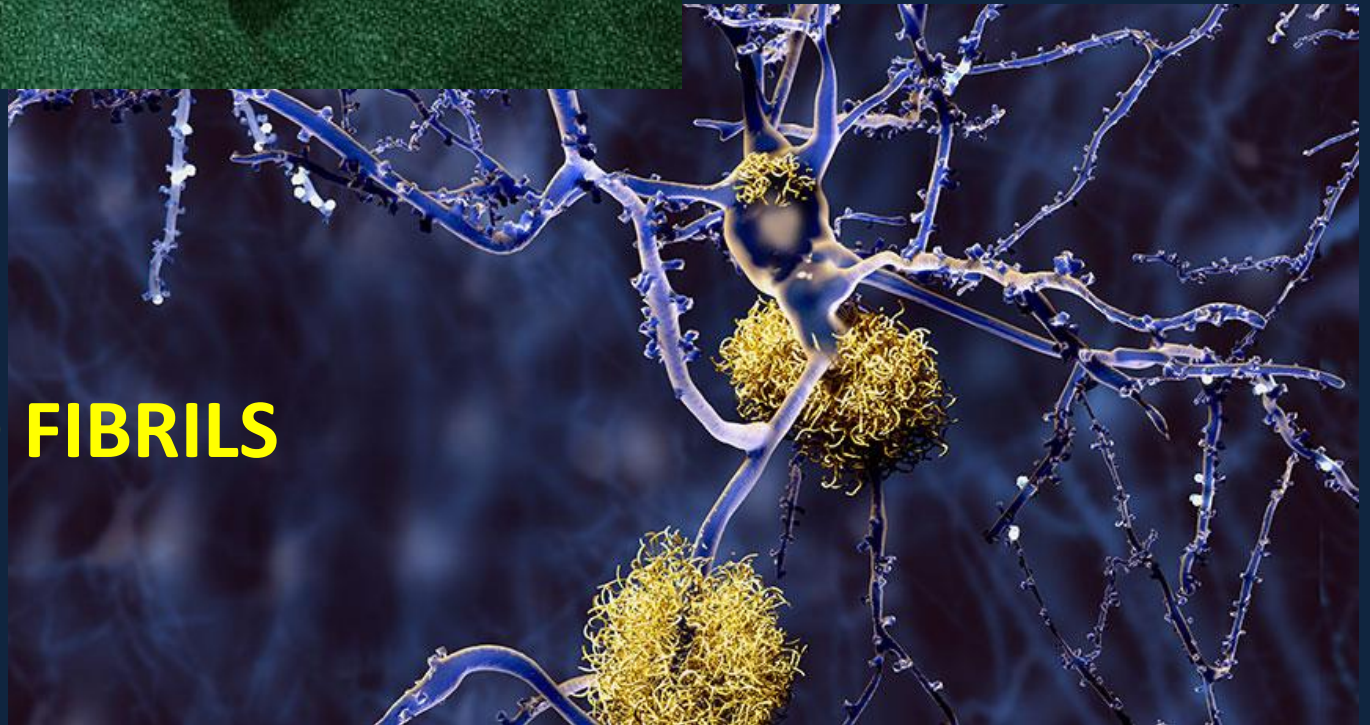


PROTEIN MISFOLDING



AMYLOID FIBRILS

x

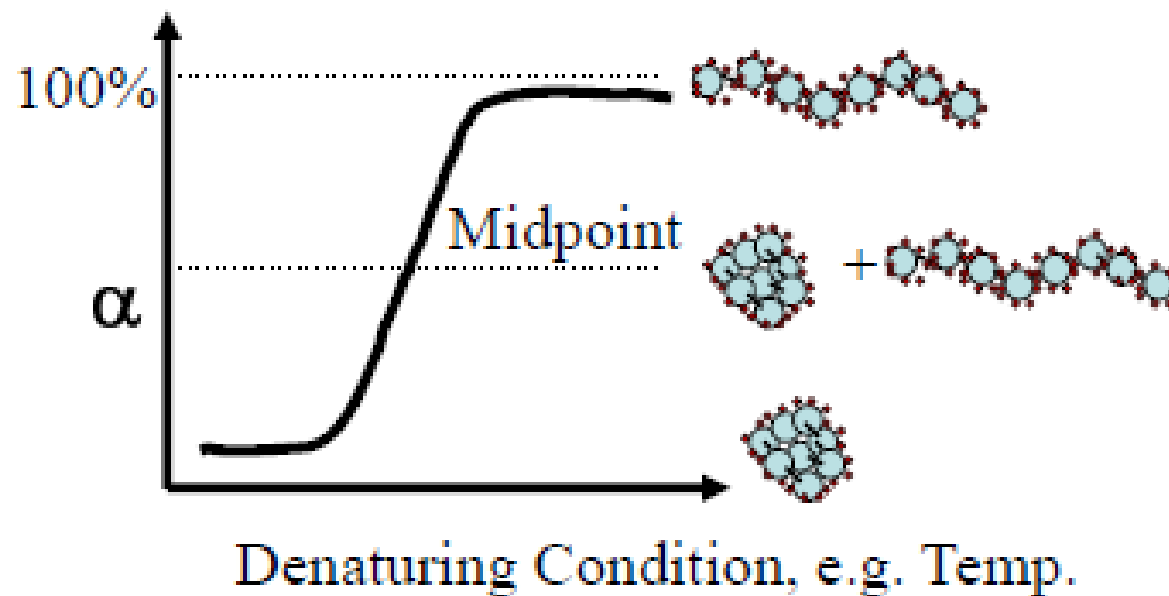
Folding e Misfolding delle proteine

- **Folding** : è il processo di ripiegamento molecolare attraverso il quale le proteine ottengono la loro struttura tridimensionale.
- **Misfolding**: indica l'errato ripiegamento delle proteine, che è alla base di molte patologie umane, definite malattie da *misfolding*.

DENATURAZIONE DELLE PROTEINE

Le proteine possono essere denaturate cambiando le proprietà chimiche o fisiche dell'ambiente circostante.

La denaturazione reversibile delle proteine consente l'analisi termodinamica.



Techniques for Measuring Stability

Any methods that can distinguish between U and F

- Absorbance (e.g. Trp, Tyr)
- Fluorescence (Trp).
- CD (far or near UV)
- NMR
- DSC (differential scanning calorimetry)
