 -
1.5 SCOPO DELLA TESI	- 17 -
CAPITOLO 2: TECNICHE SPERIMENTALI	- 18 -
1.4 SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS	- 18 -
1.5 SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA	- 19 -
1.6 <i>CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY (CLSM)</i>	- 21 -
1.7 SPETTROSCOPIA DI DICROISMO CIRCOLARE	- 24 -
CAPITOLO 3: MATERIALI E PROCEDURE SPERIMENTALI	- 28 -
3.1 MATERIALI	- 28 -
3.2 PROCEDURE SPERIMENTALI	- 29 -
CAPITOLO 4: RISULTATI SPERIMENTALI	- 32 -
4.1 CARATTERIZZAZIONE DI INSULINA UMANA IN SOLUZIONE ACIDA	- 32 -
4.2 CARATTERIZZAZIONE FOTOFISICA DELLE SOLUZIONI DI TIOFLAVINA T IN SOLUZIONE ACQUOSA (PH=7 E PH=1.6)	- 33 -
4.3 STUDIO DELLA CINETICA DI FIBRILLAZIONE DELL'INSULINA	- 36 -
4.4 AGGREGAZIONE DELL'INSULINA IN PRESENZA DI SALI	- 39 -
4.5 ANALISI CINETICA DELLE CURVE DI AGGREGAZIONE	- 44 -
4.6 INTERPRETAZIONE DELL'EFFETTO DELLO IONE SPECIFICO	- 48 -
4.7 ANALISI STRUTTURA SECONDARIA DELLE FIBRILLE MATURE TRAMITE MISURE DI DICROISMO CIRCOLARE (CD)	-
51 -	
4.8 STUDIO DELLA MORFOLOGIA DEGLI AGGREGATI MATURI TRAMITE CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY (CLSM)	- 55 -
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI	- 60 -
CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA	- 61 -

Prefazione

In questo progetto di tesi ci siamo proposti di studiare il meccanismo di formazione delle fibrille amiloidi e, in particolare, l'effetto che diversi anioni, a parità di controione e a diverse concentrazioni, producono sulla cinetica di aggregazione proteica. Il deposito di fibrille o placche amiloidi nel tessuto cerebrale causa malattie neurodegenerative che compaiono in età avanzata, anche se in realtà il processo fisiopatologico inizia molto tempo prima della comparsa dei sintomi; è quindi importante approfondire lo studio riguardo al meccanismo di formazione di tali fibrille, come questo venga modificato in presenza di sali e se sussista un effetto dello ione specifico.

Il sistema che indaghiamo in questo progetto di tesi è costituito da Insulina, usata come proteina modello per l'aggregazione in fibrille amiloidi, e sali di sodio (NaCl, NaF, NaBr, NaI, e NaSCN) a due diverse concentrazioni (0.1 M e 0.5 M).

Per analizzare la cinetica di aggregazione proteica, in funzione degli anioni e delle loro concentrazioni, abbiamo usato come tecnica fotofisica la spettroscopia di emissione di fluorescenza, utilizzando come sonda fluorescente la Tioflavina T (ThT). Misure di Dicroismo Circolare ci hanno permesso di ottenere informazioni sulla struttura secondaria degli aggregati fibrillari maturi e, in particolare, sulla presenza in percentuale di porzioni ricche di β -sheets e di come questa varia in funzione del sale. Misure di *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) abbinate all'acquisizione di spettri di emissione spazialmente risolti per i vari domini di aggregati presenti nel campione ci hanno aiutato a comprendere la morfologia degli aggregati maturi in funzione dell'anione.

La cinetica di aggregazione in fibrille amiloidi dell'Insulina risulta essere influenzata dalla presenza in soluzione di anioni diversi, i quali cambiano notevolmente il profilo cinetico rispetto a quello osservato in loro assenza. In particolare a forze ioniche più alte (concentrazione 0.5 M) si nota un effetto maggiormente marcato dovuto al cambiamento delle interazioni elettrostatiche ed idrofobiche.

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Le malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative sono patologie del sistema nervoso centrale che comportano la disfunzione o la morte progressiva delle cellule nervose ed il deterioramento delle sinapsi, ossia i collegamenti tra i neuroni responsabili della trasmissione degli impulsi nervosi.¹

Fanno parte delle malattie neurodegenerative patologie come l'Alzheimer, il morbo di Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica (nota come *SLA*) e la corea di Huntington. I sintomi di queste patologie variano a seconda del numero e del tipo di cellule che vengono danneggiate e, in generale, possono comportare deficit cognitivi e di memoria, alterazioni motorie e disturbi psicologici e comportamentali che peggiorano progressivamente con l'avanzare del tempo. Il morbo di Alzheimer comporta deterioramento cognitivo e deficit di memoria, il morbo di Parkinson difficoltà motorie e problemi cognitivi, la *SLA* scomparsa dei motoneuroni e atrofia muscolare, la corea di Huntington deficit cognitivi e modificazioni della personalità.

Nonostante le diversità che contraddistinguono le patologie degenerative (sintomi clinici e progressione della malattia), queste sembrano condividere alcune caratteristiche quali sporadici collegamenti genetici, comparsa in età avanzata e identico meccanismo patologico (*misfolding*, aggregazione, accumulo delle proteine nel cervello e morte delle cellule neuronali per *apoptosi*).²

Le malattie neurodegenerative, infatti, sono causate da variazioni conformazionali delle proteine, normalmente solubili, che causano aggregazione e conseguente formazione di fibrille amiloidi insolubili, le quali si vanno a depositare in diversi tessuti o organi dell'organismo (cervello, fegato, milza e reni)³. Il fatto che queste patologie siano caratterizzate dal deposito di placche amiloidi insolubili gli conferisce il nome di malattie amiloidi o *amiloidosi*. Tutte le funzioni vitali dipendono dalle proteine e, come noto, la variazione della struttura di una proteina

porta ad una alterazione o perdita della specifica funzione, come avviene nelle malattie neurodegenerative. Le proteine acquistano spontaneamente la corretta struttura tridimensionale che gli permette di svolgere adeguatamente la propria funzione (processo di *fold*ing); l'errato ripiegamento della struttura terziaria di una proteina (*misfold*ing) facilita la formazione di aggregati fibrillari che provocano malattie di tipo degenerativo. Le placche amiloidi sono aggregati stabili e insolubili di natura proteica, con struttura ordinata e regolare ricca di β -sheets;⁴ queste placche mostrano caratteristiche morfologiche e strutturali simili, ma provocano diversi effetti di natura chimica e biologica a seconda di dove si depositano, soprattutto se in zone intra-cellulari o extra-cellulari (Figura 1.1).¹ A conferma di questo, è stato osservato che proteine, diverse in termini di dimensioni, struttura e funzione biologica nella loro struttura nativa, spesso tendono ad acquisire forme indistinguibili di fibrille amiloidi.⁵

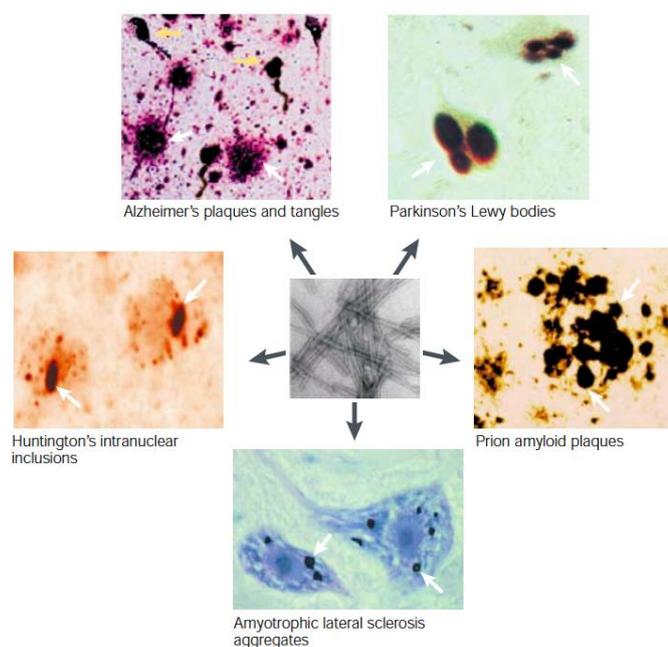


Fig. 1.1 *Aggregati cerebrali responsabili di malattie neurodegenerative: le frecce gialle indicano placche amiloidi extracellulari, mentre quelle bianche intracellulari.*¹

Nel caso della malattia di Alzheimer, il responsabile della formazione delle placche amiloidi è considerato il peptide β -amiloide (sequenza formata da 40-42 amminoacidi) che converte la sua conformazione strutturale da α -elica a β -foglietto; le fibrille insolubili responsabili dell'insorgere di questa patologia si depositano all'interno del cervello nelle zone della corteccia cerebrale e

dell'ippocampo, importanti aree destinate ad apprendimento e memoria, come mostrato in figura 1.2.⁶

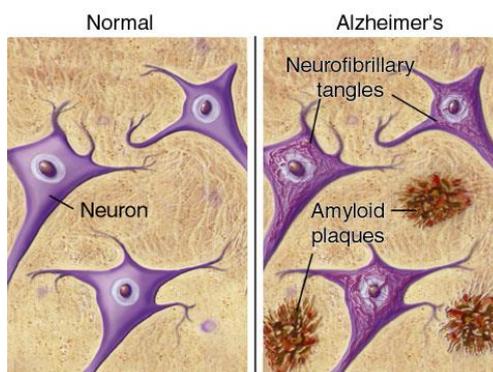


Fig. 1.2 Confronto tra cellule neuronali sane e in presenza del morbo di Alzheimer: nel secondo caso si osservano placche amiloidi formate dall' aggregazione in fibrille del peptide β -amiloide ($A\beta$).

In vivo circa 20-25 tipi di proteine diverse, non correlate tra di loro, sono in grado di formare fibrille amiloidi con struttura di tipo β ed ognuna di esse dà origine a una patologia di tipo neurodegenerativo distinta, come mostrato in Tabella 1.1.⁷

In realtà, è stato scoperto che la capacità di formare strutture amiloidi non è una caratteristica solo di queste proteine, ma più in generale, di tutte le catene polipeptidiche; inoltre, anche aggregati amiloidi di proteine non direttamente collegate al manifestarsi della patologia sono in grado di compromettere il corretto funzionamento delle cellule.⁸

Tab. 1.1 Patologie associate all'aggregazione di diverse proteine precursori.⁷

Patologia	Proteina Precursore
Morbo di Alzheimer	Peptide β amiloide
Morbo di Parkinson	α -Sinucleina
Morbo di Huntington	Huntingtina
Sclerosi laterale amiotrofica	Superoxide dismutase 1
Amiloidosi localizzata	Insulina

Solitamente l'organismo adotta un meccanismo di difesa nei confronti del *misfolding* delle proteine basato sull'utilizzo di particolari enzimi di degradazione (*chaperon molecolari*). Questi infatti garantiscono il corretto funzionamento delle proteine rimuovendo quelle mal assemblate e bloccando il processo di

aggregazione in fibrille amiloidi.¹ Nel caso delle patologie neurodegenerative sembra che questo meccanismo fallisca dando origine ad un accumulo di proteine *misfoldate* e non funzionanti.

È già stato accennato che una peculiarità delle malattie neurodegenerative è la loro comparsa in età avanzata; queste non vengono diagnosticate fino all'insorgere dei primi sintomi clinici, cioè quando sono già presenti danni neurologici. In realtà il processo fisiopatologico delle malattie neurodegenerative inizia già molti anni prima del manifestarsi dei sintomi clinici, con la comparsa degli oligomeri antecedenti alla formazione delle placche amiloidi. La diagnosi definitiva delle malattie neurodegenerative può essere ottenuta solo *post-mortem* attraverso prove istologiche, tra cui l'autopsia del tessuto cerebrale, che evidenziano la presenza di depositi amiloidi.

È importante ampliare le conoscenze riguardo al processo di formazione di fibrille amiloidi per poter contribuire a mettere a punto nuove strategie terapeutiche e preventive;⁹ c'è ancora molto da comprendere sia riguardo al meccanismo di aggregazione delle proteine e della formazione di strutture amiloidi, sia riguardo a come queste strutture siano in grado di alterare le funzioni degli organi nei quali si depositano. Nel corso degli ultimi quindici anni, però, le patologie da aggregazione proteica sono state oggetto di numerose ricerche che hanno portato con sé importanti nuove informazioni.¹⁰

Una recente ricerca ipotizza che le condizioni patologiche non siano dovute ai depositi di placche amiloidi, ma alla formazione di aggregati intermedi solubili, ovvero gli oligomeri.¹¹ Sebbene la correlazione fra il processo di fibrillazione e le patologie sia indiscutibile, i meccanismi che stanno alla base della tossicità sono ancora poco chiari; la tossicità sembra derivare dalla capacità degli oligomeri di danneggiare le cellule, interagendo in modo non corretto con le membrane cellulari attraverso legami (ancora non è chiaro se specifici o aspecifici) con i recettori di membrana.^{1,11} A conferma di ciò, placche amiloidi sono state trovate anche in individui che non mostrano presenza di malattie neurodegenerative; inoltre studi *post-mortem* mostrano che negli individui affetti dalla patologia, la gravità di quest'ultima non sembra direttamente proporzionale alla quantità di placche amiloidi depositate.¹²

È stato ipotizzato che l'aggregazione delle proteine in fibrille sia un modo dell'organismo per proteggersi dalla tossicità degli oligomeri, tuttavia, essendo i depositi amiloidi in equilibrio dinamico con gli oligomeri, potrebbero funzionare da riserva assumendo un ruolo non più protettivo nei confronti delle cellule cerebrali.¹

1.2 Aggregazione di proteine in fibrille amiloidi

Le proteine tendono a perdere la loro conformazione nativa (processo di *misfolding*) dando origine ad intermedi parzialmente denaturati che, esponendo al solvente zone idrofobiche normalmente nascoste all'interno della struttura terziaria della proteina, aumentano la possibilità di interazioni tra le proteine creando le condizioni adatte per l'aggregazione in strutture organizzate.^{12,13} La formazione di intermedi denaturati, cioè gli oligomeri, dà origine a nuclei che hanno alta tendenza all'aggregazione e sono in grado di "accogliere" ulteriori monomeri, aumentando così le dimensioni delle fibrille in crescita (*protofibrille*) e dando origine ad aggregati fibrillari amiloidi con struttura *cross-β* (processo di *nucleazione e crescita*, schematizzato in figura 1.3).¹³

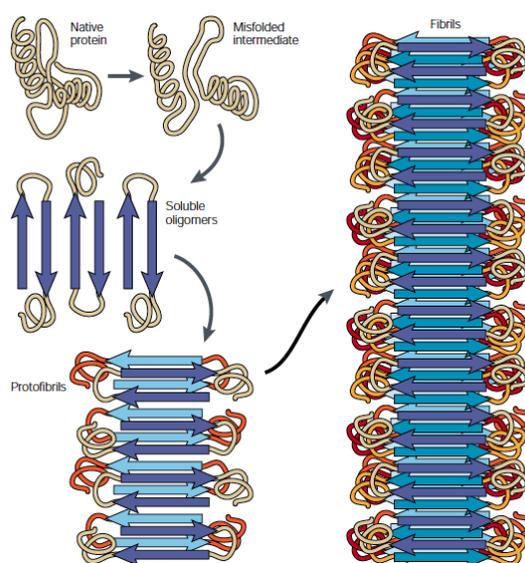


Fig. 1.3 Rappresentazione schematica della via metabolica che conduce al misfolding e all'aggregazione di proteine.¹

In seguito all'aumento della concentrazione locale degli oligomeri, le proteine tendono ad aggregarsi in fibrille mediante processi di *self-assembly*; ⁶ questi processi garantiscono un guadagno entalpico, associato all'impaccamento regolare delle strutture, che compensa la diminuzione di entropia e favorisce il processo.

La formazione di fibrille amiloidi coinvolge tre diversi stadi di reazione: la nucleazione che corrisponde alla formazione di nuclei stabili (specie oligomeriche solubili), la crescita (allungamento dei nuclei in fibrille) e la precipitazione.¹³

La cinetica di fibrillazione delle proteine può essere studiata attraverso misure di emissione di fluorescenza, usando come sonda fluorescente la Tioflavina T; la cinetica segue un andamento di tipo sigmoidale ed è caratterizzata dalla presenza di tre diverse fasi (Figura 1.4)¹³: *lag phase*, dove non viene apprezzato nessun cambiamento di intensità di fluorescenza, *growth phase*, in cui l'intensità di fluorescenza aumenta esponenzialmente, e *equilibrium phase* dove l'intensità di fluorescenza raggiunge un "plateau" che indica la fine della formazione di fibrille.

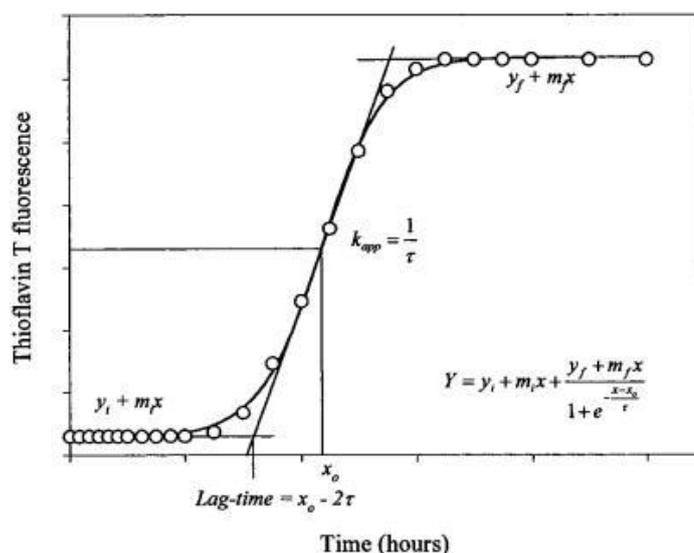


Fig. 1.4 Intensità di fluorescenza della Tioflavina T in funzione del tempo (ore), sono ben visibili i tre andamenti della curva: lag phase, growth phase e equilibrium phase.¹³

Questo tipico andamento sigmoidale è stato osservato per proteine come l'insulina, il peptide β -amiloide e l' α -sinucleina.¹³

La *lag phase* sembra dipendere dal tempo necessario alla formazione di oligomeri solubili, cioè il *lag time*; questa fase risulta essere estremamente cruciale visto il ruolo nocivo che gli oligomeri sembrano assumere nelle malattie neurodegenerative.¹³

È noto dalla letteratura che le fibrille amiloidi possono essere analizzate con microscopia elettronica in trasmissione (TEM), microscopia a forza atomica (AFM), diffrazione di raggi X, dicroismo circolare (CD) e spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR).^{6,14} Dati ottenuti dall'utilizzo della diffrazione di raggi X, rivelano che il *core* delle fibrille amiloidi è costituito da 2 a 6 unità di *protofibrille* e possiede una struttura *cross-β* in cui i β -*strands* si dispongono parallelamente all'asse della fibrilla, mentre i β -*sheets* perpendicolarmente (Figura 1.5). Misure di diffrazione a raggi X dimostrano anche che la distanza di separazione tra i β -*strands* lungo l'asse della fibrilla è 4.7 Å, mentre quella tra i β -*sheets*, perpendicolari all'asse della fibrilla, è 8-11 Å.¹⁵

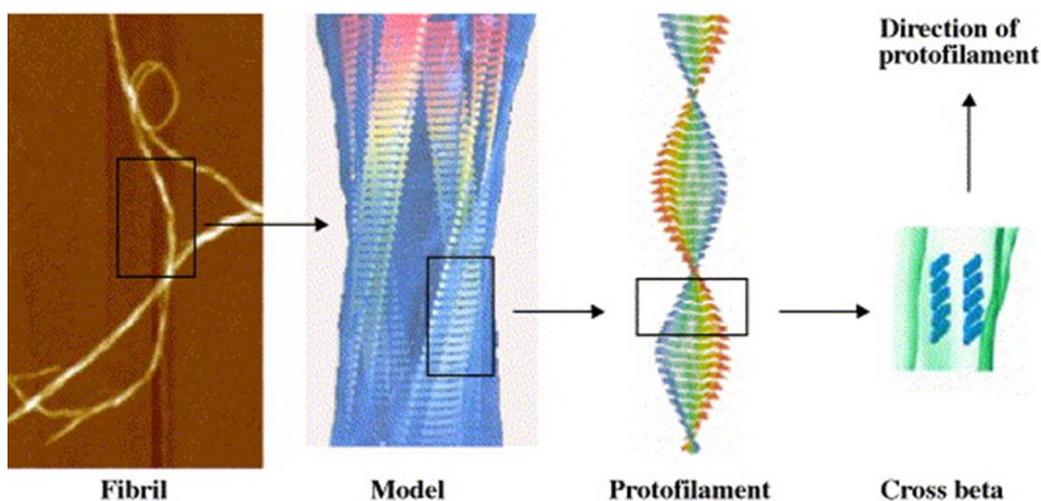


Fig. 1.5 Organizzazione strutturale di una fibrilla amiloide; quattro protofilamenti sono avvolti tra di loro in una struttura simile ad una corda, ogni β -sheet è disposto perpendicolarmente all'asse della fibrilla e la struttura è di tipo *cross β*.

I protofilamenti possono interagire tra di loro lateralmente per formare strutture simili a nastri (lunghi 30 nm e spessi 2-5 nm)^{14,16}, oppure possono avvolgersi per formare fibrille simili a corde (lunghe 7-13 nm)^{17,18 e 19}.