- Urea gradient gels - difference in the migrating rates between F and U.


Le chaperonine

Le proteine, per svolgere la propria funzione,
devono avere una
CONFORMAZIONE CORRETTA



MA...

Nell'ambiente cellulare esistono condizioni
che possono ostacolare il ripiegamento o che causano
la perdita della struttura proteica



Fattori che possono “disturbare”
il processo di ripiegamento di una
proteina nascente

Sintesi NON contemporanea di tutti i domini
della proteina

Presenza di grandi quantità di macromolecole

Esposizione di regioni idrofobiche o che si ripiegano lentamente

Instabilità delle proteine nell'ambiente cellulare

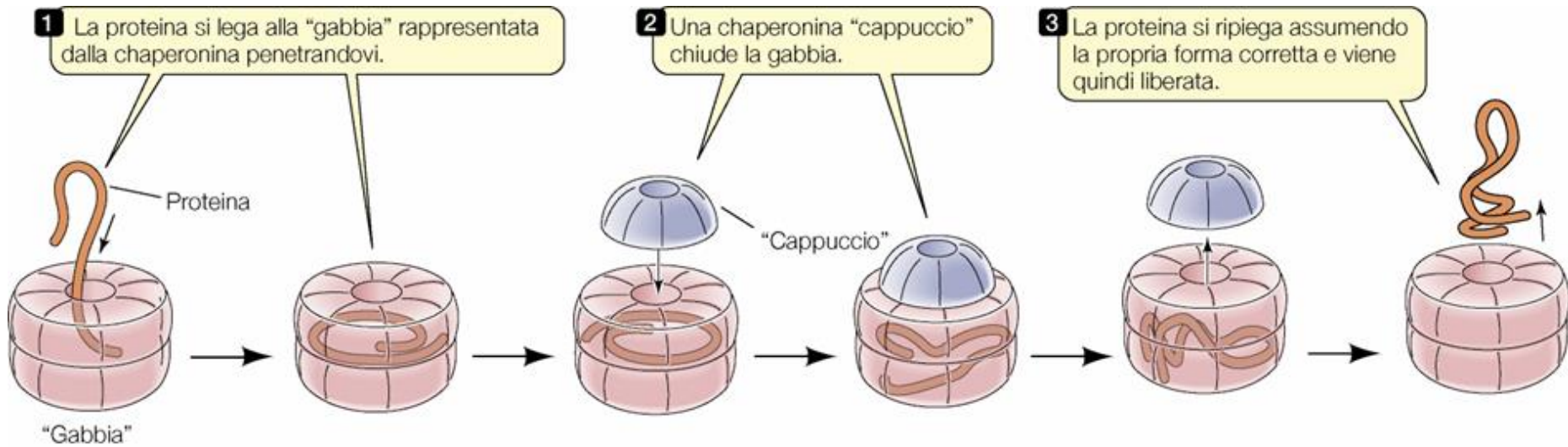
Denaturazioni e modificazioni
(ossidazioni, glicosilazioni...) spontanee

Esposizione ad agenti tossici ambientali:
radicali dell'O₂, metalli pesanti, alcuni antibiotici...

Presenza di mutazioni che causano
l'assunzione di conformazioni anomale

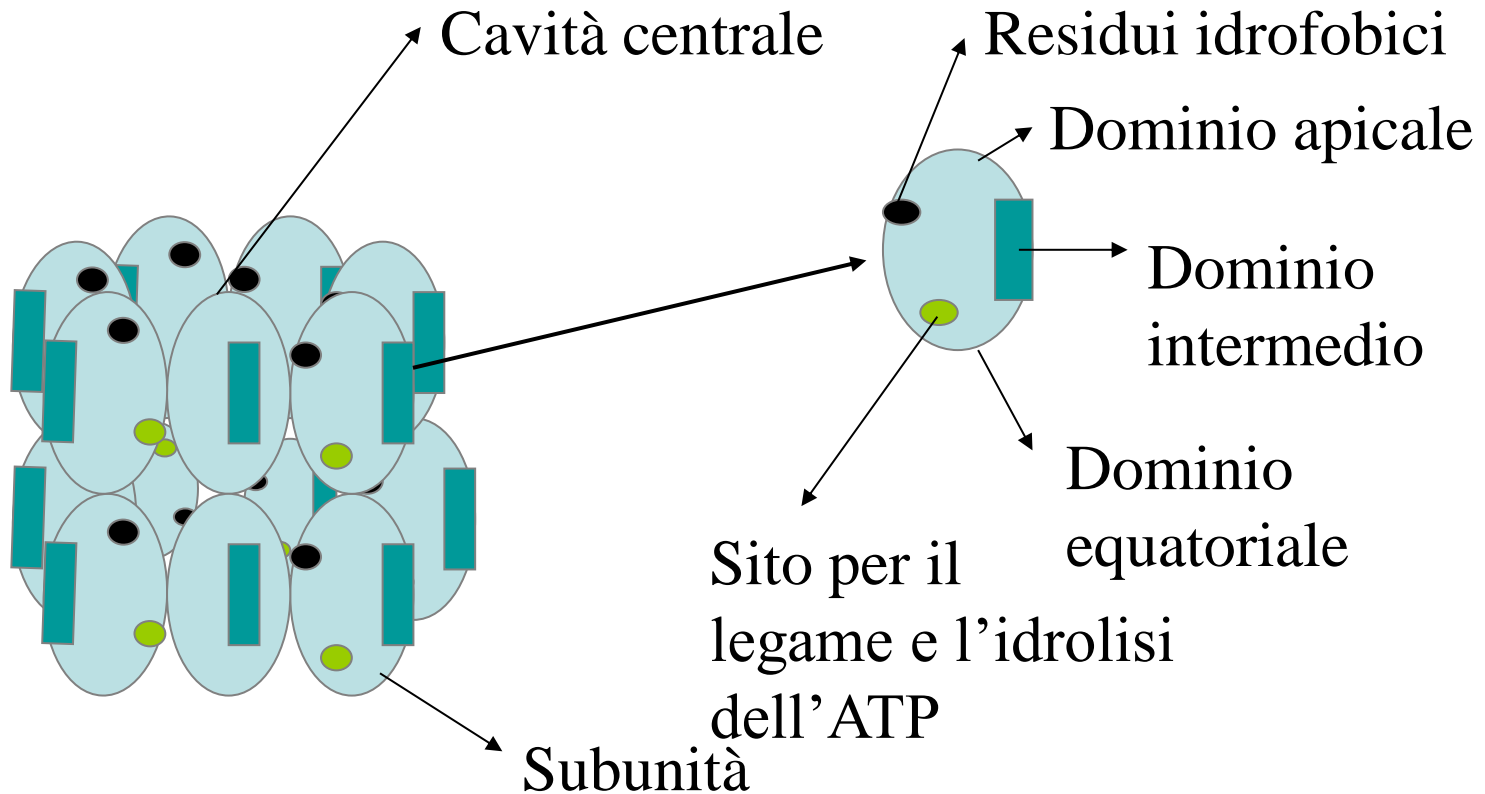
Le cellule possiedono
meccanismi per prevenire
l'aggregazione proteica e per
ripristinare le giuste
conformazioni ⇒
le proteine "chaperone"