Sembra che il *core* delle fibrille amiloidi sia stabilizzato principalmente grazie a legami a idrogeno tra i β -*sheets* (Figura 1.6) e da interazione idrofobiche tra le catene laterali degli amminoacidi, disposte esternamente rispetto alla struttura *cross-β*, che costituiscono lo scheletro peptidico.²⁰

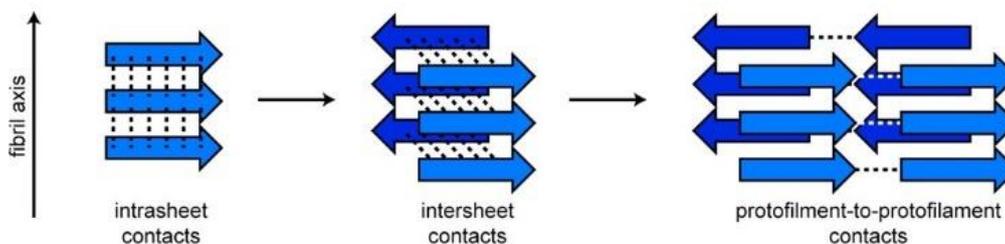


Fig. 1.6 Le linee tratteggiate evidenziano la posizione dei legami ad idrogeno tra i β -strands e tra i β -sheets all'interno della fibrilla.²⁰

Le strutture finali delle fibrille dipendono da fattori cinetici e termodinamici (interazioni catena laterale-catena laterale e catena laterale-solvente) che intervengono per far assumere alla fibrilla uno degli stati conformazionali con energia libera di attivazione corrispondente ad uno dei minimi energetici del loro profilo.⁶ Sotto questo punto di vista si può considerare che le proteine, durante il processo di fibrillazione, si comportino come dei polimeri, esplorando più stati conformazionali e stabilizzandosi in quello a più bassa energia.⁶ Viceversa, le proteine naturali, nella loro forma nativa, assumono una struttura tridimensionale che è unica, specifica e funzionale per l'organismo; lo stato nativo è situato nel minimo assoluto del profilo energetico che dipende dalla sequenza amminoacidica della specifica proteina (Figura 1.7).⁶

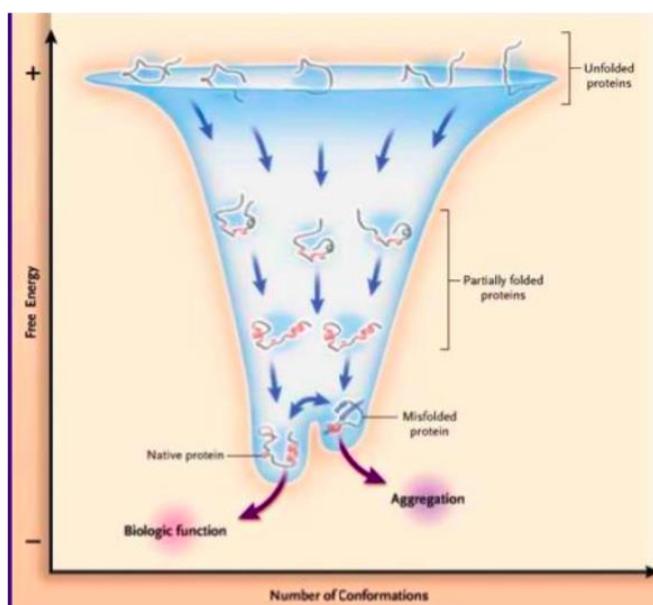


Fig 1.7 In grafico sono riportate le diverse conformazioni assunte dalla proteina che corrispondono a diversi valori di energia libera; la proteina nativa e la proteina aggregata in fibrille sono situate nei minimi di energia libera di attivazione.

La capacità di un polipeptide di formare fibrille amiloidi dipende da diversi fattori, ad esempio proteine con sequenze amminoacidiche ricche di residui idrofobici, povere di residui di Prolina e aventi basse cariche nette hanno un'alta propensione verso la formazione di amiloidi.²¹ È importante sottolineare che il processo di fibrillazione è strettamente correlato alle condizioni chimico-fisiche dell'ambiente circostante alle proteine e che particolari cambiamenti possono innescarlo. Sono considerate implicate nell'innescio del processo variazioni di pH, pressione, temperatura, agitazione, forza ionica e composizione del solvente o del co-solvente (presenza di sali in soluzione).²² La presenza dei sali riesce ad influenzare la stabilità delle proteine attraverso interazioni non-covalenti specifiche, schermando le interazioni elettrostatiche e alterando le proprietà del sistema proteina-solvente (effetti di Hofmeister).²¹

1.3 Serie di Hofmeister

La serie di Hofmeister consiste in una serie semiquantitativa che riflette la capacità degli ioni di precipitare una proteina (effetto *salting-out*) o di aumentarne la solubilità (effetto *salting-in*). In realtà, la presenza degli ioni risulta influenzare numerosi parametri relativi alle proteine oltre alla solubilità, come per esempio la stabilità, l'aggregazione, la conformazione (forme folded e unfolded) e pertanto anche la denaturazione.^{23,24}

Franz Hofmeister, l'ideatore della serie, condusse esperimenti sulla proteina albumina (ottenuta dall'albume di uovo di gallina) e su altri sistemi colloidali studiando gli effetti in presenza di diversi sali.²⁴

Gli ioni responsabili dell'aumento di solubilità e della diminuzione di stabilità delle proteine vengono chiamati *caotropici* (capaci di disordinare la struttura dell'acqua), mentre quelli che hanno effetti contrari, cioè maggiore stabilità e minore solubilità, vengono chiamati *cosmotropici* (capaci di ordinare la struttura dell'acqua). Anioni di piccole dimensioni e con alta carica, come fluoruro e solfato, appartengono alla classe degli ioni *cosmotropici*, mentre i grandi ioni monovalenti, come tiocianato e ioduro, sono considerati *caotropici* (Figura 1.8).

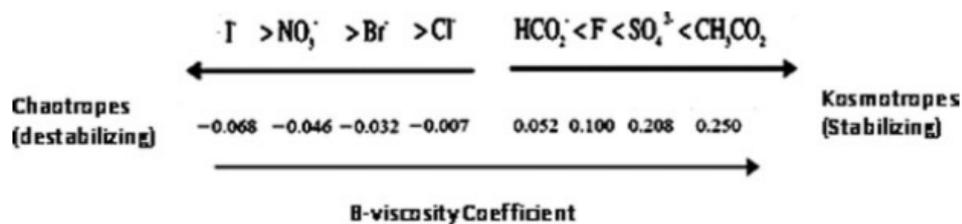


Fig. 1.8 Sali della serie di Hofmeister: la kosmotropicità e la chaotropicità di ogni sale può essere compresa dalla posizione delle due frecce.²

La carica, la dimensione e proprietà specifiche come la polarizzabilità, l'energia libera di idratazione e l'incremento molare della tensione superficiale degli ioni influiscono sul loro comportamento in soluzione e alle interfasi. In generale ioni *kosmotropi* sono in grado di ordinare intorno a sé molecole di acqua destabilizzando l'interazione tra l'acqua e la proteina; viceversa, se gli ioni non sono in grado di ordinare l'acqua (*chaotropi*) allora stabilizzeranno le interazioni tra l'acqua e la proteina.

A questo proposito, giova ricordare che il discioglimento di un composto ionico in acqua provoca anzitutto una rilevante perturbazione nella struttura ordinata del solvente, nella quale le molecole di acqua interagiscono, come noto, in modo dinamico tramite legami a idrogeno e altre interazioni dipolari. La presenza di uno ione, che agisce come corpo estraneo, evidentemente rompe la simmetria e la distribuzione di tali interazioni e ciò comporta un contributo entropico positivo. Successivamente, se lo ione è *kosmotropo*, questo organizzerà varie molecole di solvente nel proprio strato di solvatazione con una effettiva diminuzione di entropia; se invece lo ione è *chaotropo*, allora esso non interagirà in modo sostanziale con il solvente, ma rimarrà quasi desolvato e tenderà ad adsorbirsi alle interfasi presenti, come l'interfase gas/liquido o quella solido/liquido, o nel caso di questo progetto di tesi all'interfaccia liquido/proteina.

Secondo la trattazione di Kim Collins, gli strati di idratazione delle proteine possono essere immaginati come suddivisi in tre livelli interdipendenti, come mostrato in figura 1.9: il primo strato, nelle immediate vicinanze della proteina, è chiamato livello di *solvatazione*; il secondo è il cosiddetto livello di *transizione*; il terzo è lo strato *bulk*.²⁴

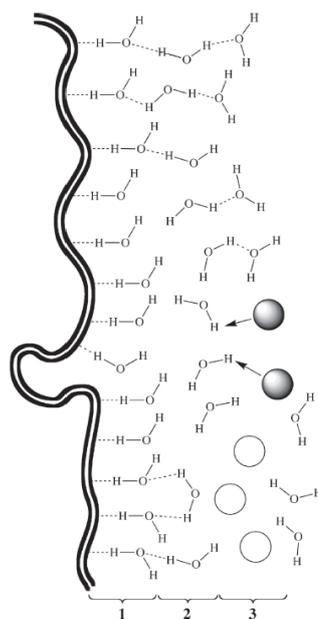


Fig. 1.9 Tre strati di idratazione intorno ad una proteina: 1) livello di solvatazione, 2) livello di transizione e 3) livello bulk. Nel livello bulk si nota la presenza di ioni caotropici (sfere bianche) e di ioni cosmotropici (sfere di colore scuro).²⁴

Gli ioni che entrano a far parte del livello di idratazione bulk riescono ad influenzare la solvatazione della superficie della macromolecola, per il tramite del livello di transizione; in particolare ioni *cosmotropi* tenderanno ad attrarre le molecole di acqua del secondo livello facendo disidratare la proteina che si compatterà minimizzando le zone esposte al solvente (folding); ioni *caotropi*, invece, promuovono la solvatazione della proteina facendola distendere esponendo una maggiore superficie al solvente (unfolding) e aumentando la cosiddetta “*solvent accesible area*” (ASA).²⁴

Sia anioni che cationi possono essere classificati secondo la serie di Hofmeister, ma in soluzione acquosa gli effetti degli anioni tendono a dominare e l'ordine dell'efficacia, rispetto alla precipitazione dell'albumina, risulta essere quello evidenziato da Hofmeister alla fine del XIX secolo nei suoi studi pionieristici: $F^- > Cl^- > Br^- \approx NO_3^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$.

Questi risultati sperimentali, uniti all'evidenza che gli effetti specifici degli ioni insorgono solo a media-alta concentrazione di sale, hanno condotto a ipotizzare che in tali condizioni le interazioni coulombiane elettrostatiche svaniscono, mentre emergono interazioni di tipo dispersivo.

Mentre le prime sono significative a bassa concentrazione (come per esempio nel modello di Debye-Hückel e nella teoria DLVO) e sono aspecifiche in quanto

dipendono solo da carica e raggio dello ione, le seconde diventano preponderanti a concentrazione più elevata (per esempio al di sopra di 100 mM) e sono altamente specifiche, in quanto legate strettamente a proprietà chimico-fisiche come la polarizzabilità e il potenziale di prima ionizzazione. Inoltre queste, dipendendo dalla configurazione elettronica esterna degli ioni, sono in generale più importanti per gli anioni e meno per i cationi, anche se sono note eccezioni. Infine è importante ricordare che, oltre alle proprietà degli ioni e alle loro interazioni con il solvente, è fondamentale il tipo di interfasi presenti. Infatti a seconda della loro carica e polarità si possono avere inversioni nella serie di Hofmeister o vistosi cambiamenti nella sequenza.

1.4 Fenomeni di aggregazione dell'Insulina

L'insulina è un ormone di natura proteica secreto dalle cellule β delle isole di Langerhans, presenti nel pancreas, ed è coinvolto nel metabolismo dei carboidrati, delle proteine e dei grassi. La struttura primaria dell'Insulina (Figura 1.10), scoperta nel 1955 da Sanger,²⁵ è formata da due catene polipeptidiche, nominate sub-unità, A e B: la sub-unità A è formata da una sequenza di 21 amminoacidi, mentre la sub-unità B da 32 amminoacidi; le due catene polipeptidiche sono collegate da 2 ponti disolfuro ed un ulteriore ponte disolfuro è presente all'interno della catena A.

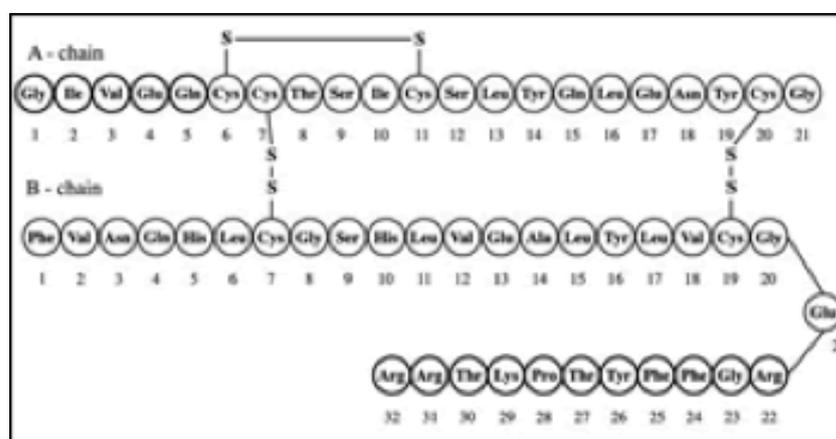


Fig. 1.10 Sequenza amminoacidica di Insulina umana.

La sequenza amminoacidica dell'Insulina varia a seconda della specie da dove la proteina proviene, ma alcune caratteristiche della struttura primaria rimangono invariate come le posizioni dei tre ponti disolfuro e il numero dei residui di Tirosina (Tyr).

L'Insulina in soluzione esiste come una miscela in equilibrio delle forme monomeriche, dimerica, tetrameriche ed esamerica (Figura 1.11).²² A seconda delle condizioni in cui la proteina si trova, l'Insulina propenderà verso una forma piuttosto che un'altra: per esempio in presenza di Zinco, a pH neutro, l'Insulina si trova prevalentemente in forma esamerica; a pH acido (circa 1.8), in presenza di acido acetico, si trova in forma monomeriche; a pH=2, in presenza di acido cloridrico, in forma dimerica.²²

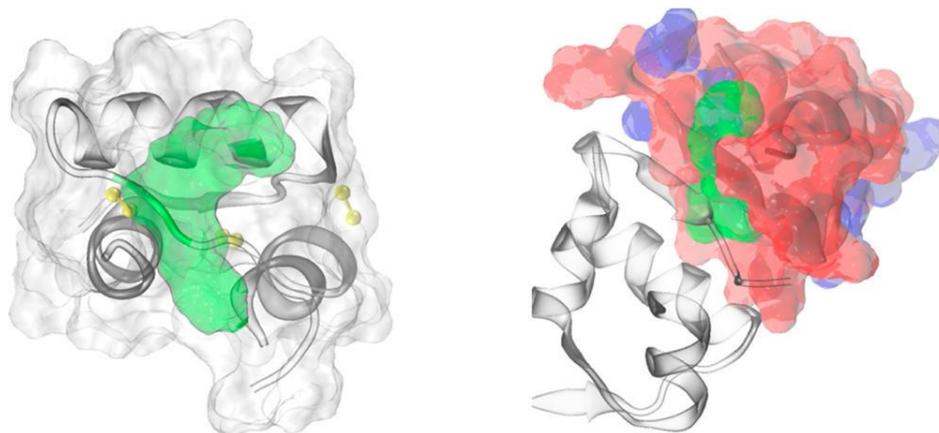


Fig. 1.11 Insulina in forma monomeriche (sinistra) e in forma dimerica (destra). A sinistra, i legami gialli rappresentano i ponti disolfuro che collegano la catena B (lunga α -elica con quattro torsioni) alla catena A (due α -eliche); a destra i domini idrofobici non esposti al solvente sono colorati di verde e blu, invece le regioni idrofiliche accessibili al solvente sono colorate di rosso.²⁶

L'Insulina, posta in determinate condizioni, tende a denaturarsi parzialmente passando dallo stato nativo ad uno stato in cui la proteina si trova sotto forma di aggregati amiloidi, processo denominato *fibrillazione*. In particolare, l'Insulina tende fortemente a denaturarsi a bassi valori di pH, ad alte temperature e sotto agitazione vigorosa.²²

E' riportato in letteratura che il processo di formazione di fibrille amiloidi per l'Insulina inizia con la dissociazione della forma esamerica, dimerica o tetrameriche in quella monomeriche, la quale si trova in equilibrio con un intermedio parzialmente denaturato capace di fibrillare; successivamente l'intermedio, in

equilibrio anche con la forma completamente denaturata della proteina, oligomerizza formando nuclei che richiamando a sè altri oligomeri inducono la conversione in fibrille o filamenti. Questo meccanismo viene schematizzato in figura 1.12.²⁷

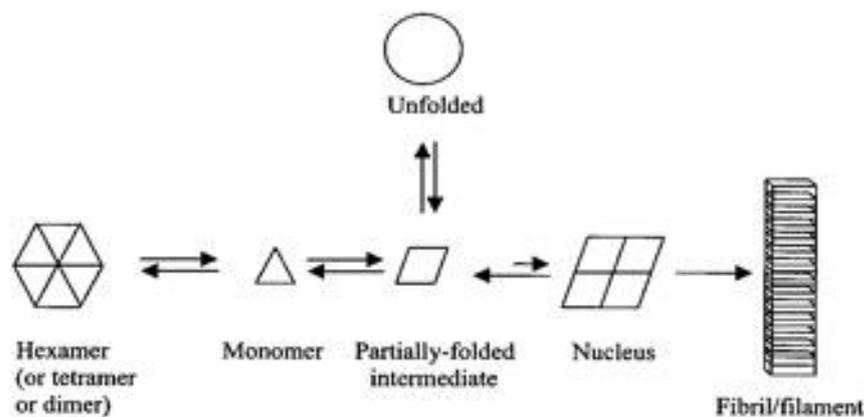


Fig. 1.12 Possibile modello di fibrillazione dell'Insulina.²⁷

In soluzione i monomeri tendono ad associarsi in dimeri per schermare i domini idrofobici non facendoli interagire con il solvente, ad alte concentrazioni, e in particolare in presenza di zinco, i dimeri tendono ad aggregarsi formando esameri (processo di *self-assembly*) che proteggono l'Insulina dal processo di fibrillazione; è il monomero la specie fisiologicamente attiva per la formazione di amiloidi e, per questo, è giustificato il fatto che il primo step del meccanismo sia la dissociazione della forma esamerica, dimerica o tetramerica in monomera.²⁶

Studi recenti affermano che la catena A e la catena B dell'Insulina sono in grado di formare fibrille amiloidi individualmente.²²

Le fibrille mature dell'Insulina sembrano essere correlate a condizioni patologiche, infatti depositi amiloidi sono stati osservati in pazienti con diabete di tipo II (*diabete mellito*) e in pazienti che hanno subito ripetute iniezioni sub cutanee di Insulina. L'aumento negli ultimi anni di persone che soffrono di diabete ha portato ad approfondire lo studio sull'aggregazione dell'insulina per migliorare le terapie a cui vengono sottoposti i pazienti diabetici.²²

Da diversi studi effettuati si evince che sia gli oligomeri che le fibrille sono ricche di β -sheets, strutture ordinate tipiche delle fibrille amiloidi; questo tipo di disposizione genera una serie quasi infinita di catene polipeptidiche laterali allineate che induce ad interazioni tra di loro.²⁶

Questa caratteristica di oligomeri e fibrille amiloidi permette di monitorare la cinetica di fibrillazione dell'Insulina, mediante l'utilizzo della Tioflavina T come sonda fluorescente (Figura 1.13).²⁸

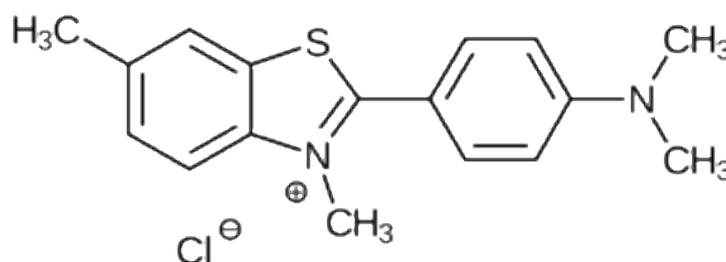


Fig. 1.13 Struttura molecolare della Tioflavina T (ThT)

La molecola di Tioflavina T (ThT) è in grado di interagire selettivamente con le porzioni ricche di β -sheets presenti negli aggregati amiloidi e negli oligomeri, dando luogo ad un aumento dell'intensità di fluorescenza e ad uno spostamento del massimo di emissione a lunghezze d'onda maggiore (*red shift*).¹² Il meccanismo generale dell'interazione tra la ThT e i β -sheets non è ancora stato completamente chiarito; da misure di diffrazione di raggi X, però, sembra che la ThT si legni orientando il suo asse parallelamente rispetto all'asse delle fibrille amiloidi e perpendicolarmente rispetto ai β -sheets (come mostrato in Figura 1.14).²⁹

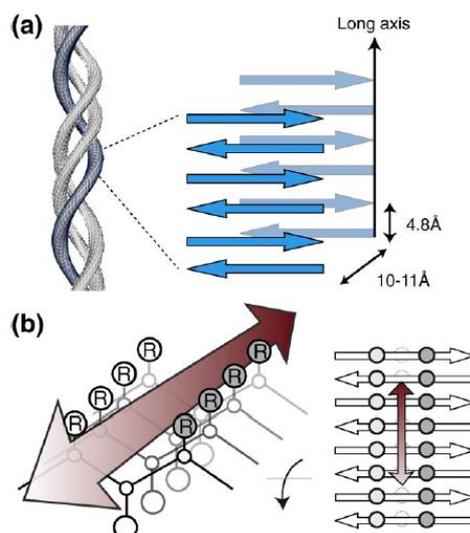


Figura 1.14 Struttura caratteristica delle fibrille e possibile modello di legame tra ThT e fibrille: a) struttura cross- β di fibrille amiloidi; b) modello strutturale del complesso ThT-fibrille, la ThT sembra legarsi lungo la superficie delle catene laterali posizionandosi in modo perpendicolare rispetto ai β -sheet.²⁹

La ThT che interagisce con le porzioni ricche di β -sheets, esiste in forma monomerica o dimerica e, in particolare, è stato proposto che si trovi in forma di monomero in presenza degli oligomeri, più piccoli delle fibrille, e in forma di dimero nel caso delle fibrille.²⁸

Quando la ThT si trova in forma monomerica (in soluzione o intercalata nelle porzioni β -sheets degli oligomeri) emette a 450nm se eccitata a 350nm, mentre quando si trova in forma dimerica (intercalata nelle porzioni di β -sheets delle fibrille mature) emette a 480nm se eccitata a 440nm.²⁸ Lo spostamento del massimo di emissione, chiamato *red shift*, potrebbe essere dovuto principalmente al fatto che la ThT in soluzione ha una conformazione non planare, con gli anelli di benzotiazolo e benzammina che ruotano intorno al legame C-C (Figura 1.15) invece nel complesso coniugato ThT-fibrille, a causa di interazioni elettrostatiche, si verifica una restrizione sterica della rotazione aumentando il rendimento di fluorescenza della ThT.³⁰ Questo meccanismo è spiegato meglio dall'ipotesi che la molecola di Tioflavina T si comporti come un "rotore molecolare": in soluzione, una barriera a bassa energia permette agli anelli di benzammina e benzotiazolo della ThT di ruotare liberamente intorno al loro legame in comune C-C, questa rotazione spegne rapidamente gli stati eccitati generati da fotoni, causando una bassa emissione di fluorescenza; al contrario, l'immobilizzazione della rotazione della ThT conserva lo stato eccitato, con conseguente elevata resa quantica di emissione di fluorescenza.³⁰ Le fibrille amiloidi presentano un sito vincolante per la ThT, che si trova intercalata nelle porzioni β -sheets delle fibrille, impedendo stericamente la rotazione intorno al legame C-C, determinando in tal modo un miglioramento dell'emissione di fluorescenza della ThT.³⁰

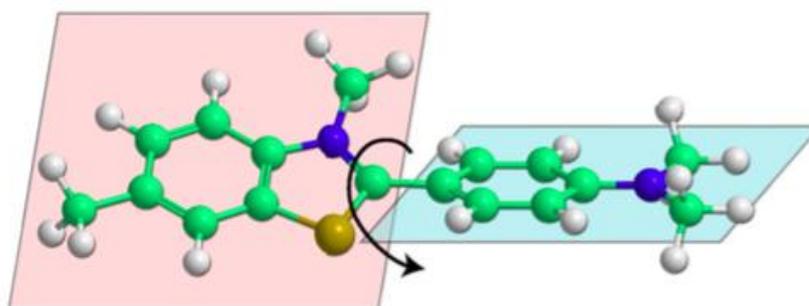


Figura 1.15 Molecola di Tioflavina T e rotazione intorno al legame C-C degli anelli di benzotiazolo e benzammina.³⁰

1.5 Scopo della Tesi

Lo scopo di questo progetto di tesi è studiare l'effetto di diversi anioni, a parità di contro-ione, e della loro concentrazione, sulla cinetica del processo di aggregazione dell'Insulina in fibrille amiloidi; i parametri indagati riguardano non solo la velocità dell'aggregazione, ma anche la concentrazione degli aggregati formati in funzione del tempo.