Le chaperonine possono assistere il ripiegamento delle proteine



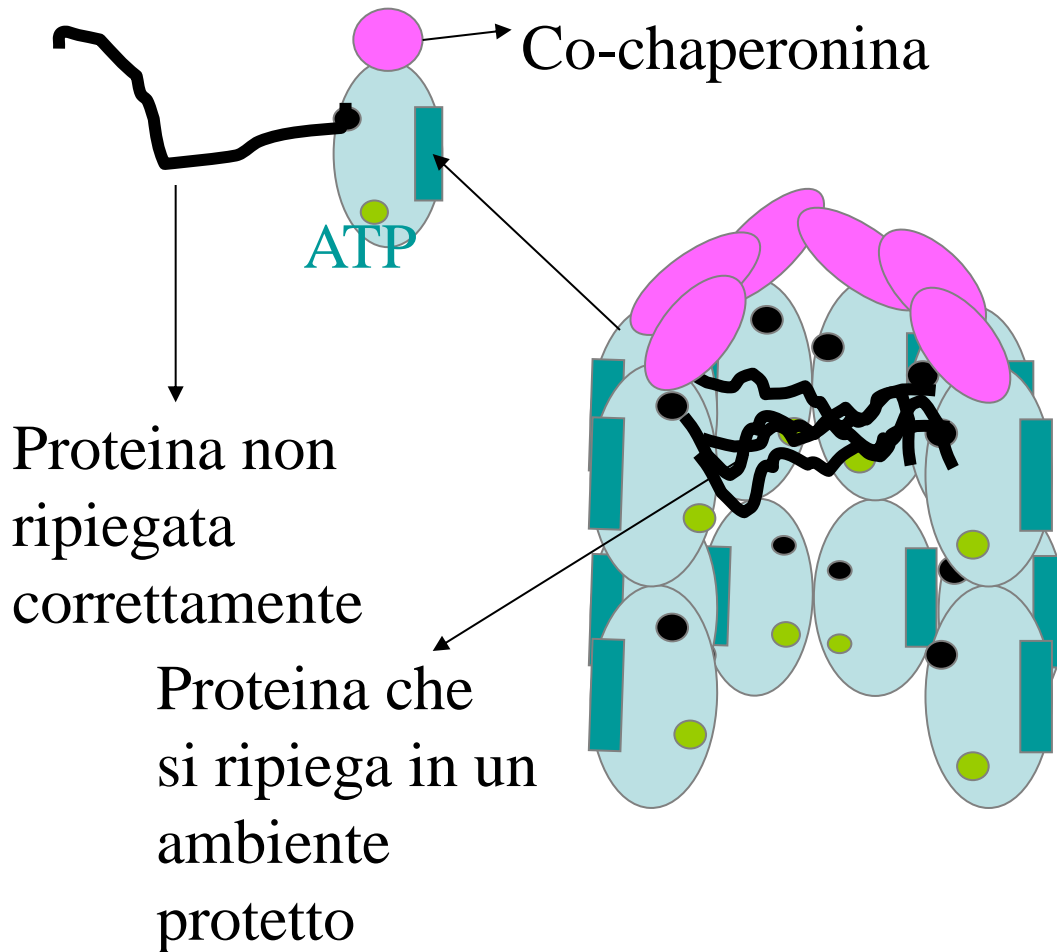
Chaperonine di gruppo I: struttura

- Richiedono la presenza di una co-chaperonina



Chaperonine di gruppo I: meccanismo d'azione

- Legame ai substrati aspecifico



x

Malattie neurodegenerative
caratterizzate da "protein
misfolding"

Protein misfolding = alterato ripiegamento



Modificazione della struttura secondaria
della proteina, che ne facilita
l'aggregazione.

Il genoma umano contiene l'informazione per codificare circa 35 000 proteine diverse, che sono espresse e funzionanti nelle diverse cellule dell'organismo in modo differenziato.

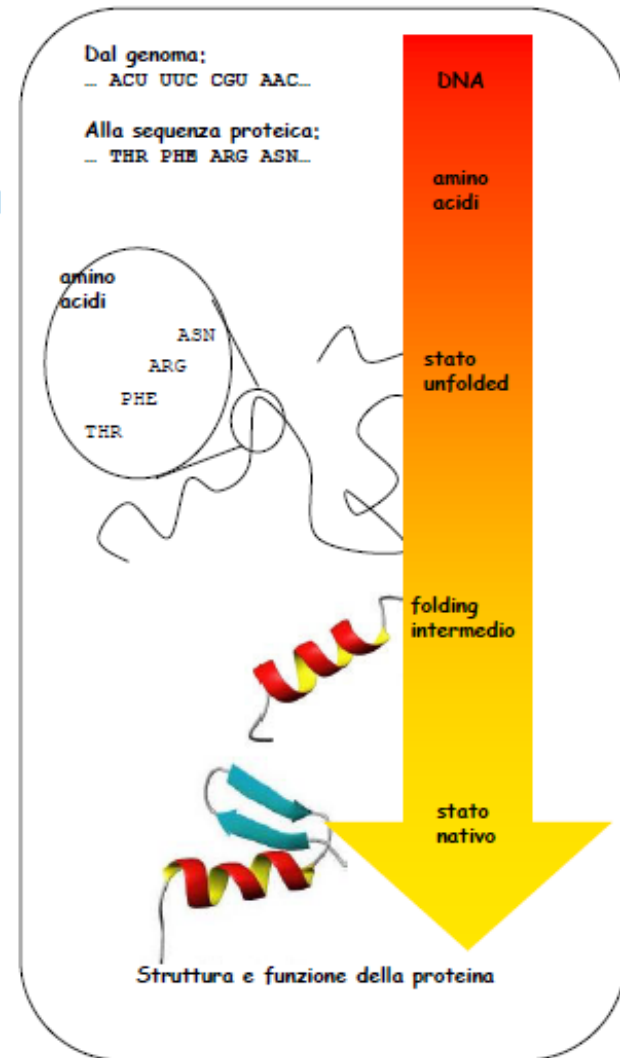
Tutte le funzioni vitali dipendono dalle proteine e, come noto, l'alterazione della struttura di una proteina porta ad una alterazione o perdita della funzione specifica, come avviene nelle malattie genetiche

Le proteine acquistano spontaneamente la loro struttura tridimensionale, cui è legata in modo indissolubile la funzione biologica.

Questo processo di "strutturazione" delle proteine (detto *foldig*) è codificato nella particolare sequenza aminoacidica di ogni proteina

Protein folding is the process by which a protein structure assumes its functional shape or conformation

L'alterazione del *foldig* di una proteina, infatti, può provocare delle malattie di tipo degenerativo



- Sebbene la sequenza degli amminoacidi determini la struttura tridimensionale della proteina sono necessari fattori proteici che agevolino il “folding”.
- Il continuo monitoraggio del corretto ripiegamento viene effettuato dalle “chaperon”.

I prodotti mal ripiegati vengono demoliti da un sistema complesso, ATP-dipendente, detto:

PROTEASOMA-UBIQUITINA

- La mancata eliminazione delle proteine genera l’accumulo di fibrille amiloidi (strutture che sono la causa di patologie che prendono il nome di amiloidosi)

CHAPERONI

- a) Assistono ed assicurano il raggiungimento e il mantenimento del corretto stato conformazionale delle catene polipeptidiche appena sintetizzate
- b) dirigono l'assemblaggio di complessi multienzimatici
- c) partecipano al mantenimento o alla creazione di uno stato di parziale denaturazione delle proteine, favorendone così il trasporto attraverso le membrane dei mitocondri o dei plastidi
- d) stabilizzano le proteine danneggiate formatesi a seguito di stress chimici o fisici facilitandone la rinaturazione e/o la degradazione.

Negli ultimi decenni sono state descritte nuove categorie di malattie derivanti dal ripiegamento o **folding anomalo (misfolding)** di proteine.

In particolare, è stata riconosciuta una comune origine legata al processo di folding per un gruppo di patologie dette **amiloidosi**.

In queste ultime, il folding degenero o misfolding è alla base della formazione di aggregati di natura fibrosa che mostrano la cosiddetta struttura **cross- β** , un modo di ripiegamento generico della catena polipeptidica particolarmente stabile, accessibile in precise condizioni sia *in vitro* che *in vivo*, nonostante le diversità di sequenza e di corrispondente folding nativo.

MISFOLDING:

Malattie conformazionali

proteine parzialmente denaturate \Rightarrow rinaturate da chaperoni

\Rightarrow degradate

\Rightarrow aggregate in fibre insolubili (“amiloidi”)

almeno 20 malattie umane associate a depositi extracellulari in specifici tessuti di proteine (normalmente solubili) che formano fibrille amiloidi

- Proteina β amiloide (Alzheimer)
- Lisozima (amiloidosi viscerale familiare)
- β 2-microglobulina (artropatia da emodialisi)
- Fibrinogeno (amiloidosi renale ereditaria)
- Proteina prionica (malattie da prioni, encefalopatie)

amiloidosi spesso associata a proteine mutanti

fibre amiloidi simili anche se formate da proteine molto diverse nello stato nativo