La cinetica è stata monitorata attraverso misure di emissione di fluorescenza, utilizzando come *probe* di fluorescenza la Tioflavina T.

La morfologia degli aggregati formati e la loro struttura secondaria, invece, sono state ottenute dallo studio di *Confocal Laser Scanning Microscopy* abbinato alla spettroscopia di emissione spazialmente risolta della molecola di Tioflavina T e da misure di Dicroismo Circolare (CD) che permettono di approfondire la percentuale di α -elica, β -sheet, β -turn e *random coil* presenti all'interno delle fibrille mature.

Capitolo 2: Tecniche sperimentali

1.4 Spettroscopia di Assorbimento UV-VIS

La spettroscopia di assorbimento UV-VIS è una spettroscopia elettronica, ovvero concerne le transizioni tra i livelli elettronici di atomi e molecole. Una transizione elettronica avviene se l'energia della radiazione elettromagnetica che interagisce con il campione è compresa nell'intervallo spettrale ultravioletto-visibile (10- 800 nm). Tale intervallo è suddiviso in tre regioni principali: UV lontano (10-250 nm), UV vicino (250-380 nm), Visibile (380-800 nm).

La spettroscopia di assorbimento UV-VIS indaga le frequenze della radiazione assorbita dalla materia, quindi fornisce informazioni sullo stato fondamentale della specie assorbente. L'assorbimento è correlato alla concentrazione della specie assorbente secondo la legge di Lambert-Beer (eq. 2.1):

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon l C \quad (\text{Eq. 2.1})$$

dove A è l'assorbanza, I è l'intensità della radiazione uscente dal campione, I_0 è l'intensità della radiazione incidente, ε è il coefficiente di estinzione molare, l è la lunghezza del cammino ottico del raggio incidente, C è la concentrazione molare della specie assorbente.

Molecole diverse assorbono radiazioni di diversa lunghezza d'onda. Uno spettro di assorbimento mostrerà un certo numero di bande di assorbimento, la cui posizione spettrale corrisponde alle transizioni dei gruppi strutturali presenti nella molecola. Dal punto di vista analitico, le regioni dell'intervallo spettrale ultravioletto-visibile più interessanti sono il vicino ultravioletto ed il visibile, a cui è dedicata gran parte della strumentazione oggi disponibile sul mercato. Gli spettrometri sono costituiti da una o più sorgenti luminose (in genere una per la regione ultravioletta ed una per la regione visibile), un selettore di lunghezza d'onda, un porta-campione, un rivelatore di radiazione ed elaboratori di segnale.

Lo schema di un tipico strumento a doppio raggio comprende uno specchio a settori rotante (chopper) il quale dirige alternativamente la radiazione proveniente dal monocromatore verso la cella del riferimento e verso la cella del campione. Gli impulsi di radiazione sono ricombinati da uno specchio a griglia, che riflette uno dei raggi e trasmette l'altro al rivelatore. Lo strumento a doppio raggio ha il vantaggio di fornire un segnale quasi esente dalla deriva sia della sorgente sia del rivelatore.

Gli spettri di assorbimento riportati in questa tesi sono stati condotti con un spettrofotometro Lambda 900 (Perkin Elmer, Italia). Lo spettrofotometro opera nell'intervallo spettrale UV/Vis/NIR (che copre grazie alla lampada alogena ed alla lampada a deuterio), è a doppio raggio, possiede due monocromatori (reticoli olografici con 1440 linee/mm per l'intervallo UV/Vis e con 360 linee/mm nel NIR) e due rivelatori (un fotomoltiplicatore per l'intervallo the UV/Vis ed un Peltier raffreddato di PbS per il NIR).

Le condizioni operative utilizzate sono indicate nella sezione "Materiali e procedure sperimentali".

1.5 Spettroscopia di Fluorescenza

Nella spettroscopia di fluorescenza una sorgente di luce, di solito ultravioletta, eccita gli elettroni che, decadendo, emettono luce (fluorescenza), di solito nel campo del visibile, ma non necessariamente. Principalmente sono coinvolti gli elettroni degli stati elettronici e vibrazionali.

Ogni molecola ha vari stati, chiamati livelli energetici. Il livello elettronico fondamentale si trova a più bassa energia, mentre i livelli elettronici eccitati si trovano ad energie più alte. All'interno di ogni livello elettronico sono compresi vari livelli vibrazionali. Nella spettroscopia di fluorescenza, tramite l'assorbimento di un fotone, la molecola passa dal livello vibrazionale a più bassa energia del livello elettronico fondamentale (che è quello più popolato a temperatura ambiente, secondo la distribuzione statistica di Boltzmann) ad uno dei livelli vibrazionali del primo stato elettronico eccitato. Una volta eccitata, la molecola fotoluminescente può perdere l'eccesso di energia assorbita tramite vari

meccanismi di rilassamento, che possono essere visualizzati nel diagramma di Jablonski (Figura 2.1).

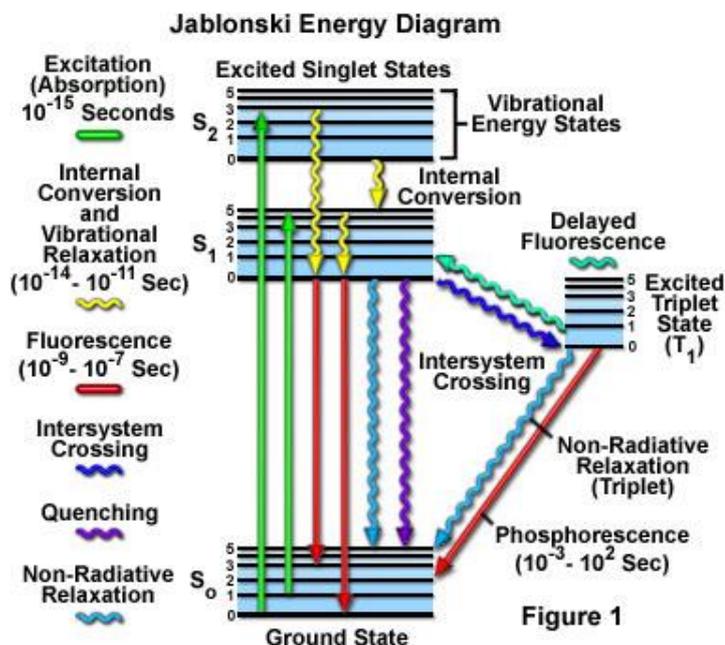


Fig. 2.1 Diagramma di Jablonski.

Immediatamente dopo l'assorbimento del fotone, la molecola perde l'eccesso di energia vibrazionale (ad esempio tramite collisione con le altre molecole del campione), decadendo al livello vibrazionale più basso dello stato elettronico eccitato (rilassamento vibrazionale). Successivamente la molecola decade in uno dei livelli vibrazionali del livello elettronico fondamentale, emettendo un fotone nel processo di decadimento, che può avere diverse energie o frequenze. Con la spettroscopia di fluorescenza è possibile determinare la struttura dei diversi livelli vibrazionali analizzando le diverse frequenze della luce emessa, con le loro intensità relative.

Gli spettri di fluorescenza sono di due tipi: spettri di emissione e spettri di eccitazione. Lo spettro di emissione di una molecola fotoluminescente si ottiene mantenendo fissa la lunghezza d'onda di eccitazione (di solito viene scelta una lunghezza d'onda a cui si ha elevata assorbanza) e misurando, con un monocromatore, l'intensità di fluorescenza emessa dalla molecola alle lunghezze d'onda selezionate. Lo spettro di eccitazione di una molecola fotoluminescente si ottiene variando la lunghezza d'onda di eccitazione e misurando, con un monocromatore, l'emissione di fluorescenza ad una lunghezza d'onda costante. In

genere lo spettro di eccitazione è identico allo spettro di assorbimento, così come l'intensità di fluorescenza è proporzionale all'assorbimento ad una data lunghezza d'onda.³¹

In generale, gli strumenti per registrare spettri di fluorescenza sono di due tipi: fluorimetri a filtro, che usano filtri appositi per isolare la luce incidente e la luce fluorescente, o spettrofluorimetri, che usano monocromatori a reticolo di diffrazione per isolare la luce incidente e la luce fluorescente. Entrambi seguono questo schema: la luce proveniente della sorgente di eccitazione passa attraverso il filtro, o il monocromatore, e colpisce il campione. Parte della luce incidente è assorbita dal campione e parte delle molecole del campione fluorescono. La luce fluorescente è emessa in tutte le direzioni. Parte della luce emessa passa attraverso un secondo filtro o monocromatore e raggiunge il detector, posto di solito a 90° rispetto al raggio incidente, per ridurre al minimo il rischio che la luce incidente trasmessa o riflessa raggiunga il detector. I fluorimetri con due monocromatori ed una sorgente di luce continua possono registrare sia spettri di emissione sia spettri di eccitazione.

Gli spettri di fluorescenza sono stati acquisiti con uno spettrofluorimetro LS50B (*Perkin Elmer, Italia*), che possiede una lampada a Xenon come sorgente, un fotomoltiplicatore come detector e monocromatori del tipo Monk-Gillieson. Sono state usate celle di quarzo QS per effettuare tutte le misure di fluorescenza.

Le condizioni operative sono specificate nel capitolo "Materiali e procedure sperimentali".

1.6 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Un microscopio ottico convenzionale utilizza una fonte luminosa per illuminare il campione e produrre una sua immagine ingrandita. Il microscopio a fluorescenza utilizza, invece, un laser come sorgente per eccitare i fluorofori presenti nel campione: questi emettono radiazione sotto forma di fluorescenza, che viene misurata ed utilizzata per ricostruire l'immagine del campione.

In generale, i microscopi confocali a fluorescenza sono costituiti da un microscopio ottico, da varie sorgenti laser per l'eccitazione dei fluorofori del campione, da uno o più rivelatori elettronici e da un complesso sistema di scansione del fascio

luminoso sul campione. Tutto è interfacciato ad un computer per la visualizzazione, l'elaborazione e la gestione delle immagini.³² In Figura 2.2 è riportato uno schema del microscopio confocale.

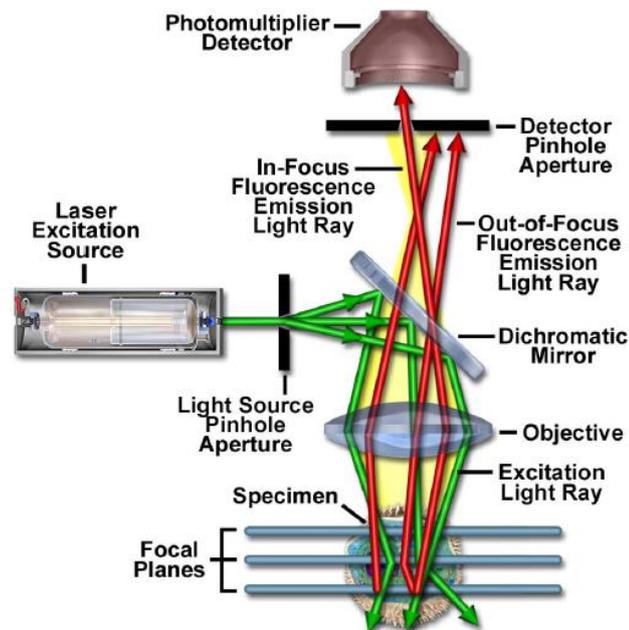


Fig. 2.2 Schema di un microscopio confocale a scansione laser.

La luce emessa da una sorgente laser (sorgente di eccitazione) passa attraverso l'apertura di un *pinhole*, situato nel piano confocale, con un punto di scansione sul campione e con l'apertura di un secondo *pinhole*, posizionato davanti al detector (un tubo fotomoltiplicatore). La radiazione laser viene riflessa da uno specchio dicroico e, con un obiettivo, viene focalizzata in un piano ben definito del campione. Lo specchio dicroico è caratterizzato da una lunghezza d'onda caratteristica (*transition wavelength*), per la quale si ha il 50% di trasmissione. Trasmette tutte le radiazioni di lunghezza d'onda superiore alla *transition wavelength* e riflette tutte quelle di lunghezza d'onda inferiore. Lo specchio dicroico serve a separare l'emissione del campione dalla radiazione eccitatrice. Tuttavia la separazione non è perfetta, perciò deve essere affiancato da due filtri: uno di eccitazione, che seleziona la lunghezza d'onda della radiazione eccitatrice, ed uno di emissione, che rimuove ogni traccia di eccitazione dalla radiazione che giunge al rivelatore.

La microscopia confocale presenta alcuni vantaggi. La luce laser (essendo coerente, monocromatica e di alta intensità) consente di evitare fenomeni di diffrazione ed

aberrazione, tipici della luce prodotta dalle lampade a incandescenza. Le lenti dell'obiettivo fanno sì che l'intensità della luce laser sia sufficiente ad eccitare i fluorofori soltanto nel punto di massima concentrazione del raggio, corrispondente al piano di messa a fuoco dell'obiettivo. In questo modo le aree superiori ed inferiori al piano focale, non essendo eccitate, non contribuiscono alla formazione dell'immagine, permettendo una riduzione del rumore di fondo.

La luce emessa dai fluorofori eccitati del campione (nello stesso piano focale dell'eccitazione) viene catturata dalle lenti dell'obiettivo e lo specchio dicroico la devia verso il rivelatore, che trasforma l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico di proporzionale intensità.

Tra lo specchio dicroico ed il rivelatore, il fascio luminoso attraversa l'apertura di un nuovo *pinhole*, che impedisce di raggiungere il rivelatore all'eventuale fluorescenza proveniente dalle zone del campione al di sopra o al di sotto del piano focale, che, seppure in minima parte, possono essere illuminate per effetto di fenomeni di rifrazione all'interno del campione.

In entrambi i casi, l'obiettivo ha due funzioni: focalizzare l'eccitazione in un punto sul campione e raccogliere l'emissione di fluorescenza.

Il segnale elettrico in uscita dal rivelatore viene digitalizzato ed inviato ad un computer, che registra i valori misurati per ogni punto. Questi sono utilizzati per ricostruire l'immagine finale: ogni punto del campione corrisponderà ad un pixel sullo schermo, e l'intensità luminosa del punto verrà rappresentata da una corrispondente tonalità di grigio o di colore. L'accostamento di tutti i singoli pixel, corrispondenti ai punti del campione scansionati dal fascio laser, darà così l'immagine finale. Risulta importante osservare che l'immagine del campione ottenuta da un microscopio a fluorescenza viene ricostruita punto per punto da un sistema elettronico di rivelazione; non rappresenta cioè un'immagine reale ingrandita osservata direttamente attraverso l'oculare, come accade in un microscopio ottico tradizionale.

Alcuni vantaggi aggiuntivi del microscopio confocale riguardano la possibilità di ottimizzare il segnale per via elettronica, scegliendo l'area d'interesse scansionata dal laser senza dover cambiare ogni volta l'obiettivo.

Gli svantaggi del microscopio confocale a scansione riguardano principalmente il numero limitato di lunghezze d'onda d'eccitazione disponibili con i comuni laser,

soprattutto nella regione dell'ultravioletto. Per di più il campione deve essere fluorescente, e se non lo è naturalmente deve essere modificato introducendovi sonde fluorescenti. Un ulteriore problema riguarda l'alta intensità della radiazione che raggiunge il campione, la quale può provocare danni irreversibili, soprattutto ai sistemi biologici.

Per acquisire le immagini del microscopio confocale riportate in questa tesi è stato usato il microscopio confocale Leica Microsystems (Heidelberg, GmbH), in configurazione invertita. Il microscopio è equipaggiato con un laser ad Argon (che fornisce le linee di eccitazione 458 nm, 476 nm, 488nm, 496 nm, 514 nm, 561 nm) ed un laser a He-Ne (che fornisce la linea a 633 nm). La risoluzione teorica massima laterale xy è circa 140 nm e lungo l'asse z è circa 240 nm (valori relativi alla lunghezza d'onda di 488 nm ed all'apertura numerica delle lenti di 1.4). Tutte le immagini sono state scannerizzate usando un obiettivo 63x per immersione in acqua. Sono stati anche acquisiti spettri di emissione con risoluzione spaziale.

Le condizioni operative utilizzate sono indicate nella sezione "Materiali e procedure sperimentali".

1.7 Spettroscopia di Dicroismo Circolare

Quando la luce polarizzata linearmente passa attraverso una sostanza otticamente attiva, le sue due componenti polarizzate circolarmente, levogira e destrogira, vengono assorbite in modo diverso dalla sostanza. Ciò rende ellitticamente polarizzata la luce che attraversa il campione: si dice che la sostanza possiede "Dicroismo Circolare (DC)". La spettroscopia di dicroismo circolare è dunque una spettroscopia di assorbimento. L'entità del dicroismo circolare è espressa in termini di ellitticità molecolare $[\theta]$ e si determina con l'equazione 2.2:

$$[\theta] = \frac{4500}{\pi} (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \ln 10 \quad \text{Eq. 2.2}$$

dove ε_L e ε_R sono i coefficienti di estinzione molare per la luce polarizzata circolarmente levogira e destrogira, rispettivamente. La differenza ($\Delta\varepsilon$) tra ε_L e ε_R è data dall'equazione 2.3:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{1}{LC} \log\left(\frac{I_R}{I_L}\right) \quad \text{Eq. 2.3}$$

Così l'equazione 2.4 può essere espressa con la formula seguente:

$$[\theta] = \frac{4500}{\pi LC} \ln 10 \log\left(\frac{I_R}{I_L}\right) \quad \text{Eq. 2.4}$$

Nelle equazioni 2.3 e 2.4, L è lo spessore (cm) dello strato assorbente, C è la concentrazione molare, I_R e I_L sono rispettivamente le intensità dei raggi, uscenti dal campione, della luce polarizzata circolarmente destrorigira e levogira.

In genere il rapporto I_R/I_L è circa 1, perciò $[\theta]$ verrebbe determinato con uno scarso grado di accuratezza usando l'eq. 2.4. Per questo nella pratica si sostituiscono le seguenti quantità all'eq. 2.4:

$$I_A = \frac{1}{2}(I_R + I_L) \quad \text{e} \quad S = I_R - I_L \quad \text{Eq. 2.5}$$

e si ottiene:

$$[\theta] = \frac{4500}{\pi LC} \ln 10 \left(\frac{S}{I_A} \log e\right) \quad \text{Eq. 2.6}$$

Dato che S/I_A è minore di 1, $[\theta]$ può essere determinato con un maggiore grado di accuratezza rispetto all'eq 2.4.

L'eq.2.6 può essere scritta in funzione dei voltaggi di *output* dei tubi fotomoltiplicatori, E_A e E_S , rispettivamente corrispondenti a I_A e S (eq. 2.7).

$$[\theta] = \frac{4500}{\pi LC} \ln 10 \left(\frac{E_S}{E_A} \log e\right) \quad \text{Eq. 2.7}$$

Negli spettri di dicroismo circolare si riporta l'ellitticità molecolare $[\theta]$ rispetto alla lunghezza d'onda, λ . Molto spesso, le proteine vengono caratterizzate mediante spettroscopia di dicroismo circolare. Gli elementi otticamente attivi delle proteine sono quelli relativi alla loro struttura secondaria, ovvero α -eliche, β -sheets, β -turns e *random coils*. Ogni elemento strutturale dà luogo a spettri di dicroismo circolare

in diversi campi spettrali e con una morfologia caratteristica, come mostrato in Figura 2.3:

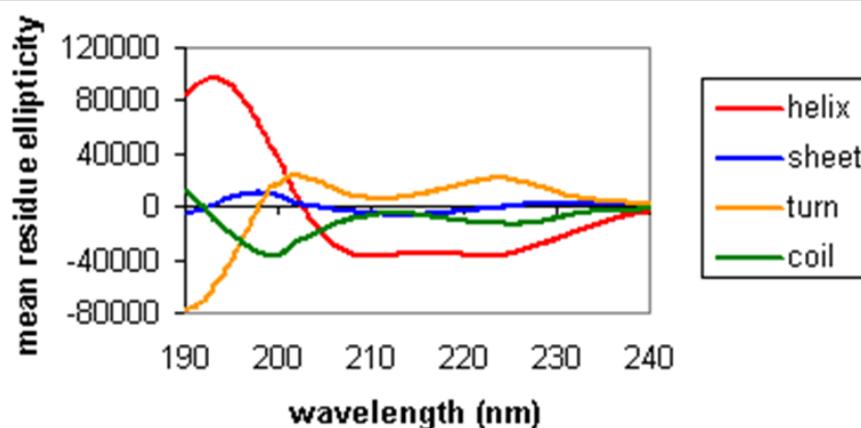


Fig. 2.3 Spettri CD di elementi di struttura secondaria di proteine: α -eliche (rosso), β -sheets (blu), β -turns (giallo) e random coils (verde).

Le lunghezze d'onda utili per esaminare la struttura secondaria delle proteine sono comprese nel lontano ultravioletto (190-250 nm), dove hanno luogo le transizioni elettroniche dello scheletro peptidico. Ogni diverso elemento della struttura secondaria delle proteine, possiede valori caratteristici degli angoli torsionali intorno al legame peptidico, φ e ψ (Figura 2.4).

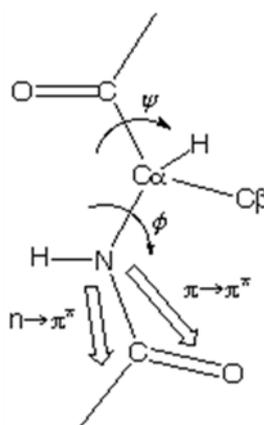


Fig. 2.4 Angoli torsionali intorno al legame peptidico e transizioni elettroniche coinvolte negli spettri DC.

Le transizioni coinvolte in un legame peptidico sono: $n \rightarrow \pi^*$ (intorno a 220 nm), $\pi \rightarrow \pi^*$ (intorno a 190 nm), $n \rightarrow \pi^*$ (elettroni di non legame di O del carbonile), $\pi \rightarrow \pi^*$ (elettroni π di legame del carbonile). L'intensità e l'energia di queste transizioni dipende da φ e ψ (cioè dalla struttura secondaria), ovvero è modulata dall'orientazione reciproca degli atomi che si trovano intorno al legame peptidico.

Mentre la struttura secondaria delle proteine può essere determinata dalla spettroscopia DC nella regione spettrale del lontano UV (190-250 nm), lo spettro DC nella regione spettrale del vicino UV (250-350 nm) dà informazioni sulla struttura terziaria. I cromofori sensibili all'intera struttura terziaria della proteina sono i ponti disolfuro (segnali larghi e deboli su tutto lo spettro del vicino UV) e gli aminoacidi aromatici fenilalanina (250-270 nm), tirosina (270-290 nm), triptofano (280-300 nm). La presenza di segnali nel vicino UV indica che la proteina è ripiegata in una struttura ben definita.

Gli spettri CD riportati in questa tesi sono stati registrati con lo spettropolarimetro JASCO J-175, che possiede un tubo fotomoltiplicatore come detector e due sorgenti: una lampada a Xenon raffreddata ad aria (150W) ed una lampada a Xenon raffreddata ad acqua (450W).

Le condizioni operative utilizzate sono indicate nella sezione "Materiali e procedure sperimentali".

Capitolo 3: Materiali e procedure sperimentali

3.1 Materiali

L'Insulina utilizzata è di tipo umano ed è stata acquistata da SIGMA ALDRICH (CAS-11061-68-0) sotto forma di polvere bianca. Il peso molecolare della proteina è $5807.57 \text{ gmol}^{-1}$ e il suo coefficiente di estinzione molare ϵ a 276nm risulta essere $1.0675 \text{ cm}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}$.³³

La Tioflavina T è stata fornita da SIGMA ALDRICH (CAS 2390-54-7) sotto forma di polvere di colore giallo; la massa molecolare della Tioflavina T è 318.87 gmol^{-1} e il suo coefficiente di estinzione molare ϵ in H_2O a 412nm risulta essere $23800 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La soluzione di HCl al 32% è stata fornita da FLUKA (CAS-84420).

I sali NaCl, NaF e NaI sono stati forniti da SIGMA ALDRICH: NaCl (CAS-7647-14-5) purezza $\geq 99.5\%$ e grammo-formula 58.44 gmol^{-1} , NaF (CAS-7681-49-4) purezza $\geq 99\%$ e grammo-formula 41.99 gmol^{-1} , NaI (CAS-7681-82-5) purezza $\geq 99\%$ e grammo-formula 149.89 gmol^{-1}

I sali NaSCN e NaBr sono stati forniti da FLUKA sotto forma di polvere: NaSCN (71938) purezza $\geq 99\%$ e grammo-formula 81.07 gmol^{-1} ; NaBr (71329) purezza $\geq 99\%$ e grammo-formula 102.90 gmol^{-1} .

L' H_2O milliq, utilizzata per preparare le soluzioni, è stata ottenuta purificando due volte acqua demineralizzata utilizzando: un depuratore Elix Millipore con filtro Vent Filter MPK01 e uno Simplicity® UV (conducibilità $18.2 \mu\text{Scm}^{-1}@25^\circ\text{C}$).

Per le misure di assorbimento e di fluorescenza sono state utilizzate, per contenere il campione, cellette di quarzo con cammino ottico 1 cm; in alcuni casi, per le misure di assorbimento, sono state utilizzate cellette a volume ridotto di plastica con lo stesso cammino ottico.

Per le analisi sulla cinetica di fibrillazione dell'Insulina, attraverso misure di emissione di fluorescenza, è stata utilizzata una celletta di quarzo (cammino ottico 1 cm) con apposito spazio in metallo destinato all'ancoretta magnetica.

Per le misure spettroscopiche di dicroismo circolare è stata utilizzata una celletta di quarzo con cammino ottico 0.1 cm.

Per la preparazione delle soluzioni di Insulina, per assicurarsi la completa solubilizzazione della proteina, è stato utilizzato un agitatore a vibrazione MS1 minishaker fornito da IKA.

Per garantire che la temperatura rimanesse costante durante tutta la durata delle misure di fluorescenza è stata utilizzata una sonda di temperatura; inoltre è stato utilizzato un agitatore magnetico (*eletronic stirrer model 300*), posto all'interno dello strumento, fornito da RANK BROTHERS LTD.

3.2 Procedure Sperimentali

Preparazione delle soluzioni di Tioflavina T (ThT)

Le soluzioni di Tioflavina T sono state preparate in H₂O milliq e sono state caratterizzate tramite misure di assorbimento e di emissione di fluorescenza. Le misure di assorbimento, mediante spettrofotometro UV-VIS, sono state eseguite nel range 220-750nm; gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati effettuati ad una temperatura di 37°C e alle seguenti lunghezze d'onda: λ_{exc} = 275, 310, 415 e 450; λ_{em} = 310, 450, 480 e 530. Misure di emissione di fluorescenza sulle soluzioni di ThT sono state fatte più volte durante la durata del progetto per verificare che, nel tempo, queste non avessero subito danneggiamenti.

Preparazione delle soluzioni contenenti i Sali

Per analizzare l'effetto dei sali, a diverse concentrazioni, sulla cinetica di fibrillazione dell'Insulina, sono state preparate 5 soluzioni con 5 diversi sali (NaCl, NaBr, NaF, NaI e NaSCN). Le soluzioni di partenza avevano come concentrazione del sale 0.5 M e, da queste, sono state ottenute soluzioni con concentrazione del sale minore (0.1M). Volendo studiare solo l'effetto dei diversi anioni e delle loro concentrazioni, sono state tenute costanti tutte le altre variabili che avrebbero

potuto inficiare sul cambiamento della cinetica di fibrillazione dell'Insulina: i sali utilizzati hanno lo stesso tipo di catione Na^+ , gli anioni monovalenti e il pH è stato mantenuto uguale per tutte le soluzioni. Affinché il pH rimanesse costante per tutte le soluzioni dei diversi sali, queste sono state preparate in HCl 0.025 M (pH=1.6) e il pH di ogni soluzione è stato verificato attraverso l'utilizzo di una cartina tornasole.

Preparazione delle soluzioni di Insulina

Le soluzioni di Insulina sono state preparate secondo due diverse modalità: solubilizzando l'Insulina pesata in H_2O milliQ o in HCl 0.025 M. Confrontandosi con i dati presenti in letteratura e consultando gli spettri di assorbimento e di emissione di fluorescenza, si è notato che la procedura migliore è risultata essere quella in cui si utilizza HCl 0.025 M. Ogni soluzione di Insulina preparata è stata caratterizzata tramite misure di assorbimento UV-VIS (range 220-750 nm) e tramite spettri di emissione di fluorescenza. Le misure di assorbimento sono state fatte per titolare la concentrazione di Insulina (Tabella 3.1): il coefficiente di estinzione molare ϵ utilizzato, sia per l'insulina a pH=7 sia a pH=1.6, è lo stesso e risulta essere $\epsilon=1.0675 \text{ cm}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}$ a 276 nm.¹⁵ Gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati fatti a 37°C, sotto agitazione vigorosa (950 rpm) e utilizzando come lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione $\lambda_{\text{exc}}= 275, 310, 415$ e 450 nm e $\lambda_{\text{em}}= 310, 450, 480$ e 530 nm.

Tabella 3.1 Concentrazione, calcolata tramite misure di assorbanza, di ogni soluzione di Insulina stock preparata.

	Abs a 276 nm, $\epsilon=1.0675 \text{ cm}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}$	Concentrazione
Insulina in H_2O milliQ	0.07154	0.07 mgmL^{-1}
Insulina in HCl 0.025 M	0.27305	0.212 mgmL^{-1}
Insulina in HCl 0.025 M	0.20516	0.192 mgmL^{-1}
Insulina in HCl 0.025 M	0.31526	0.295 mgmL^{-1}
Insulina in HCl 0.025 M	0.86812	0.813 mgmL^{-1}

Le soluzioni di lavoro di Insulina, utilizzate per seguire la cinetica di aggregazione, sono state preparate per opportuna diluizione dalle soluzioni stock aventi le concentrazioni riportate in tabella 3.1 e ricavate dalle misure di assorbanza.

Preparazione soluzioni per seguire la cinetica di fibrillazione

Per seguire la cinetica di fibrillazione sono state preparate soluzioni di Insulina, a concentrazione 0.01 mgmL^{-1} , prelevando aliquote della soluzione di Insulina di partenza e diluendole con la soluzione del sale di cui si voleva studiare l'effetto; a queste è stata aggiunta un'aliquota di soluzione di ThT, che agisce come sonda fluorescente, in modo tale da avere in celletta una concentrazione di Tioflavina T di $20 \mu\text{M}$.

Ogni soluzione di lavoro risulta avere come concentrazione finale di Insulina 0.01 mgmL^{-1} , di Tioflavina T $20 \mu\text{M}$, di HCl 0.025 M e di sale 0.5 o 0.1 M .

Su queste soluzioni sono state effettuate misure di emissione di fluorescenza nelle seguenti condizioni sperimentali: temperatura costante 37°C (controllata attraverso termometro), agitazione vigorosa (950 rpm) e utilizzando le seguenti lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione $\lambda_{\text{exc}} = 275, 310, 415$ e 450 nm ; $\lambda_{\text{em}} = 310, 450, 480$ e 530 nm . Le misure spettrofluorimetriche sono state effettuate a intervalli di tempo definiti, cioè ogni 5 minuti dalla fine della registrazione dello spettro precedente (contenente tutte le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione).

Tutte le curve di aggregazione dell'Insulina sono state replicate almeno due volte e, in alcuni casi, anche tre o quattro volte.

Sulle stesse soluzioni, al termine di ogni cinetica, sono state fatte misure di Dicroismo Circolare (CD) per studiare la struttura secondaria della proteina, cioè capire se sono presenti elementi strutturali quali α -eliche, β -sheets, β -turns e *random coils*; il range entro cui sono state fatte le misure è ($195\text{-}300$) nm.

Infine sono state effettuate misure al Microscopio Confocale (*Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM)) per analizzare la morfologia delle fibrille formate e acquisire spettri di emissione spazialmente risolti per i vari domini di aggregati presenti nel campione.

Capitolo 4: Risultati sperimentali

4.1 Caratterizzazione di Insulina umana in soluzione acida

Per caratterizzare le soluzioni di Insulina sono stati registrati spettri di emissione di fluorescenza e spettri di assorbimento UV-VIS; è stata usata la lunghezza d'onda di eccitazione della tirosina, 270 nm.

Gli spettri di assorbimento dell'Insulina (Fig 4.1) mostrano una banda centrata a 275 nm dovuta ai quattro residui di tirosina presenti nella sequenza amminoacidica della proteina. Nel corso della preparazione delle soluzioni di Insulina, sono state effettuate misure di assorbanza per titolare la concentrazione della proteina; il coefficiente di estinzione molare a 276 nm risulta essere $1.0675 \text{ cm}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}^{33}$

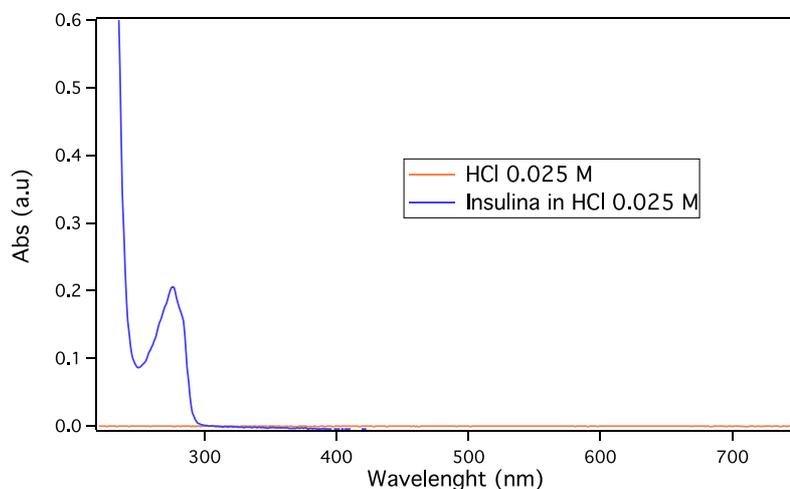


Fig. 4.1 Spettro di assorbimento dell'Insulina 0.625 mg mL^{-1} in HCl 0.025 M a $\text{pH}=1.6$ (Blu) e di HCl 0.025 M (arancione).

Lo spettro di emissione di fluorescenza dell'Insulina (Figura 4.2) mostra una banda centrata intorno a 310 nm (eccitando a 275 nm) attribuibile all'emissione dei quattro residui di tirosina.

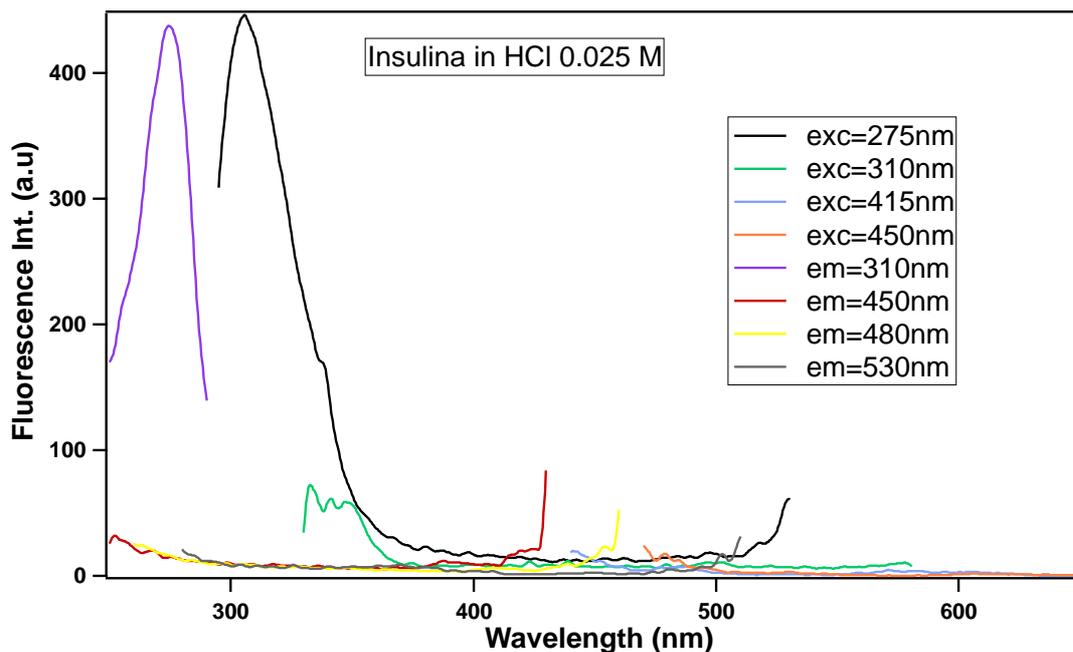


Fig 4.2 Spettro di emissione di fluorescenza dell'Insulina in HCl 0.025 M (pH=1.6).

4.2 Caratterizzazione fotofisica delle soluzioni di Tioflavina T in soluzione acquosa (pH=7 e pH=1.6)

Durante lo studio sulla cinetica di aggregazione in fibrille amiloidi dell'Insulina, l'emissione di fluorescenza, in funzione del tempo, viene studiata non solo per l'emissione a 310 nm dovuta ai residui di Tirosina e, quindi, alle proprietà intrinseche della proteina, ma anche per l'emissione a 480 nm dovuta alla Tioflavina T.

La ThT possiede due forme molecolari (monomero o dimero) con diverse caratteristiche spettrali, come indicato in tabella 4.1.

Tabella 4.1 Caratteristiche spettrali delle diverse forme molecolari della ThT.

Forma molecolare della ThT	$\lambda_{\text{eccitazione}}$	$\lambda_{\text{emissione}}$
Monomero (ThT libera o intercalata tra i β -sheet degli oligomeri)	310 nm	450 nm
Dimero (ThT intercalata tra i β -sheet delle fibrille)	415 nm	480 nm

In particolare per monitorare *in situ* la distribuzione della ThT negli oligomeri e negli aggregati fibrillari si analizzano, in funzione del tempo, i massimi di

emissione a 450 nm e 480 nm ottenuti eccitando rispettivamente a 310 nm e 415 nm.

In figura 4.3 sono riportate le misure di emissione di fluorescenza della ThT.

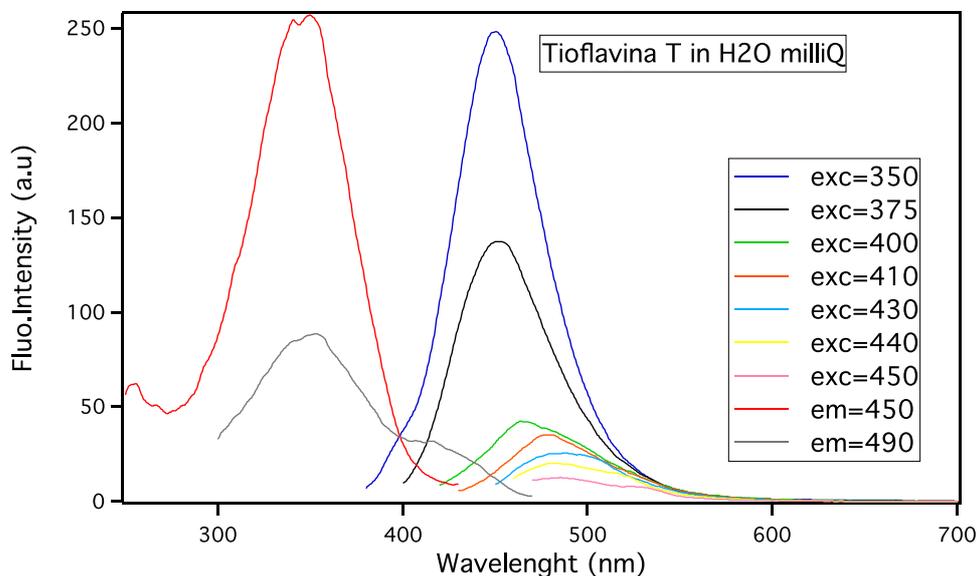


Fig. 4.3 Spettri di emissione di fluorescenza della Tioflavina T in H₂O a concentrazione 20 μM (concentrazione utilizzata nell'analisi della cinetica di fibrillazione).

Lo spettro di assorbimento della Tioflavina T (Figura 4.4) mostra una banda centrata a 412 nm.

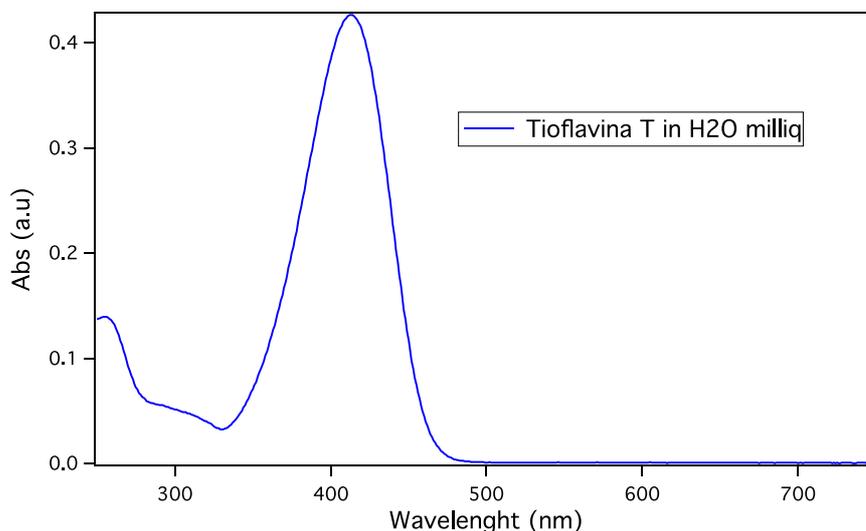


Figura 4.4 Spettro di assorbimento della Tioflavina T in H₂O milliQ con concentrazione 20 μM (la stessa utilizzata durante l'analisi della cinetica di fibrillazione dell'Insulina).