Malattie da misfolding proteico

| PROTEINA | MALATTIA | PATOGENESI | MECCANISMO |
|-------------------------|-------------------------------|--------------|---|
| Emoglobina | Anemia falciforme | Aggregazione | L'emoglobina non correttamente ripiegata perde la sua funzionalità e la sua elasticità, causando seri danni alla circolazione sanguigna. |
| CFTR | Fibrosi cistica | Trasporto | Forme mutanti di CFTR non si dissociano dagli chaperoni e non raggiungono la membrana. |
| Huntingtina | M. di Huntington | Aggregazione | La ripetizione di p-glu più lunga porta alla formazione di aggregati cellulari insolubili. |
| Proteina b-amiloide | M. di Alzheimer | Aggregazione | Il peptide beta-amiloide non correttamente ripiegato si accumula nel tessuto nervoso umano, formando dei depositi noti come placche neuritiche. |
| Proteina prionica (PrP) | M. di Creutzfeld-Jakob | Aggregazione | Effetto a cascata in cui sempre più proteina viene convertita nella forma che determina la malattia. |
| α -Synucleina | M. di Parkinson | Aggregazione | La proteina con avvolgimenti sbagliati si aggrega in masse sferiche (corpi di Lewy) |
| P53 | Tumori | Trasporto | P53 impedisce la divisione cellulare. Mutazioni di p53 portano ad un non corretto ripiegamento; le proteine p53 instabili sono |

In particolare, due esempi di malattie neurodegenerative rilevanti, dato l'alto impatto sociale ed economico, sono dovuti :

- alla famiglia delle proteine prioniche (PrP)
- e all'amiloide ($A\beta$) presente nelle placche dell'Alzheimer

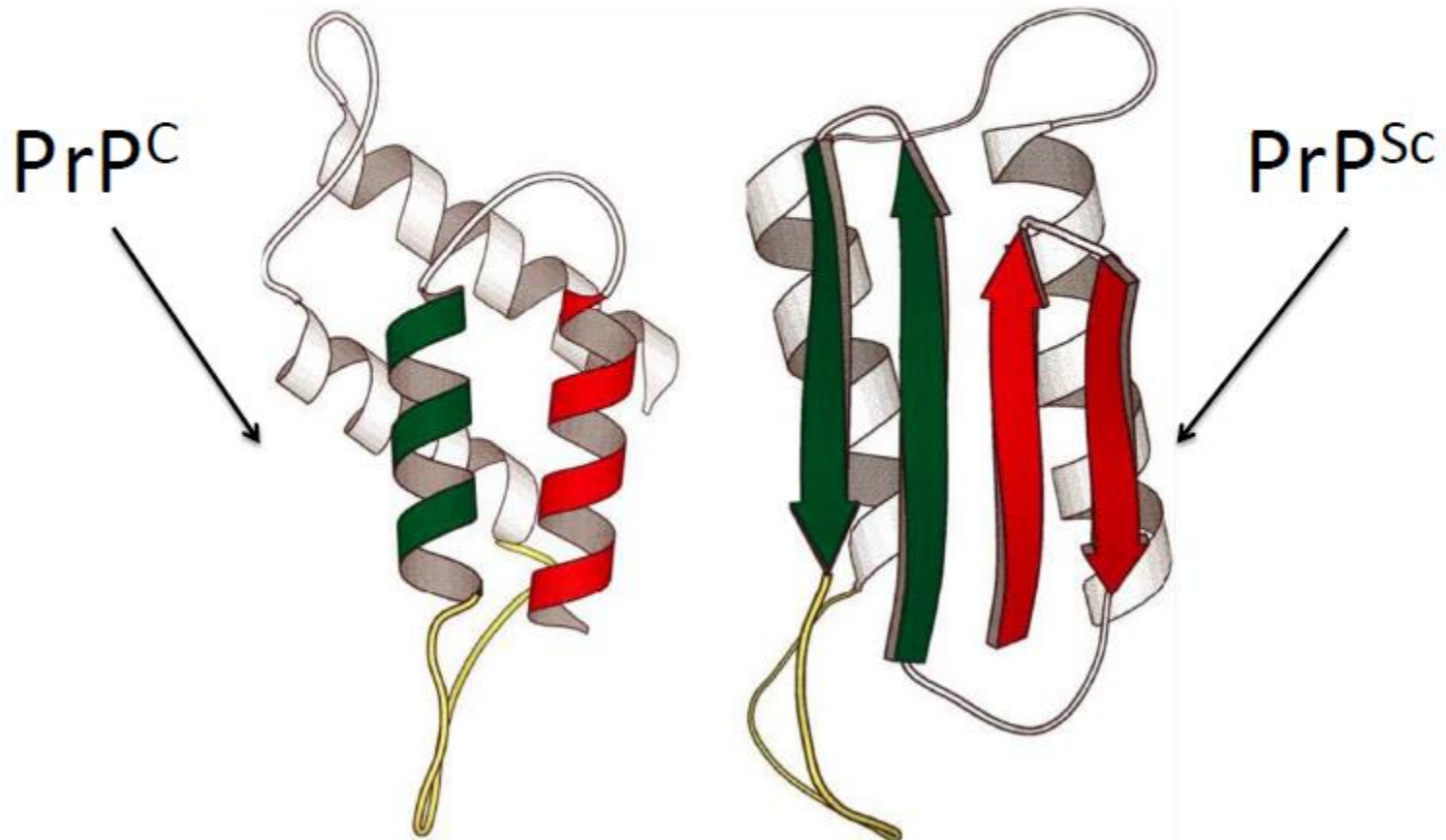
A livello molecolare, la eziologia delle due malattie, l'Alzheimer e la malattia da prioni, presentano notevoli analogie.