Per seguire la cinetica di aggregazione dell'Insulina è stata utilizzata una soluzione di Tioflavina T in H₂O milliQ, ma essendo le soluzioni dell'Insulina e dei sali a pH acido (1.6), è stata preparata una soluzione di ThT in HCl 0.025M ed è stata

caratterizzata dal punto di vista fotofisico per controllare eventuali variazioni a bassi valori di pH per l'andamento dell'emissione di fluorescenza e dell'assorbimento (Figure 4.5 e 4.6).

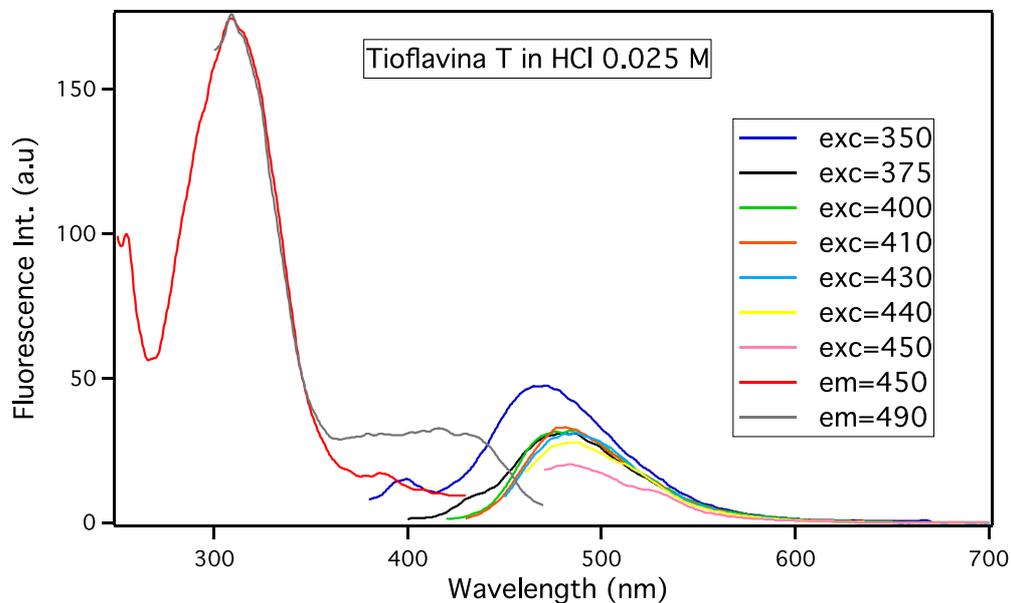


Fig. 4.5 Spettri di emissione di fluorescenza della Tioflavina T in HCl 0.025 M a concentrazione $20\mu\text{M}$ (concentrazione utilizzata nell'analisi della cinetica di fibrillazione).

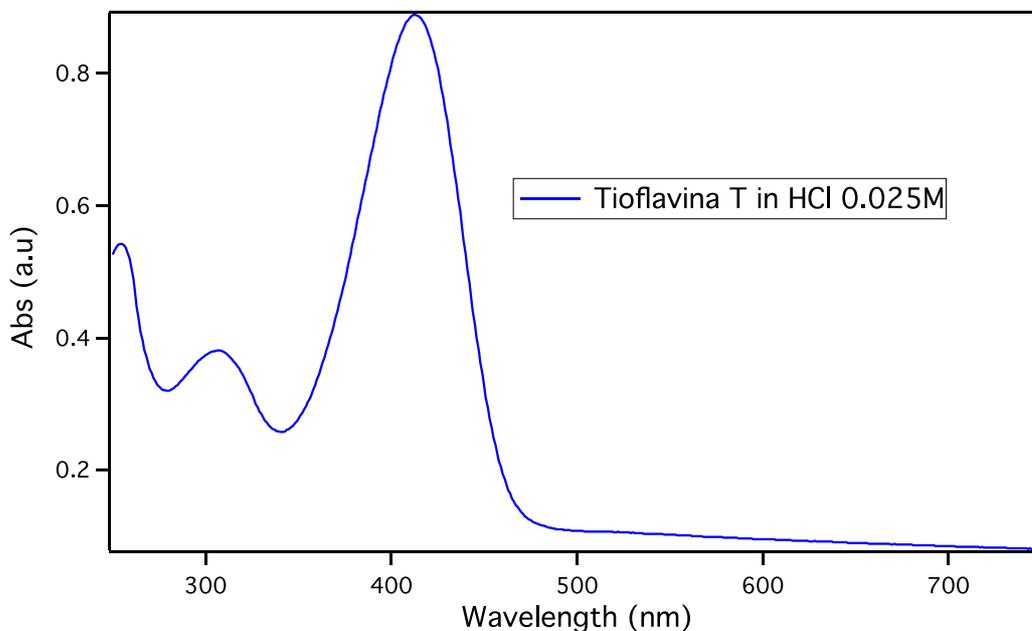


Fig. 4.6 Spettro di assorbimento della Tioflavina T in HCl 0.025 M con concentrazione $20\mu\text{M}$ (la stessa utilizzata durante l'analisi della cinetica di fibrillazione dell'Insulina).

4.3 Studio della cinetica di fibrillazione dell'Insulina

L'Insulina, posta in condizioni fortemente denaturanti, tende ad aggregare in fibrille amiloidi; il processo inizia con un equilibrio metastabile delle diverse forme in cui la proteina si può trovare in soluzione (monomerica, dimerica, tetramerica ed esamerica), procede con la formazione di intermedi parzialmente denaturati (oligomeri) e termina con la conversione in fibrille/filamenti. Secondo Nielsen, Liza et al¹³ bassi valori di pH, agitazione vigorosa ed alte temperature inducono l'Insulina ad una rapida formazione di fibrille amiloidi.

La cinetica di fibrillazione dell'Insulina, analizzata attraverso misure di emissione di fluorescenza utilizzando come probe fluorescente la ThT, è stata effettuata prima su una soluzione di Insulina in assenza di sali, poi su soluzioni di Insulina contenenti sali (a due diverse concentrazioni: 0.1 M e 0.5 M). Le condizioni sperimentali utilizzate per effettuare le misure, in accordo con Nielsen, Liza et al¹³, sono: pH 1.6, temperatura 37°C e agitazione vigorosa 950 rpm.

L'andamento della cinetica in funzione del tempo nella soluzione di Insulina in assenza di sali è riportato nelle figure 4.7 e 4.8; in figura 4.7 l'andamento dei massimi di emissione a 450 nm e a 480 nm è riferito alla ThT nelle due forme (monomerica e dimerica), mentre in figura 4.8 l'andamento dell'emissione di fluorescenza a 310 nm è riferito ai residui di tirosina presenti nell'Insulina.

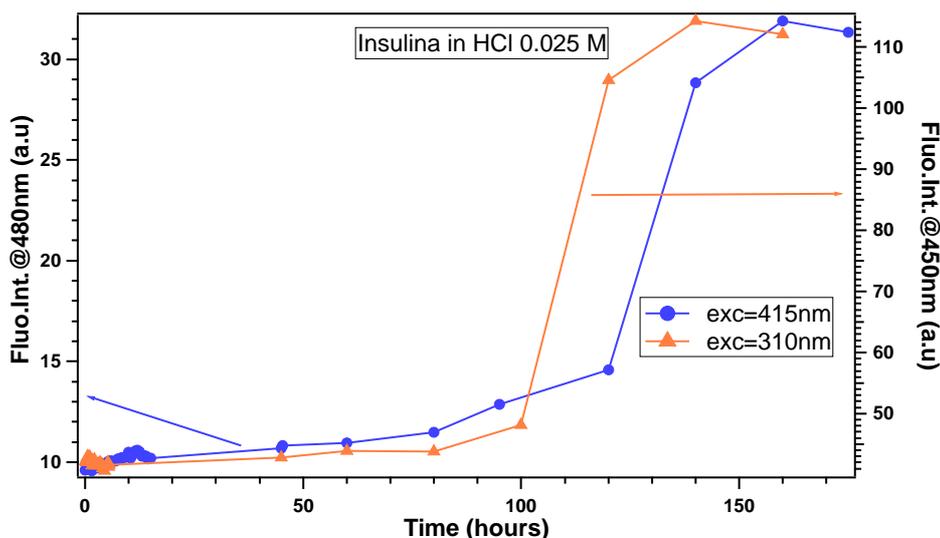


Fig. 4.7 Intensità di fluorescenza a 480 nm ($\lambda_{exc}=415$ nm) e a 450 nm ($\lambda_{exc}=310$ nm) per Insulina in HCl 0.025M (senza sale) in funzione del tempo (ore).

Il grafico dell'intensità di fluorescenza della ThT in forma monomeric e dimerica, che riporta i massimi di emissione a 450 nm e a 480 nm contro il tempo, mostra un andamento particolare: nella parte iniziale della curva (presunta *lag phase*) l'intensità di fluorescenza non varia molto, poi si ha una rapida salita della fluorescenza (presunta *growth phase*) e, infine, i valori di emissione tendono a stabilizzarsi intorno ad un valore raggiungendo un *plateau*. Questo andamento potrebbe assomigliare all'andamento sigmoidale che viene spesso citato in letteratura per quanto riguarda il meccanismo di aggregazione proteica.

Nonostante le condizioni fortemente denaturanti (pH acido, 37°C e agitazione 950 rpm), è facilmente visibile che in assenza di sali la *lag phase*, prima che si abbia un aumento di intensità di fluorescenza, risulta essere molto lunga.

Secondo quanto riportato in letteratura, l'aumento dell'emissione di fluorescenza nella fase di crescita esponenziale potrebbe essere dovuto all'aumento del numero di oligomeri in soluzione. Infatti, il segnale della ThT in soluzione è debole e poco intenso perché mediato dalla libera rotazione degli anelli benzotiazolo e benzammina della ThT intorno al legame C-C; mentre l'interazione con gli oligomeri impedisce la rotazione intorno al legame C-C per motivi sterici e l'intensità del segnale della ThT aumenta.³⁰

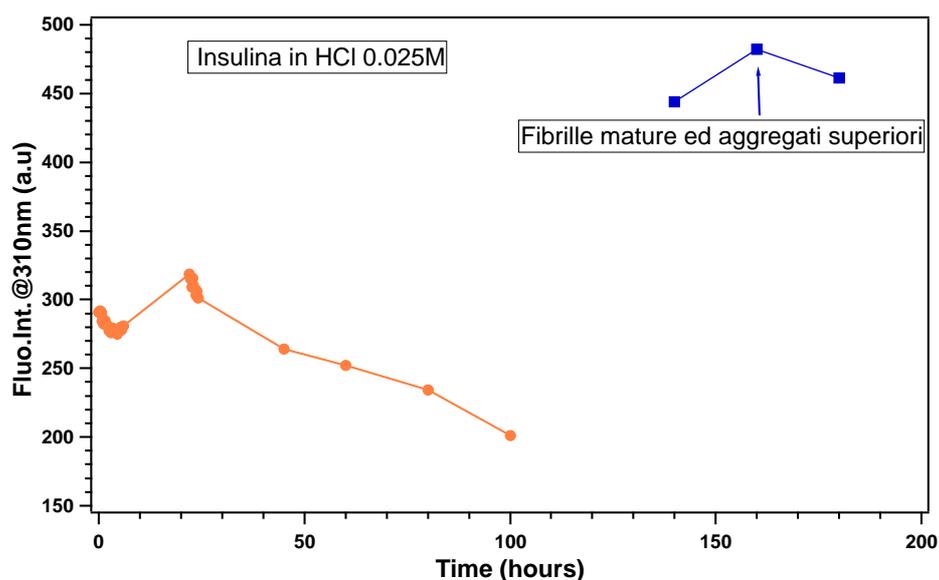


Fig. 4.8 Intensità di fluorescenza a 310 nm ($\lambda_{exc}= 275$ nm) dell'Insulina in HCl 0.025M (senza sale) in funzione del tempo (ore); il tratto di linea blu si riferisce a fibrille mature ed aggregati superiori ed è stato registrato 3 giorni dopo le misure fatte per il tratto arancione.

Si osserva che l'intensità di fluorescenza intrinseca a 310 nm tende ad una diminuzione, il tratto blu evidenzia una risalita solo perché si riferisce a misure effettuate, giorni seguenti all'aggregazione, su fibrille ormai mature e su aggregati di ordine superiore.

Lo studio della fluorescenza intrinseca è una tecnica molto utilizzata per studiare le proprietà strutturali, chimico-fisiche e funzionali delle proteine; l'emissione di fluorescenza intrinseca deriva dai cromofori aromatici contenuti nella sequenza amminoacidica della proteina (fenilalanina -Phe-, triptofano -Trp- e tirosina -Tyr-).³⁵ In particolare per l'insulina l'emissione a 310 nm ($\lambda_{exc}= 275$ nm) si riferisce ai quattro residui di tirosina, i quali sono influenzati dall'intorno chimico; infatti l'intensità dell'emissione a 310 nm è una media dei cambiamenti di tutti i parametri che influenzano il microambiente intorno alla proteina.³⁶ Il fatto che la fluorescenza della Tyr decrementi suggerisce che i residui di tirosina che si trovavano precedentemente nella tasche idrofobiche della matrice proteica, esponendosi al solvente si ritrovano accessibili ad eventuali *quencher* che "spengono" l'intensità di fluorescenza. L'interazione tra i residui di Tyr e i *quencher* è favorita dal disordine strutturale dello stato nativo (perturbazione delle interazioni intra- ed inter-molecolari) indotto dal calore e dall'elevata mobilità dinamica della proteina dovuta alla bassa viscosità del solvente.³⁶

La maggior parte degli studi sull'aggregazione di Insulina in funzione dei sali riguarda sistemi a pH acido contenenti NaCl a concentrazioni comprese tra 0.2 M e 1 M. In figura 4.9, è riportato l'andamento della cinetica in presenza del sale NaCl; è facile notare che, in presenza di NaCl a concentrazione 0.5 M (concentrazione vicina a quelle riportate in letteratura), la *lag phase* ($\lambda_{em}=480$ nm, $\lambda_{exc}=415$) si accorcia molto rispetto alla cinetica effettuata in assenza di sali in accordo con la letteratura.²²

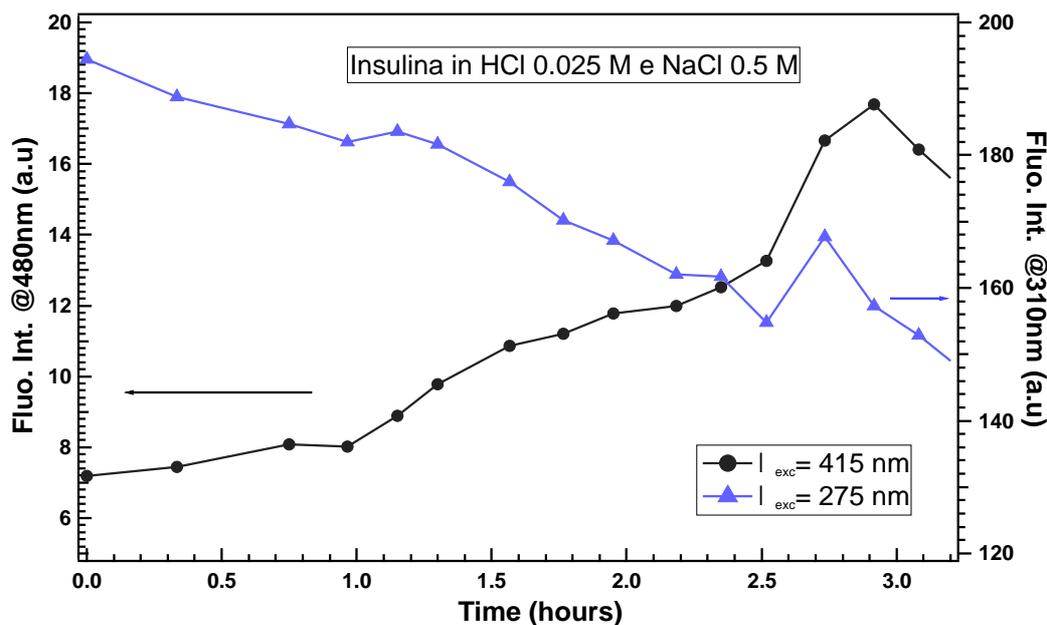


Fig. 4.9 Andamento dell'intensità di fluorescenza per insulina in HCl 0.025M e NaCl 0.5M. Asse y sinistro: a 480 nm ($\lambda_{exc}=415$); asse y destro: a 310 nm ($\lambda_{exc}=275$).

4.4 Aggregazione dell'Insulina in presenza di sali

Gli studi sulla cinetica di aggregazione dell'Insulina, in funzione dei sali e delle loro concentrazioni, sono stati effettuati utilizzando i seguenti sali: NaCl, NaF, NaBr, NaI e NaSCN a due diverse concentrazioni 0.1 M e 0.5 M. Nei seguenti grafici vengono riportati gli andamenti delle intensità di emissione di fluorescenza a 480 nm ($\lambda_{exc}=415$ nm) e a 310 nm ($\lambda_{exc}=275$ nm) in funzione del tempo (minuti); per ognuno dei due valori di emissione (480 nm e 310 nm) vengono riportati due diversi grafici: uno per la concentrazione 0.5 M (Grafico 4.10 e Grafico 4.12) e uno per quella 0.1 M (Grafico 4.11 e Grafico 4.13). In ogni grafico è inserita anche la curva di cinetica di aggregazione in assenza di sali per poterla meglio confrontare con quelle effettuate in presenza dei diversi sali.

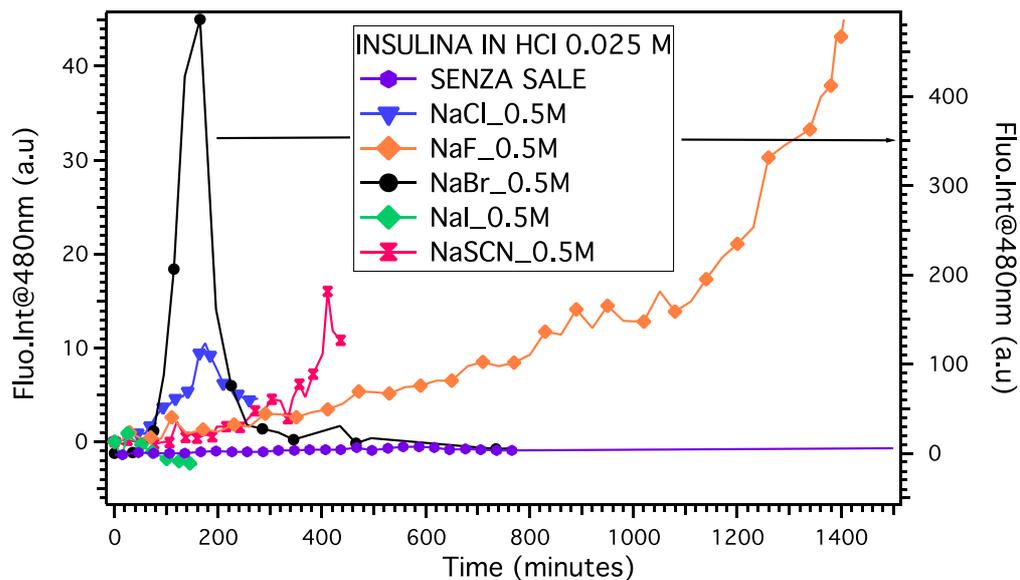


Fig. 4.10 Andamento dell'intensità di fluorescenza a 480 nm ($\lambda_{exc}=415$ nm) dell'Insulina in presenza di NaCl, NaSCN, NaBr, NaF e NaI con concentrazione 0.5 M. La linea viola si riferisce alla cinetica in assenza dei sali. Per tutte le curve è stato impostato un off set in modo tale che tutte le intensità di fluorescenza partissero da zero per poterle confrontare meglio tra loro

Per l'intensità di emissione di fluorescenza a 480 nm ($\lambda_{exc}=415$ nm) e concentrazione dei sali 0.5 M si evidenziano *lag phase* di diversa lunghezza e andamenti delle curve di tipo diverso a seconda del sale presente nella soluzione di Insulina in HCl 0.025 M.

Per quanto riguarda la curva di cinetica in presenza di NaBr si evidenzia una ripida e veloce salita dell'intensità di fluorescenza e, successivamente, un altrettanto ripida discesa che potrebbe suggerire la presenza di aggregati di dimensione maggiore che fanno decrementare l'intensità.

Nel caso degli altri sali (NaCl e NaSCN) si hanno andamenti a più regimi che indicano una crescita divisa in più *step* e probabili arresti del sistema durante il processo di aggregazione proteica.

Con NaI si denota un andamento contrario rispetto a tutti gli altri sali in quanto l'intensità di fluorescenza diminuisce, questo è attribuibile alla formazione istantanea di grossi aggregati che, precipitando, si sottraggono alle misure.

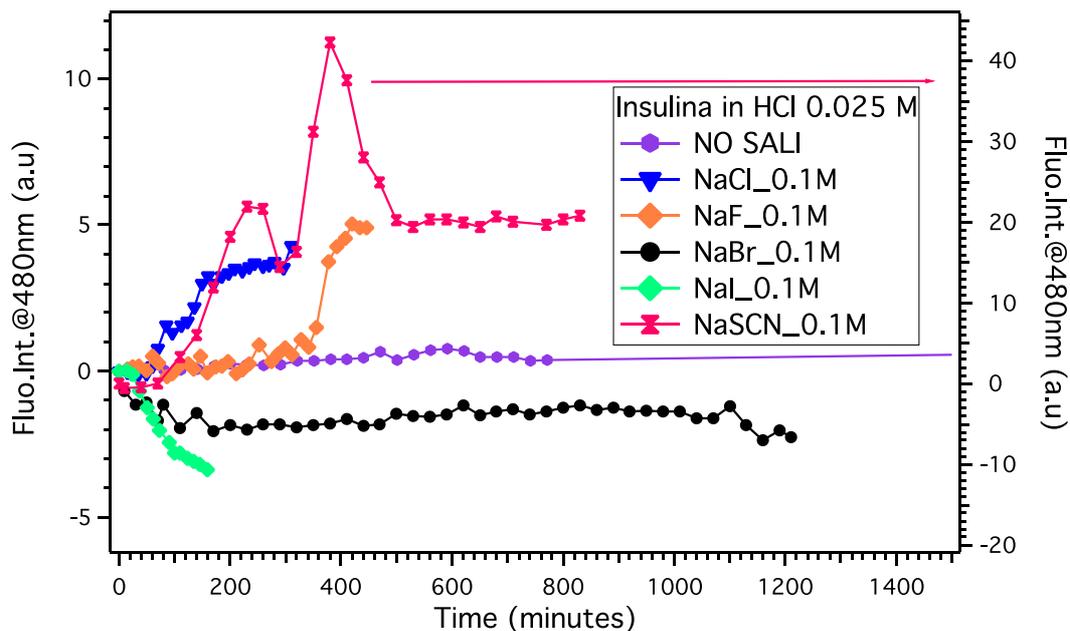


Fig. 4.11 Andamento dell'intensità di fluorescenza a 480 nm ($\lambda_{exc}=415$ nm) dell'Insulina in presenza di NaCl, NaSCN, NaBr, NaF e NaI con concentrazione 0.1 M. La linea viola si riferisce alla cinetica in assenza dei sali. Per tutte le curve è stato impostato un off set in modo tale che tutte le intensità di fluorescenza partissero da zero per poterle confrontare meglio tra loro.

Per l'intensità di emissione di fluorescenza a 480 nm ($\lambda_{exc}=415$ nm) e concentrazione dei sali 0.1 M le curve per la cinetica di aggregazione dell'Insulina mostrano andamenti molto diversi tra loro.

Le curve in presenza di NaF, NaCl e NaSCN sono caratterizzate da un regime a due *step*, cioè si possono distinguere due fasi di aumento della fluorescenza intervallate da una fase di "arresto"; nel caso di NaSCN i due *step* e la fase di arresto sono facilmente distinguibili, viceversa nel caso di NaF e NaCl queste fasi distinte sono difficilmente visibili.

Per quanto riguarda le curve cinetiche in presenza di NaBr e NaI, si può affermare che queste non seguono un andamento di tipo classico poiché l'intensità di fluorescenza anziché aumentare diminuisce; probabilmente gli anioni Br⁻ e I⁻ inducono un processo di segregazione non necessariamente di impronta fibrillare.

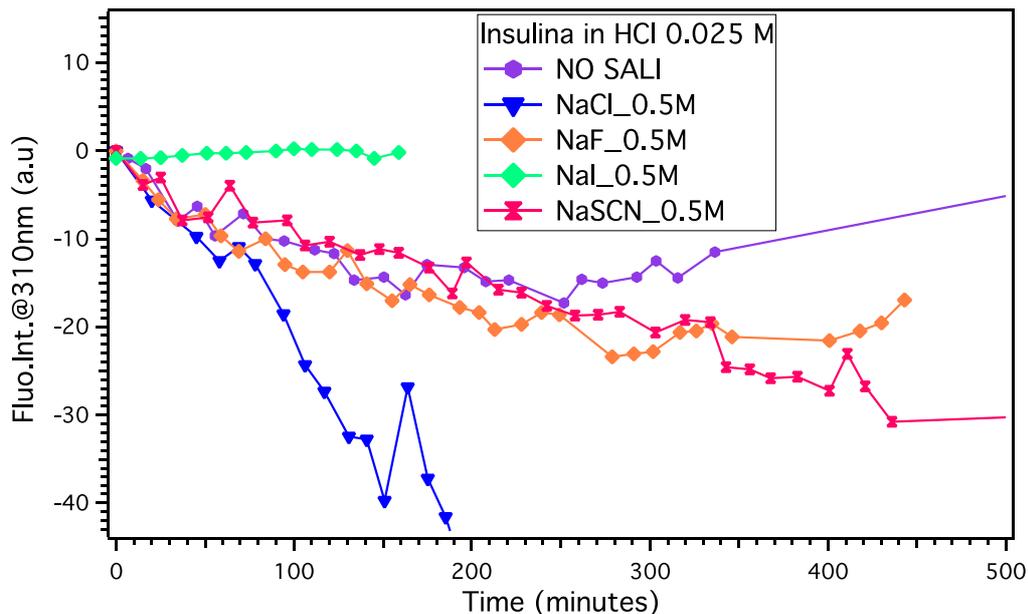


Fig. 4.12 Andamento dell'intensità di fluorescenza normalizzata a 310 nm ($\lambda_{exc}=275$ nm), dell'Insulina in presenza di NaCl, NaSCN, NaBr, NaF e NaI con concentrazione 0.5 M. La linea viola si riferisce alla cinetica in assenza dei sali. Per tutte le curve è stato impostato un off set in modo tale che tutte le intensità di fluorescenza partissero da zero per poterle confrontare meglio tra loro.

Per l'intensità di emissione di fluorescenza a 310 nm ($\lambda_{exc}=275$ nm) e concentrazione dei sali 0.5 M le curve per la cinetica di aggregazione dell'Insulina mostrano andamenti diversi tra loro. Generalmente l'emissione a 310 nm tende a decrescere con l'aumentare del tempo, questo tipo di andamento si osserva in presenza di tutti i sali eccetto nel caso di NaI in cui l'intensità di fluorescenza subisce un aumento. Dato che NaI non segue un andamento di tipo classico nemmeno nel caso dell'emissione a 480 nm ($\lambda_{exc}=415$ nm) è ancora più accreditata l'ipotesi di un processo di segregazione non necessariamente di tipo fibrillare; lo stesso andamento, se pur poco visibile nella figura 4.12, si osserva anche nel caso in cui la concentrazione del sale sia minore (0.1 M).

Per quanto riguarda l'andamento della curva di aggregazione proteica in assenza di sali (linea viola), riportato sia in figura 4.12 che in figura 4.13, è opportuno sottolineare che il decremento non è ben osservabile nei due grafici in quanto il *range* temporale riportato risulta essere troppo poco esteso, questo è stato accorciato per poter permettere di vedere l'andamento delle curve in presenza dei sali che hanno un decorso molto più breve.

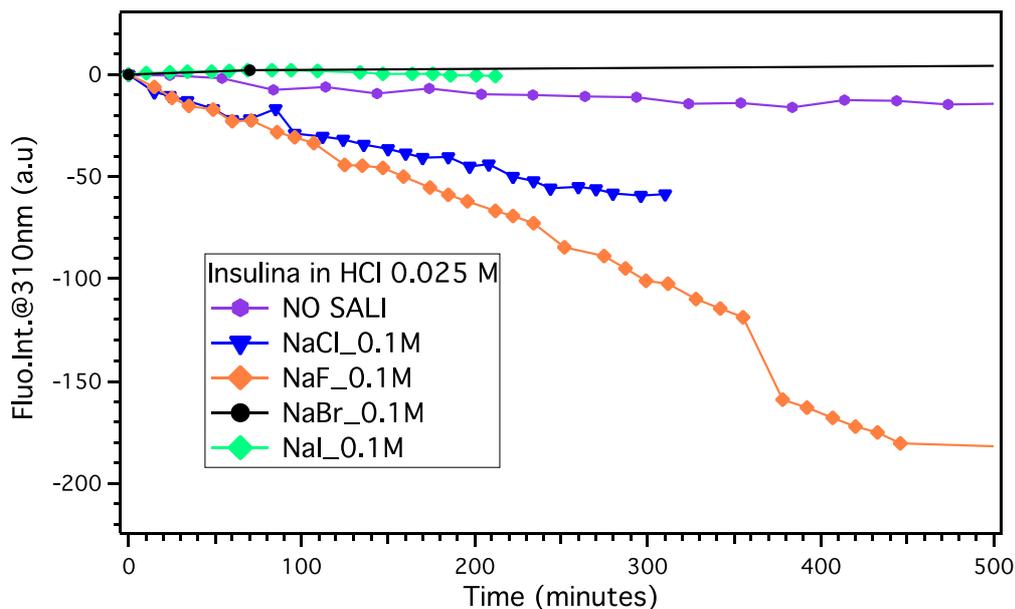


Fig. 4.13 Andamento dell'intensità di fluorescenza normalizzata a 310 nm ($\lambda_{exc}=275$ nm) dell'Insulina in presenza di NaCl, NaSCN, NaBr, NaF e NaI con concentrazione 0.1 M. La linea viola si riferisce alla cinetica in assenza dei sali. Per tutte le curve è stato impostato un off set in modo tale che tutte le intensità di fluorescenza partissero da 0 per poterle confrontare meglio tra loro

Si ritiene che la fase limitante nel processo di aggregazione dell'Insulina in fibrille sia la formazione di aggregati intermedi chiamata *lag phase*. Questa ipotesi è supportata dal fatto che gli intermedi, oligomeri parzialmente denaturati, non appena si formano aggregano rapidamente dando origine a fibrille amiloidi; ciò spiega anche perché pH bassi, agitazione vigorosa e presenza di denaturanti/stabilizzanti influiscono su questa fase e, quindi, sull'intera cinetica.¹³ La *lag phase*, come la *growth phase* (o *elongation phase*), segue probabilmente una cinetica del primo ordine.¹³

La forza ionica sembra influenzare l'aggregazione proteica, attraverso effetti sulla stabilità conformazionale degli intermedi, schermando le cariche repulsive sulla superficie delle molecole di insulina, facilitando la formazione di fibrille e diminuendone il tempo di formazione. Questo spiega perché all'aumentare della forza ionica si nota una diminuzione del tempo di formazione degli oligomeri (*lag time*) e, di conseguenza, delle fibrille.

Quando la concentrazione del sale è sufficientemente alta (0.5 M) le interazioni elettrostatiche vengono schermate ed emergono quelle dispersive che sono ione-specifiche; se lo ione si adsorbe all'interfase insulina-acqua, cambia radicalmente il set di cariche esposte sulla superficie dell'Insulina e questo può influire su una o

più fasi dell'intero processo. Alla concentrazione 0.5 M si può vedere un effetto significativo dell'anione lungo la serie. Essendo il sistema a pH 1.6, l'Insulina si trova carica positivamente e, quindi, in linea di principio tutti gli anioni monovalenti (fluoruro, cloruro, bromuro, ioduro, tiocianato) dovrebbero interagire con essa allo stesso modo, ma in realtà non è così. Questo risultato indica che, a seconda del regime di concentrazione dei sali, la fibrillazione dell'Insulina è controllata non sola da interazioni elettrostatiche, ma anche idrofobiche.

4.5 Analisi cinetica delle curve di aggregazione

L'analisi cinetica delle curve di aggregazione dell'Insulina può essere fatta attraverso *fitting* a complessità crescente (lineare, sigmoidale e *dock and lock*). In prima approssimazione è stato effettuato un fitting di tipo lineare (Figura 4.14); le tre rette si riferiscono alle tre diverse fasi del processo di aggregazione in fibrille amiloidi (*lag phase*, *growth phase* e *equilibrium phase*). Nella *lag phase* non si apprezza nessun cambiamento dell'intensità di emissione di fluorescenza, nella *growth phase* si nota un aumento di tipo esponenziale e infine, nell'*equilibrium phase* si raggiunge un *plateau* in cui l'intensità di fluorescenza raggiunge un valore costante.

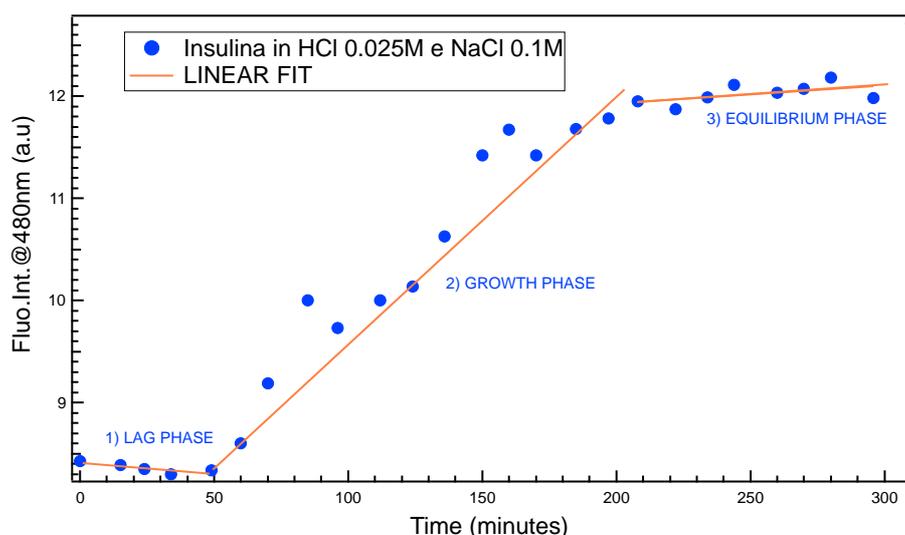


Fig. 4.14 Fitting lineare della curva che riporta l'andamento del massimo di emissione a 480 nm (eccitazione 415 nm) in funzione del tempo (minuti) per la soluzione di Insulina in HCl 0.025M e NaCl 0.1M.

Le tre diverse fasi del processo sono facilmente distinguibili anche nel secondo livello di *fitting*, quello di tipo sigmoideale (figura 4.15).

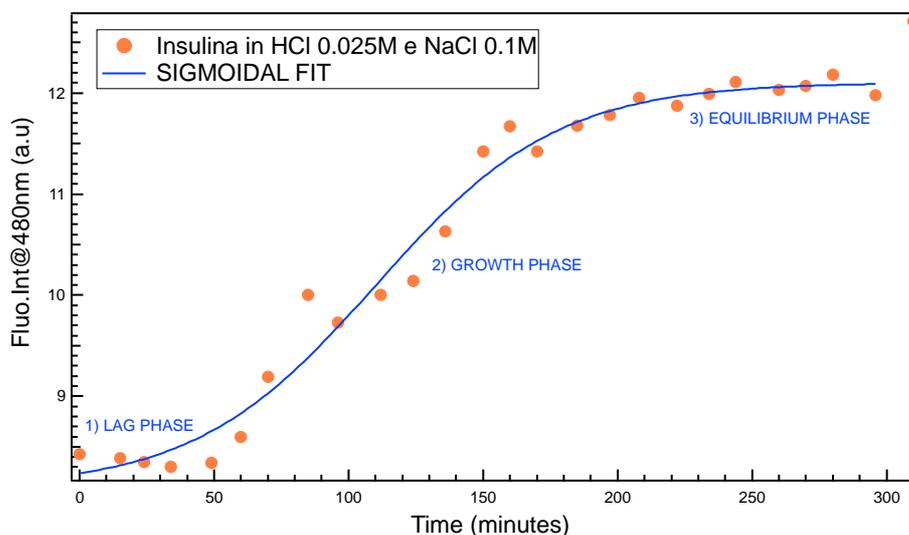


Fig. 4.15 Fitting sigmoideale della curva che riporta l'andamento del massimo di emissione a 480 nm (eccitazione 415 nm) in funzione del tempo (minuti) per la soluzione di Insulina in HCl 0.025M e NaCl 0.1M.

In realtà, prima della *lag phase*, esiste un'altra fase di equilibrio metastabile e transiente nella quale l'intensità di emissione di fluorescenza cambia continuamente (figura 4.16); questa fase potrebbe essere attribuita o all'equilibrio tra le diverse specie in cui l'Insulina si può trovare in soluzione (esamero, tetramero, dimero e monomero), oppure all'equilibrio della ThT (forma monomerică e dimerica) che fatica ad inserirsi nelle porzioni ricche di β -sheets. Però osservando questo equilibrio, precedente alla fibrillazione, anche per l'emissione a 310 nm (riferita ai residui di Tirocina dell'Insulina) è maggiormente probabile che si riferisca all'equilibrio della proteina tra tutte le sue forme presenti in soluzione.

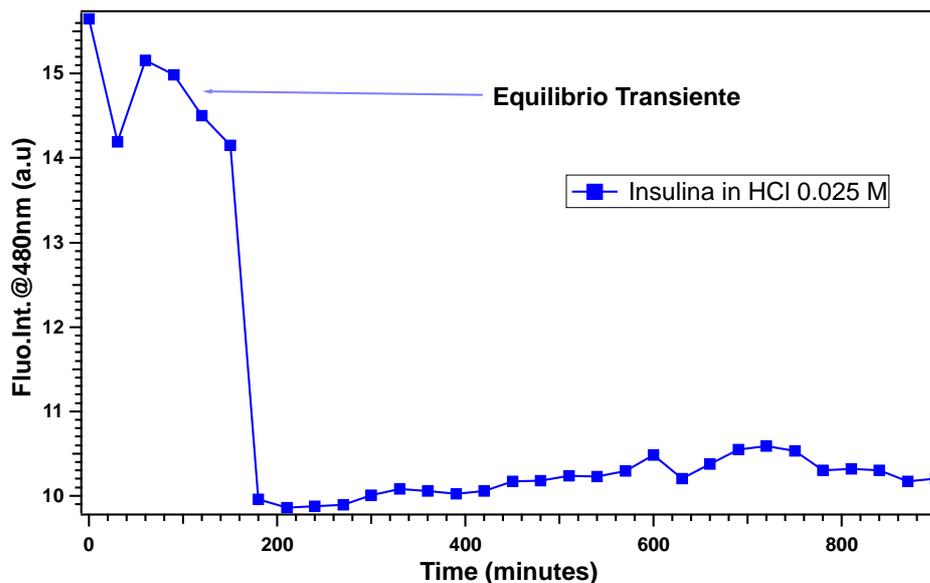


Fig. 4.16 Intensità di fluorescenza a 480 nm ($\lambda_{exc}= 415$ nm) per Insulina in HCl 0.025M (senza sale) in funzione del tempo (ore).

Esistono ulteriori metodi di aggregazione che prevedono meccanismi *dock and lock* in cui gli oligomeri sono in equilibrio dinamico con le prime fibrille e si possono staccare e riattaccare.³³

Per quanto riguarda il *fitting* di tipo lineare i parametri indagati sono: *lag time*, $t_{1/2}$ e $\frac{F_{max}}{F_0}$. Il *lag time* è il tempo necessario per la formazione degli oligomeri solubili che costituiscono nuclei in grado di accogliere ulteriori oligomeri e formare, così, aggregati proteici; $t_{1/2}$ è il tempo corrispondente a metà del massimo di fluorescenza; F_{max} è la massima intensità di emissione di fluorescenza, F_0 è la minima intensità di emissione di fluorescenza e $\frac{F_{max}}{F_0}$ è il rapporto tra le due.¹³ In tabella 4.2 sono riportati questi parametri per i sali a concentrazione 0.1 M e 0.5 M.

Tabella 4.2 Parametri ricavati dal fitting lineare per le cinetiche delle soluzioni di Insulina contenenti i sali a concentrazione 0.5 M e 0.1 M. La prima riga della tabella si riferisce all'Insulina senza sale. Per lo ioduro (0.5 M e 0.1 M) e per il bromuro (0.1 M) i parametri non possono essere ricavati in quanto la cinetica in presenza di questo sale non segue un andamento di tipo classico.

	[salt], M	Lag time, min	$\frac{F_{max}}{F_0}$	$t_{1/2}$, min	k_{app} , min ⁻¹	τ , min
No salt	0	160	1.09	200	5×10^{-3}	200
F⁻	0.5	200	5.37	1200	2.1×10^{-3}	485
Cl⁻	0.5	40	1.85	88	0.021	48.5
Br⁻	0.5	55	28.25	137	0.028	35.35
I⁻	0.5	-	-	-	-	-
SCN⁻	0.5	106	2.14	380	8.4×10^{-3}	118.5
F⁻	0.1	234	0.71	360	0.021	47
Cl⁻	0.1	49	1.46	80	0.023	43.5
Br⁻	0.1	-	-	-	-	-
I⁻	0.1	-	-	-	-	-
SCN⁻	0.1	70	4.80	170	0.013	72.78

Per quanto riguarda il fitting sigmoidale è stata utilizzata l'equazione 4.1

$$F = F_0 + at + \frac{F_{max} + bt}{1 + \exp[-k_{app}(t - t_{1/2})]} \quad (4.1)$$

dove F_0 = intensità di fluorescenza iniziale (*lag phase*); F_{max} = intensità di fluorescenza finale (*plateau*); a = pendenza nel tratto della *lag phase*; b = pendenza nel tratto finale (*plateau*); t = tempo; $t_{1/2}$ = tempo corrispondente al 50% della massima F e $k_{apparente}$ = costante cinetica apparente del primo ordine per la crescita fibrillare (*growth/elongation phase*). I parametri contenuti all'interno dell'equazione sono quelli analizzati per studiare l'effetto dei sali sulla cinetica di aggregazione proteica; la $k_{apparente}$ equivale a $1/\tau$ ed è calcolata considerando che il lag time equivale a $t_{1/2} - 2\tau$.

Tabella 4.3 Parametri ricavati dal fitting sigmoidale per le cinetiche delle soluzioni di Insulina contenenti i sali a concentrazione 0.5 M e 0.1 M. La prima riga della tabella si riferisce all'Insulina senza sale.