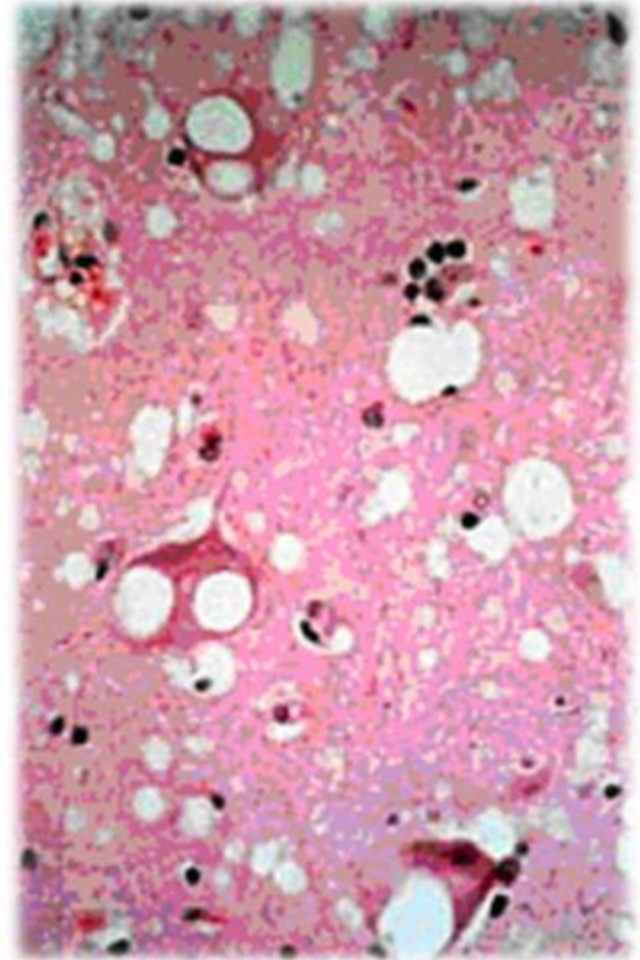
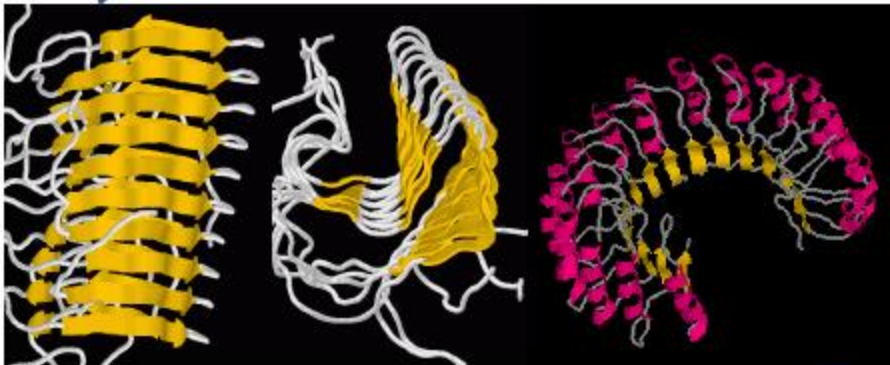
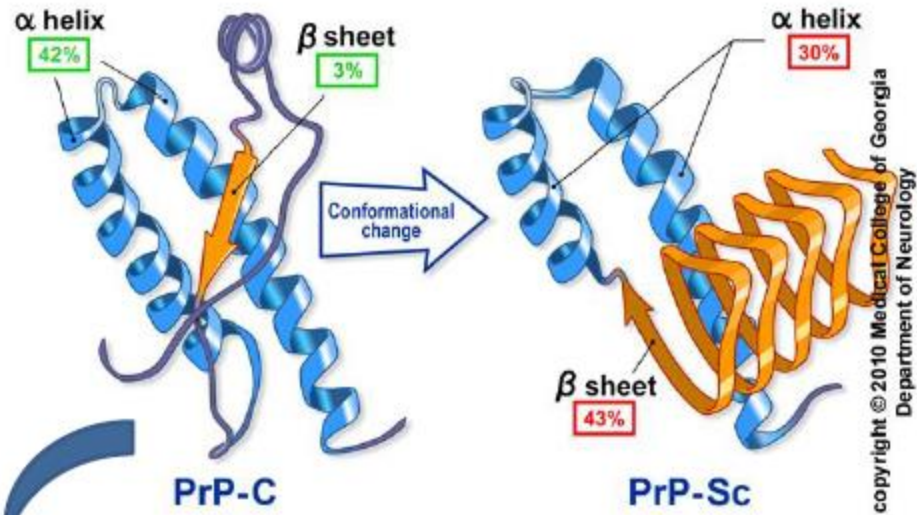
In entrambi i casi sembra evidente una relazione tra la formazione di aggregati (fibrille amiloidi) e la patogenesi della malattia e inoltre la formazione degli aggregati è preceduta dal "misfolding" della proteina