	[salt], M	x_{half} , min	base	max	τ , min
No salt	0	333.6±0.81	9.55± 0.16	0.91±0.30	160.8±1.27
F⁻	0.5	780.64±0.584	13.64±0.584	73.93±2.68	206.4±0.22
Cl⁻	0.5	88.09±5.14	6.98±0.35	6.38±0.77	25.09±5.5
Br⁻	0.5				
I⁻	0.5	-	-	-	-
SCN⁻	0.5	554.24±495	10.67±0.47	98.1±528	70.76±33.9
F⁻	0.1	368.58 ± 4.73	12.63 ±4.7	5.1± 0.4	18.22 ± 3.12
Cl⁻	0.1	341.7±0.0017	5.87±3.48	103±0.002	2.68±1.27
Br⁻	0.1	-	-	-	
I⁻	0.1	-	-	-	
SCN⁻	0.1	160.63±17.2	10.24±2.42	21.78±3.57	25.06±15.4

Per lo ioduro (0.5 M e 0.1 M) e per il bromuro (0.1 M) i parametri non possono essere ricavati in quanto la cinetica in presenza di questo sale non segue crescita sigmoidale. Base = $F_0 + at$; Max = $F_{max} + bt$; $\tau = \frac{1}{k_{app}}$ e $x_{half} = t_{1/2}$. Riferiti a questi parametri vengono inseriti in tabella anche i valori della deviazione standard corrispondenti.

4.6 Interpretazione dell'effetto dello ione specifico

Dai *fitting* delle curve cinetiche di aggregazione proteica, si possono ricavare parametri importanti per studiare l'effetto del diverso ione specifico, e della sua concentrazione, sull'aggregazione dell'Insulina in fibrille amiloidi.

Per valutare questo effetto, i parametri derivanti dal *fitting* lineare delle curve cinetiche sono stati messi in relazione con alcune proprietà chimico-fisiche che, dipendendo dalla configurazione elettronica delle specie ioniche, riflettono le loro

interazioni con l'ambiente circostante e sono specifiche per ogni singola specie anionica. In particolare i valori di $k_{apparente}$ sono stati valutati in funzione del $\Delta G_{idratazione}$, della polarizzabilità α , della tensione superficiale σ e del coefficiente di Jones-Dole B_{JD} .

Il ΔG di idratazione, espresso in kJ/mol , esprime la variazione di energia libera di Gibbs coinvolta nel processo di idratazione e, quindi, riflette le interazioni tra lo ione e l'acqua; ioni *cosmotropi* con alta capacità di idratarsi (tipo il fluoruro) hanno, in valore assoluto, un elevato valore di ΔG , mentre ioni *caotropi* con bassa tendenza ad idratarsi (come lo ioduro) hanno un minore valore assoluto di ΔG .

La polarizzabilità α è un coefficiente di proporzionalità tra la polarizzazione indotta μ e l'intensità del campo elettrico che ha causato tale polarizzazione ($\mu = E \alpha$); ioni *cosmotropi* (alto rapporto q/r) hanno bassi valori di α , ioni *caotropi* hanno alti valori di α .

La tensione superficiale σ equivale a $\sigma = \frac{\partial \Delta \gamma}{\partial c}$ dove $\Delta \gamma$ rappresenta la variazione della tensione superficiale proteina-acqua e c è la concentrazione del sale in soluzione; ioni *cosmotropi* interagenti con l'acqua hanno alti valori di σ , mentre ioni *caotropi*, che sfuggono all'interazione con l'acqua, hanno valori più bassi di σ .

Il valore sperimentale della viscosità η di una soluzione acquosa contenente elettroliti può essere calcolata attraverso l'equazione: $\eta_{sale} = \eta_0(1 + A\sqrt{c} + B_{JD}c)$ dove c è la concentrazione del sale, η_0 è la viscosità dell'acqua pura, A è un coefficiente che dipende dalla stereochimica dell'elettrolita sempre positivo e B_{JD} coefficiente di viscosità di Jones-Dole che dipende dall'idratazione degli elettroliti. A basse concentrazioni di elettrolita ($1\mu\text{M}$ - 1mM) il termine $B_{JD}c$ diventa trascurabile, l'equazione diventa $\eta_{sale} = \eta_0 + A\sqrt{c}$ e predomina il coefficiente A . il coefficiente B_{JD} diventa rilevante a concentrazioni del sale sufficientemente elevate ed è positivo per ioni *cosmotropi* e negativo per ioni *caotropi*, ioni poco idratati mostrano un piccolo cambiamento della viscosità mentre ioni molto idratati grande.

A forza ionica maggiore l'effetto dello ione specifico prevale, per questo motivo i valori di $k_{apparente}$ derivanti dal *fitting* lineare delle curve cinetiche a concentrazione 0.5 M sono stati plottati in funzione di $\Delta G_{idratazione}$, α , σ e B_{JD} .

Tali valori vengono riportati in tabella 4.4; il grafico che riporta questi plot sono riportati in figura 4.17 (A, B, C, D).

Tabella 4.4 Valori di $\Delta G_{idratazione}$, α , σ , B_{JD} e k_{app} per NaF, NaCl, NaBr e NaSCN. La k_{app} è quella calcolata dal fitting lineare in presenza dei sali a concentrazione 0.5 M; per NaI non è stata potuta calcolare perché il profilo cinetico non può essere fittato nel modo utilizzato per gli altri sali.

	k_{app}, min^{-1}	$\alpha, \text{\AA}^3$	$-\Delta G_{idr}, \text{kJmol}^{-1}$	σ, Nm^{-1}	B_{JD}, Lmol^{-1}
F ⁻	2.1×10^{-3}	1.30	465	1.60	0.107
Cl ⁻	0.021	3.73	340	1.76	-0.005
Br ⁻	0.028	5.06	315	1.31	-0.033
I ⁻	-	7.46	275	1.02	-0.073
SCN ⁻	8.4×10^{-3}	6.47	280	1.06	0.022

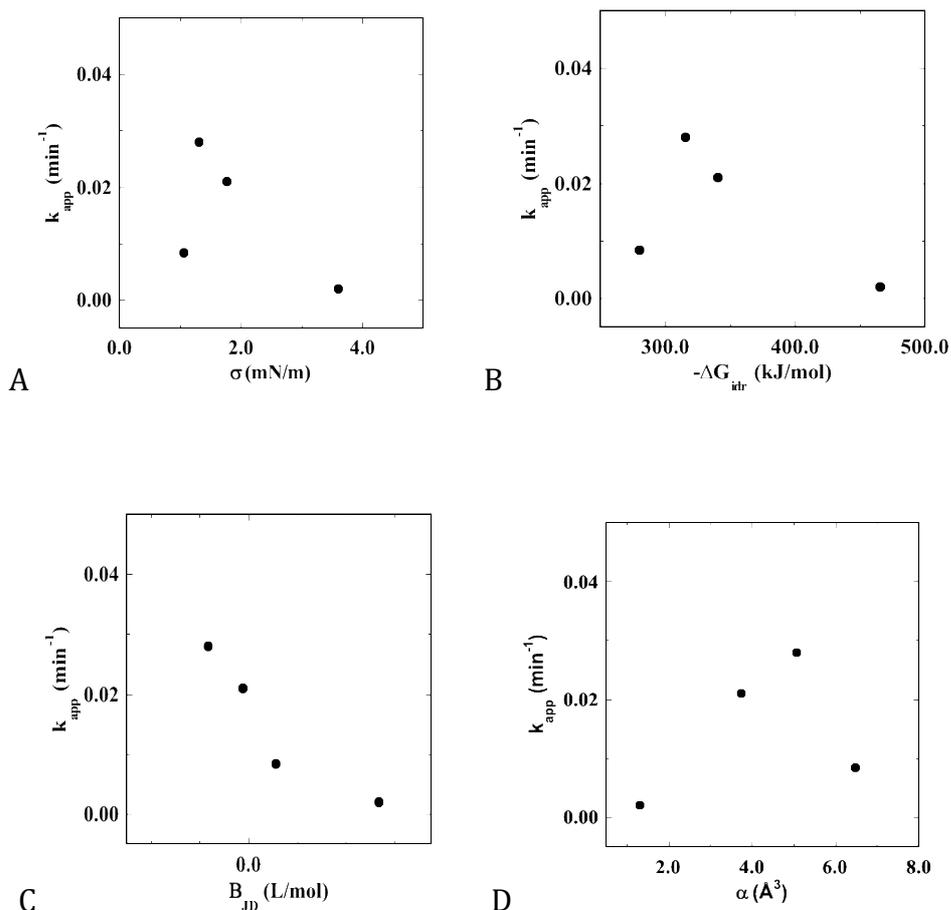


Fig. 4.17 Grafici in cui viene riportata la k_{app} in funzione di: tensione superficiale σ (A), $\Delta G_{idratazione}$ (B), coefficiente di Jones-Dole B_{JD} (C) e polarizzabilità α (D).

Ad esclusione del tiocianato, si nota un andamento regolare della $k_{apparente}$ in funzione dei proprietà chimico-fisiche specifiche dell'anione; in particolare nel caso della polarizzabilità α i valori di $k_{apparente}$ (4.17 D) aumentano, mentre nel caso delle altre proprietà (4.17 A, B e C) i valori di $k_{apparente}$ diminuiscono.

Questi andamenti regolari dimostrano l'esistenza di un effetto Hofmeister nell'andamento di $k_{apparente}$ che probabilmente influenza sia l'interfase aggregati/acqua che l'idratazione degli oligomeri.

4.7 Analisi struttura secondaria delle fibrille mature tramite misure di Dicroismo Circolare (CD)

Esperimenti di Dicroismo Circolare sugli aggregati maturi danno indicazioni sulla loro struttura secondaria;³⁷ in particolare, evidenziano le percentuali di α -eliche, β -sheets, β -turns e *random coils* presenti nei campioni.

Le misure di Dicroismo Circolare sono state effettuate dopo aver terminato lo studio della cinetica di aggregazione, per assicurarsi che i campioni fossero per la maggior parte fibrillati e ricchi di aggregati maturi; il fatto che tutti i campioni fossero "invecchiati" al momento delle misure CD indica che probabilmente le strutture più grosse di aggregati fibrillari si sono depositate sul fondo della celletta sottraendosi alle misure, come si vedrà nel paragrafo successivo i dati CLSM confermano questa ipotesi.

Il *range* entro cui sono state fatte le misure è (195-300) nm, però non è stato possibile effettuare misure su tutte le soluzioni di lavoro contenenti Insulina e sali, poiché alcuni anioni in determinate concentrazioni disturbano i segnali CD nella regione dell'ultravioletto (400-100) nm.³⁵ Infatti, secondo quanto riportato in letteratura, molti anioni assorbono nell'ultravioletto o da soli o nella forma di complessi con cationi metallici, come per esempio: solfato, nitrato, fosfato, ioduro e tiocianato.³⁵ In particolare non è stato possibile analizzare la soluzione contenente lo ioduro (ad entrambe le concentrazioni) e quella contenente il tiocianato a concentrazione 0.5 M.

Nelle figure 4.18 e 4.19 sono riportati gli di Dicroismo Circolare per i campioni di fibrille mature in assenza di sale e in presenza di NaCl, NaBr, NaF e NaSCN alle due concentrazioni di sale esaminate (0.5 M e 0.1 M).

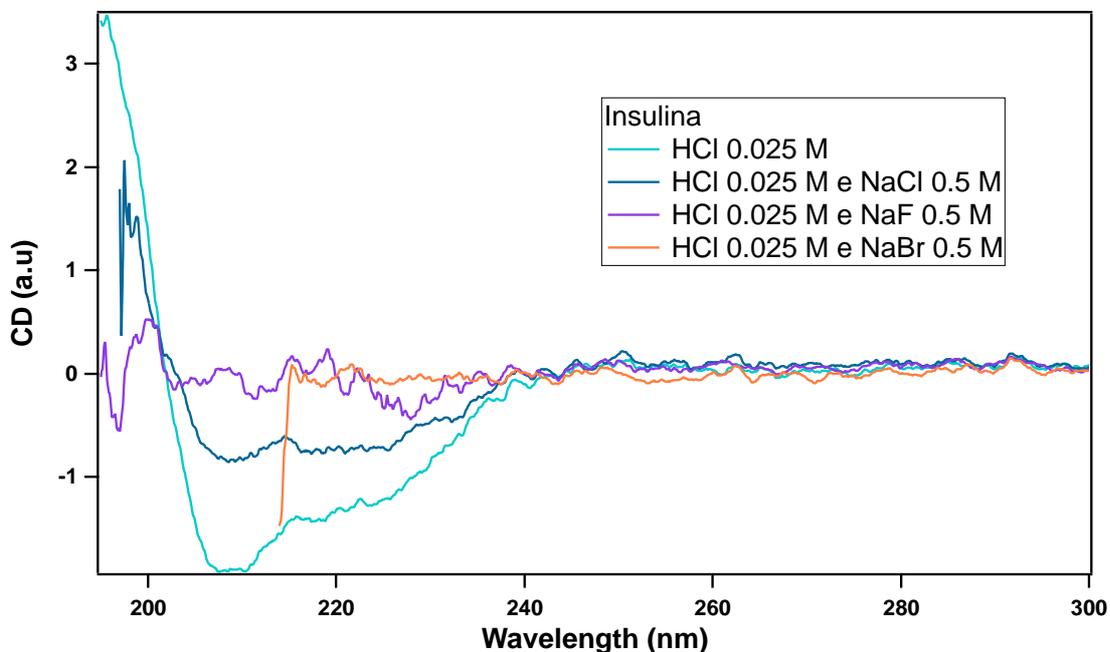


Fig. 4.18 Spettri di Dicroismo Circolare delle soluzioni di Insulina in HCl 0.025M (pH=1.6) senza sale e in presenza di NaCl, NaF e NaBr con concentrazione 0.5 M.

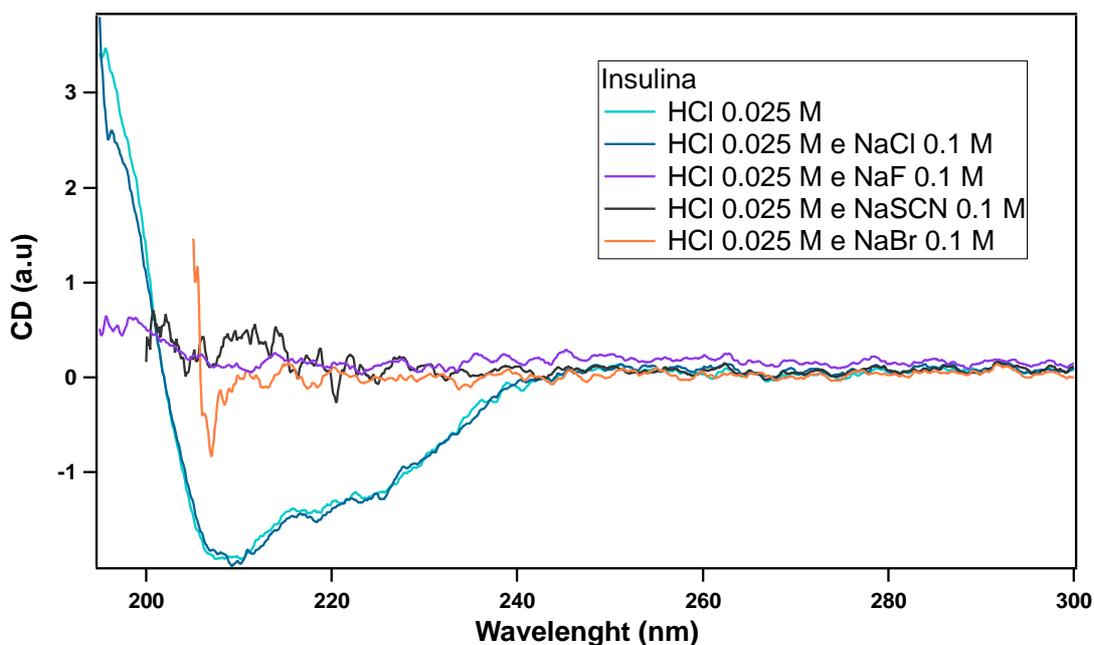


Fig. 4.19 Spettri di Dicroismo Circolare delle soluzioni di Insulina in HCl 0.025M (pH=1.6) senza sale e in presenza di NaCl, NaF, NaSCN e NaBr con concentrazione 0.1 M.

Nel caso dell'Insulina in assenza di sali, la presenza di due segnali nello spettro CD a 208 e 222 nm (tipici di una struttura α -elica) indica che una grossa percentuale di campione si trova sotto forma di una struttura secondaria non ancora β -sheets, probabilmente perché in soluzione c'è una maggiore concentrazione di aggregati piccoli che mantengono una struttura secondaria α -elica. I segnali sotto 200 nm sono indicativi di processi *unfolding* dell'insulina che portano ad un aumento in soluzione di strutture secondarie di tipo *random coil*.

In presenza di NaCl si osserva una diminuzione del segnale CD a 208 nm e a 222 nm indicativa di una riduzione del contenuto di α -elica nella struttura secondaria.

In presenza di NaF si osserva un quasi totale abbattimento del segnale CD probabilmente riferibile al fatto che gli aggregati fibrillari formati in presenza di questo sale sono molto grandi e pesanti per cui precipitano sul fondo della celletta, come verrà confermato nel paragrafo successivo dai dati CLSM.

In presenza di NaBr, l'elevato assorbimento di questo sale nel *far-UV* non ha permesso l'acquisizione del segnale CD della proteina e per questo motivo il campione è stato molto diluito per minimizzare l'effetto del sale.

In generale negli spettri di dicroismo circolare degli aggregati maturi di Insulina, sia in assenza sia in presenza dei sali, non si osservano le bande a 270-290 nm, relative ai residui di tirosina, e la banda tra 250 nm e 350 nm relativa ai ponti disolfuro.

In accordo con Saupe et al ³⁸ si possono, in prima approssimazione, considerare come parametri caratteristici della progressiva formazione di fibrille mature i valori di CD a 217 e a 210 nm; molto significativo è il rapporto tra i due valori di CD $\left(\frac{CD_{217\text{ nm}}}{CD_{210\text{ nm}}}\right)$ che risulta essere proporzionale alla frazione di aggregati maturi che contengono come struttura secondaria β -sheets. Questo parametro è stato analizzato per gli aggregati fibrillari in presenza di sali a concentrazione 0.5 M (tabella 4.5) e per quelli in presenza di sali a concentrazione 0.1 M (Tabella 4.6).

Tab. 4.5 Valori (CD a 210 nm, a 217 nm e rapporto tra i due) ottenuti dagli spettri di Dicroismo Circolare per gli aggregati maturi di Insulina senza sale e in presenza di NaCl, NaF e NaBr a 0.5 M. Nel caso del bromuro non è stato possibile registrare lo spettro nell'intero range e, di conseguenza, il valore CD a 210 nm non può essere calcolato.

	CD @ 217 nm	CD @ 210 nm	$\frac{CD_{217\text{ nm}}}{CD_{210\text{ nm}}}$
Insulina in HCl 0.025 M	-1.9038	-1.4052	0.741
Insulina in HCl 0.025 M e NaCl 0.5 M	-0.83299	-0.74788	0.8978
Insulina in HCl 0.025 M e NaF 0.5 M	-0.062195	-0.099325	1.597
Insulina in HCl 0.025 M e NaBr 0.5 M	0.09983	-	-

Tab. 4.6 Valori (CD a 210 nm, a 217 nm e rapporto tra i due) ottenuti dagli spettri di Dicroismo Circolare per gli aggregati maturi di Insulina senza sale e in presenza di NaCl, NaF, NaBr e NaSCN a 0.1 M.

	CD @ 217 nm	CD @ 210 nm	$\frac{CD_{217\text{ nm}}}{CD_{210\text{ nm}}}$
Insulina in HCl 0.025 M	-1.9038	-1.4052	0.741
Insulina in HCl 0.025 M e NaCl 0.1 M	-1.4488	-1.953	1.348
Insulina in HCl 0.025 M e NaF 0.1 M	0.16626	0.12661	1.313
Insulina in HCl 0.025 M e NaBr 0.1 M	-0.055927	-0.070503	0.793
Insulina in HCl 0.025 M e NaSCN 0.1 M	0.16785	0.41101	0.408

Dai dati riportati nelle tabelle 4.5 e 4.6, in particolare per quanto riguarda i valori di $\frac{CD_{217\text{ nm}}}{CD_{210\text{ nm}}}$ si possono fare alcune considerazioni sulla struttura secondaria dell'Insulina e sulla percentuale di domini β -sheets presenti nei campioni in presenza e in assenza dei sali.

Nel caso dell'Insulina in assenza di sali, il basso rapporto 217/210 conferma ciò che è stato detto in precedenza riguardo ai segnali più significativi dello spettro CD e ribadiscono che la percentuale di campione con struttura secondaria β -sheets è molto bassa.

Per quanto riguarda l'Insulina in presenza di NaCl il rapporto 217/210 aumenta rispetto all'Insulina in assenza di sali e questo suggerisce la presenza in soluzione di una maggiore frazione di zone ricche di struttura β -sheets (circa il 50% del campione a concentrazione 0.5 M, 80% a concentrazione 0.1 M).

In presenza di NaF l'Insulina presenta quasi totalmente una struttura di tipo β -*sheets*, circa l'80% del campione, probabilmente riferibile al fatto che gli aggregati fibrillari formati in presenza di questo sale sono molto grandi e pesanti (come confermato dai dati CLSM) per cui precipitano sul fondo della celletta diminuendo la frazione di fibrille presenti in soluzione.

In presenza di NaBr 0.1 M il rapporto 217/210 indica una bassa presenza di struttura β -*sheets* in soluzione.

Infine, nel caso di NaSCN si registra il più basso valore del rapporto 217/210 corrispondente ad una struttura prevalentemente α -*elica*.

4.8 Studio della morfologia degli aggregati maturi tramite Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Misure di *Confocal Laser Scanning Microscopy* abbinate alla spettroscopia di emissione spazialmente risolta permettono di analizzare la morfologia delle fibrille mature e di valutarne la correlazione con la specificità dell'anione. Spettri spazialmente risolti forniscono informazioni importanti sull'intensità di emissione di fluorescenza nelle regioni di particolare interesse all'interno del campione.

Per la caratterizzazione CLSM delle fibrille mature di Insulina è necessario utilizzare una sonda fluorescente, quelle più comunemente usate per lo studio di fibrille amiloidi sono la Tioflavina T (ThT) ed il Congo Red (CR), che mostrano segnali di fluorescenza diversi se liberi in soluzione o se intercalati nelle porzioni ricche di β -*sheets* dei peptidi.²⁸ Le soluzioni di Insulina da analizzare contengono già al loro interno un'aliquota di ThT poichè è stata utilizzata come *probe* fluorescente durante l'analisi della cinetica di aggregazione, quindi non è necessario aggiungere nessuna sonda fluorescente.

In figura 4.20 vengono riportate le immagini CLSM ottenute per il campione di Insulina in assenza di sali insieme agli spettri di emissione ottenuti nei domini morfologici evidenziati.

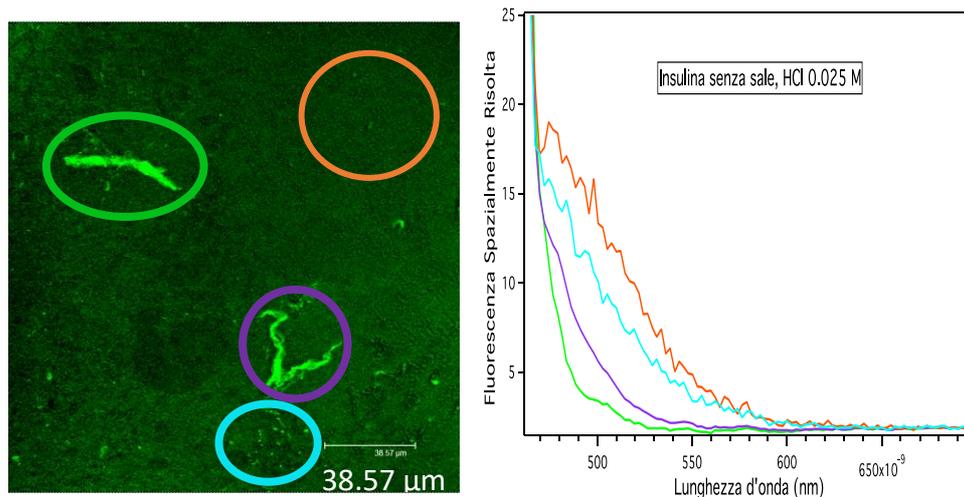


Fig. 4.20 Immagine CLSM e spettro spazialmente risolto delle fibrille amiloidi di Insulina in HCl 0.025 M (senza sale) marcate con Tioflavina T. Il colore degli spettri corrisponde al colore alle zone circondate nell'immagine di sinistra.

Dall'immagine CLSM è evidente la presenza di fibrille, raccolte in aggregati proteici corrispondenti alle zone verdi di maggiore intensità, ma anche di aggregati pre-fibrillari oligomerici. In assenza di sali l'Insulina presenta "bande" di aggregati fibrillari di tipo classico, in accordo con quanto riportato in letteratura.⁵ Lo spettro di emissione di fluorescenza presenta due bande di emissione, difficilmente distinguibili, intorno a 480 e 520 nm attribuibili alla ThT rispettivamente intercalata in zone ricche di β -sheets delle fibrille e interagente con aggregati non fibrillari, probabilmente oligomeri.

Nel caso di NaCl 0.5 M l'immagine CLSM, riportata in figura 4.21, evidenzia la presenza di aggregati fibrillari di dimensione maggiore rispetto a quelle osservate in assenza di sali.

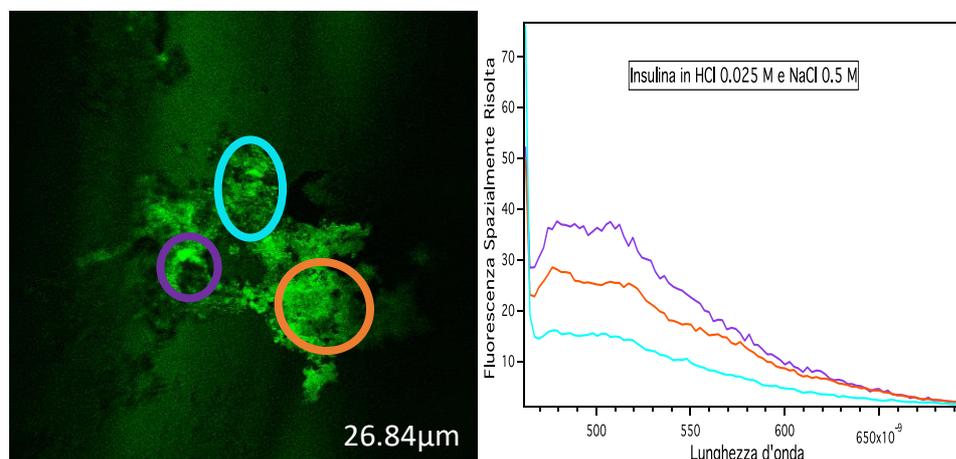


Fig. 4.21 Immagine CLSM e spettro spazialmente risolto delle fibrille amiloidi, marcate con Tioflavina T, di Insulina in HCl 0.025 M e NaCl 0.5 M. Il colore degli spettri corrisponde al colore alle zone circondate nell'immagine di sinistra.

Nello spettro di emissione di fluorescenza spazialmente risolta di Insulina in NaCl si notano bande ad intensità mediamente elevata e, in particolare, si distinguono molto bene due contributi a 480 nm e a 520 nm. L'emissione a 480 nm è dovuta alla Tioflavina T che si trova intercalata nelle porzioni ricche di β -sheets delle fibrille amiloidi, invece l'emissione a energie minori ($\lambda = 520$ nm) è attribuibile a specie dimeriche di ThT con una diversa geometria che probabilmente sono associate ad aggregati di tipo pre-fibrillare o oligomerico.

Le immagini CLSM e gli spettri di emissione di fluorescenza risultano essere fondamentali per il campione contenente NaI 0.5 M che non è stato possibile caratterizzare in nessun altro modo; misure di CLSM danno informazioni dirette sugli aggregati pesanti che si vengono a formare in soluzione e che, precipitando in fondo alla cassetta, si sottraggono alle misure in soluzione (Emissione di Fluorescenza e Dicroismo Circolare). Misure di CLSM per il campione contenente NaI 0.5 M sono riportate in Figura 4.22.

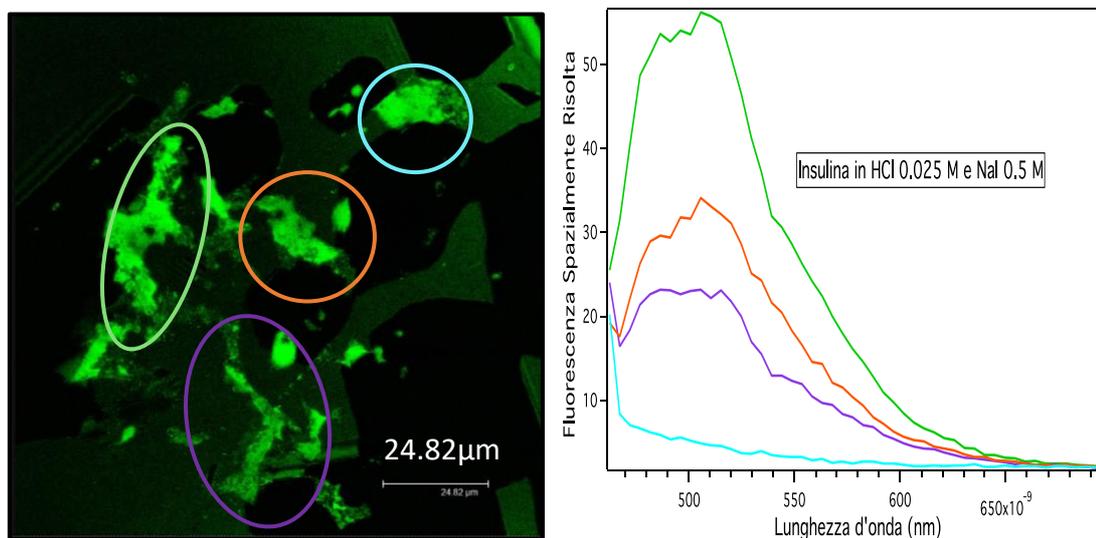


Fig. 4.22 Immagine CLSM e spettro spazialmente risolto delle fibrille amiloidi, marcate con Tioflavina T, di Insulina in HCl 0.025 M e NaI 0.5 M. Il colore degli spettri corrisponde al colore alle zone circondate nell'immagine di sinistra. Le ombre di colore molto scuro (quasi nero) corrispondono a cristalli del sale; intorno ai cristalli si notano aggregati fibrillari.

Dall'immagine 4.22 si evidenziano aggregati fibrillari di dimensioni molto grandi e più larghi rispetto a quelli osservati nel caso dell'Insulina in assenza di sali, probabilmente questi estesi agglomerati che si formano istantaneamente tendono a formare compartimenti sottraendosi alle misure in soluzione (CD e emissione di fluorescenza). Per quanto riguarda lo spettro spazialmente risolto nel caso di Insulina in NaI 0.5 M si osservano segnali molto intensi e spostati a lunghezze d'onda maggiori probabilmente dovuti a popolazioni di ThT dimerica intercalate in aggregati non esclusivamente di tipo β -sheet come dimostrato dalla presenza di un picco a 520 nm.

Per quanto riguarda l'Insulina in presenza di NaF 0.5 M, in figura 4.23 vengono riportati l'immagine CLSM e lo spettro di emissione di fluorescenza spazialmente risolto corrispondente ai domini morfologici evidenziati nell'immagine a sinistra. A primo impatto, l'immagine CLSM evidenzia la differenza nel numero di aggregati fibrillari rispetto agli altri sali; la cinetica di aggregazione proteica in presenza di questo sale, soprattutto a concentrazione 0.5 M, risulta essere di gran lunga la più lenta e quindi per quanto le fibrille osservate al Microscopio Confocale siano mature risultano comunque essere in quantità molto bassa.

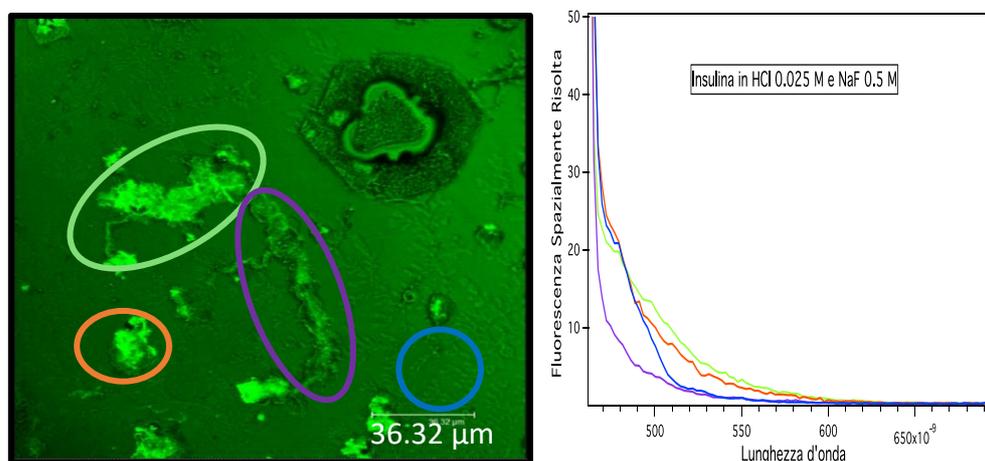


Fig. 4.23 Immagine CLSM e spettro spazialmente risolto delle fibrille amiloidi, marcate con Tioflavina T, di Insulina in HCl 0.025 M e NaF 0.5 M. Il colore degli spettri corrisponde al colore alle zone circondate nell'immagine di sinistra. In alto a destra dell'immagine CLSM, l'aggregato di forma simil triangolare rappresenta un cristallo del sale.

Nello spettro di emissione di fluorescenza spazialmente risolta il contributo maggior si osserva infatti a 480 nm, specifico di ThT in β -sheet, mentre non si osservano segnali apprezzabili a 520 nm.

È importante sottolineare la difficoltà incontrata nel registrare immagini CLSM nel caso del campione contenente NaF 0.5 M, questo problema con molta probabilità è dovuto alla grande quantità di ThT, intercalata nelle fibrille proteiche, che dà origine ad un fenomeno di *self-quenching* con conseguente spegnimento dell'intensità di fluorescenza (immagini CLSM molto scure). Un'altra conseguenza del fenomeno di *self-quenching* è la bassa intensità di emissione di fluorescenza spazialmente risolta che si osserva nello spettro riportato in Figura 4.23. I risultati CLSM confermano quindi quanto osservato da misure di Dicroismo Circolare che indicavano un'alta percentuale (80%) di strutture β -sheet nel campione.

Capitolo 5: Conclusioni

Gli studi condotti in questo lavoro di tesi ci hanno permesso di valutare l'effetto di diversi anioni, a parità di contro-ione e a diverse concentrazioni, sulla cinetica di fibrillazione di una proteina amiloidogena modello: Insulina.

La cinetica del processo di aggregazione proteica è stata studiata attraverso misure spettroscopiche di emissione di fluorescenza, utilizzando la Tioflavina T (ThT) come *probe* fluorescente, che ci hanno permesso di analizzare il profilo temporale della formazione degli aggregati e di valutarlo in funzione dell'anione.

Sui campioni contenenti aggregati fibrillari maturi, misure di Dicroismo Circolare ci hanno permesso di comprendere la struttura secondaria di tali aggregati e, in particolare, la percentuale presente in soluzione di elementi strutturali β -sheets che è risultata essere influenzata dalla presenza dei sali e crescente nella serie SCN⁻, Br⁻, Cl⁻ e F⁻.

Esperimenti di *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) abbinati alla spettroscopia di emissione di fluorescenza spazialmente risolta hanno reso possibile la comprensione della morfologia degli aggregati maturi. Anche in questo caso le diverse interazioni tra gli anioni e gli oligomeri dell'insulina hanno portato alla formazione di aggregati diversi in forma e dimensioni; in particolare in presenza di NaI è stata notata la presenza di aggregati contenenti strutture diverse dal *cross β -sheet* caratterizzate da impronte foto-fisiche a 520 nm.

Anche la concentrazione dei sali influisce su tutte queste caratteristiche, in particolare a concentrazioni e forza ioniche maggiori (0.5 M) gli effetti si valorizzano maggiormente.

I risultati ottenuti hanno confermato che la velocità del processo di aggregazione, la struttura secondaria e la morfologia degli aggregati proteici maturi sono fortemente influenzati dall'effetto dello ione specifico.

Capitolo 6: Bibliografia

1. Soto. "Unfolding The Role Of Protein Misfolding In Neurodegenerative Disease". (2003): 49-60- *Neuroscience*. Web.
2. Eisenberg, David, and Mathias Jucker. "The Amyloid State of Proteins in Human Diseases." *Cell* 148.6 (2012): 1188–1203. *PubMed Central*. Web.
3. Dobson and C. M. "Protein misfolding, evolution and disease". *Trends Biochem. Sci.* 24, 329–332 (1999).
4. Biancalana, Matthew, and Shohei Koide. "Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804.7 (2010): 1405–1412. *ScienceDirect*. Web.
5. Surmacz-Chwedoruk, Weronika et al. "Cross-Seeding of Fibrils from Two Types of Insulin Induces New Amyloid Strains." *Biochemistry* 51.47 (2012): 9460–9469. *ACS Publications*. Web.
6. Chiti, F. & Dobson, C. M. "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease". *Annu Rev Biochem* 75, 333–366 (2006).
7. Pedersen, P. L. "Defective protein folding as a basis of human disease". *Trends Biochem Sci* 20, 456–9 (1995)
8. Saiki, M. *et al.* "Higher-order Molecular Packing in Amyloid-like Fibrils Constructed with Linear Arrangements of Hydrophobic and Hydrogen-bonding Side-chains". *J. Mol. Biol.* 348, 983–998 (2005).
9. Hampel, H. *et al.* "Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives". *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 560–574 (2010).
10. Stefani, Massimo, and Christopher M. Dobson. "Protein Aggregation and Aggregate Toxicity: New Insights into Protein Folding, Misfolding Diseases and Biological Evolution." *Journal of Molecular Medicine* 81.11 (2003): 678–699. *link.springer.com*. Web

11. Haass, C. & Selkoe, D. J. "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112 (2007)
12. Kutsch, Miriam et al. "Dissecting Ion-Specific from Electrostatic Salt Effects on Amyloid Fibrillation: A Case Study of Insulin." *Biointerphases* 11.1 (2016): 19008. *PubMed*. Web.
13. Nielsen, Liza et al. "Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism." *Biochemistry* 40.20 (2001): 6036–6046. *ACS Publications*. Web.
14. Sunde, M. et al. "Common Core Structure of Amyloid Fibrils by Synchrotron X-ray Diffraction". *J Mol Biol* 273, 729–739 (1997).
15. Meinhardt, J., Sachse, C., Hortschansky, P., Grigorieff, N. & Fändrich, M. "A β (1-40) Fibril Polymorphism Implies Diverse Interaction Patterns in Amyloid Fibrils". *J. Mol. Biol.* 386, 869–877 (2009).
16. Serpell, L. C. et al. "The protofilament substructure of amyloid fibrils". *J. Mol. Biol.* 300, 1033–1039 (2000).
17. Bauer, H. H., Aebi, U., Haner, M., Hermann, R. & Muller, M. Architecture and "Polymorphism of Fibrillar Supramolecular Assemblies Produced by in vitro Aggregation of Human Calcitonin". *J Struct Biol* 115, 1–15 (1995).
18. Saiki, M. et al. "Higher-order Molecular Packing in Amyloid-like Fibrils Constructed with Linear Arrangements of Hydrophobic and Hydrogen-bonding Side-chains". *J. Mol. Biol.* 348, 983–998 (2005).
19. Pedersen, J. S. et al. "The Changing Face of Glucagon Fibrillation: Structural Polymorphism and Conformational Imprinting". *J. Mol. Biol.* 355, 501–523 (2006).
20. Debelouchina, G. T. et al. "Higher Order Amyloid Fibril Structure by MAS NMR and DNP Spectroscopy". *J. Am. Chem. Soc.* 135, 19237–19247 (2013).
21. Marek, Peter J. et al. "Ionic Strength Effects on Amyloid Formation by Amylin Are a Complicated Interplay among Debye Screening, Ion Selectivity, and Hofmeister Effects." *Biochemistry* 51.43 (2012): 8478–8490. *ACS Publications*. Web.
22. Muzaffar, Mahvish, and Atta Ahmad. "The Mechanism of Enhanced Insulin Amyloid Fibril Formation by NaCl Is Better Explained by a Conformational

- Change Model." *PLOS ONE* 6.11 (2011): n. pag. *PubMed Central*. Web. 22 Mar. 2017.
23. Yeh, Victor et al. "The Hofmeister Effect on Amyloid Formation Using Yeast Prion Protein." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 19.1 (2010): 47–56. *PubMed Central*. Web.
24. Lo Nostro Pierandrea and Barry W. Ninham. "Hofmeister Phenomena: An Update on Ion Specificity in Biology." *Chemical Reviews* 112.4 (2012): 2286–2322. *ACS Publications*. Web.
25. J. Goldman, and Carpenter Fh. "Zinc Binding, Circular Dichroism, and Equilibrium Sedimentation Studies on Insulin (Bovine) and Several of Its Derivatives." *Biochemistry* 13.22 (1974): 4566–4574. *europemc.org*. Web.
26. Mauri, Sergio et al. "Stabilization of Insulin by Adsorption on a Hydrophobic Silane Self-Assembled Monolayer." *Langmuir* 31.32 (2015): 8892–8900. *ACS Publications*. Web.
27. Frare E., De Laureto P., Zurdo J., Dobson C. & Fontana M., "A highly amyloidogenic region of hen lysozyme". *J. Mol. Biol.* 340, 1153–1165 (2004).
28. Groenning, M. "Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status". *J. Chem. Biol.* 3, 1–18 (2010).
29. Kutsch, Miriam et al. "Dissecting Ion-Specific from Electrostatic Salt Effects on Amyloid Fibrillation: A Case Study of Insulin." *Biointerphases* 11.1 (2016): 19008. *PubMed*. Web.
30. Biancalana, Matthew et al. "Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to the Surface of β -Rich Peptide Self-Assemblies." *Journal of molecular biology* 385.4 (2009): 1052–1063. *PubMed Central*. Web.
31. Theory of Confocal Microscopy. *Leica Tutor*. 1-232
32. Sharma, A. & Schulman and S. G. "Introduction to Fluorescence Spectroscopy". *Wiley Intersci.* (1999).
33. Correia, Manuel et al. "UV-Light Exposure of Insulin: Pharmaceutical Implications upon Covalent Insulin Dityrosine Dimerization and Disulphide Bond Photolysis." *PLOS ONE* 7.12 (2012): e50733. *Plos Journals*. Web.
34. Surmacz-Chwedoruk, Weronika, Viktoria Babenko, and Wojciech Dzwolak. "Master and Slave Relationship Between Two Types of Self-Propagating

- Insulin Amyloid Fibrils." *The Journal of Physical Chemistry B* 118.47 (2014): 13582–13589. *ACS Publications*. Web.
35. Buck, R. P., Samang. Singhadeja, and L. B. Rogers. "Ultraviolet Absorption Spectra of Some Inorganic Ions in Aqueous Solutions." *Analytical Chemistry* 26.7 (1954): 1240–1242. *ACS Publications*. Web.
36. Bekard, Innocent B., and Dave E. Dunstan. "Tyrosine Autofluorescence as a Measure of Bovine Insulin Fibrillation." *Biophysical Journal* 97.9 (2009): 2521–2531. *PubMed Central*. Web.
37. Bulheller, Benjamin M., and Jonathan D. Hirst. "DichroCalc--Circular and Linear Dichroism Online." *Bioinformatics (Oxford, England)* 25.4 (2009): 539–540. *PubMed*. Web.
38. Sabaté, Raimon, and Sven J. Saupe. "Thioflavin T Fluorescence Anisotropy: An Alternative Technique for the Study of Amyloid Aggregation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360.1 (2007): 135–138. *PubMed*. Web.