Misfolding prionico

«Prion diseases are transmissible, progressive and invariably fatal neurodegenerative conditions associated with misfolding and aggregation of a host-encoded cellular prion protein, PrP^C»

An overview of human prion diseases, Imran and Mahmood, Virology Journal 2011, 8:559



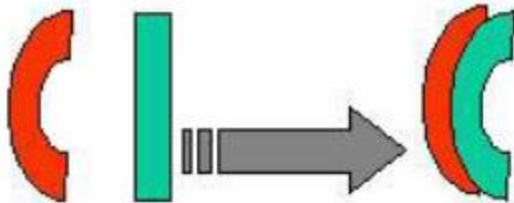


«Proteine infettive»: il contagio conformazionale

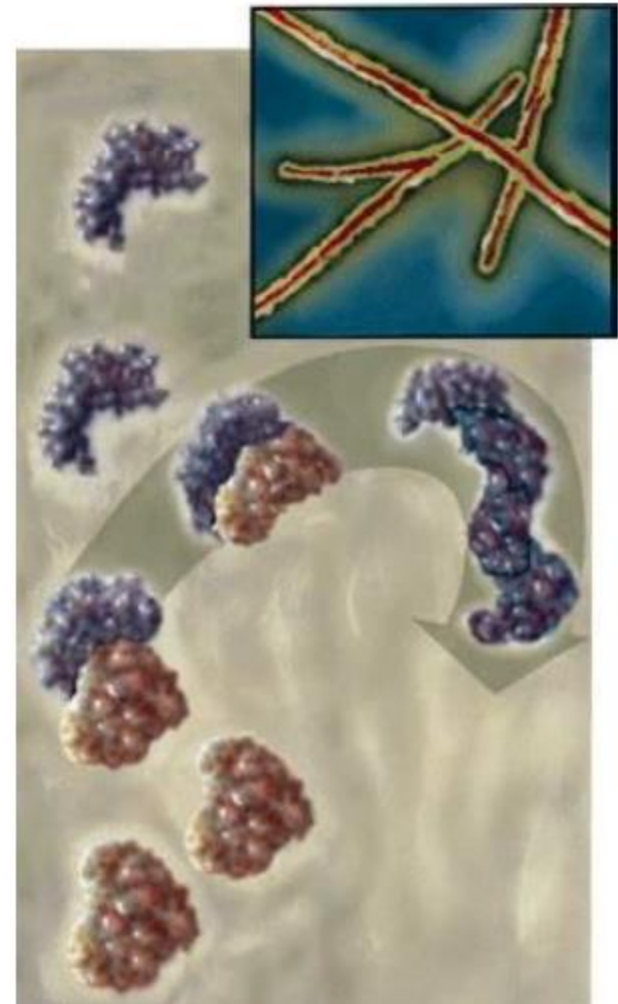
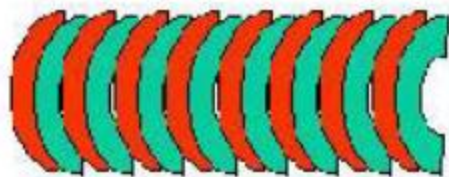
forma del prione forma della proteina normale

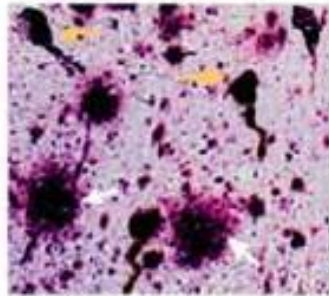


Quando il prione entra in contatto con la proteina normale, questa assume la stessa forma del prione:

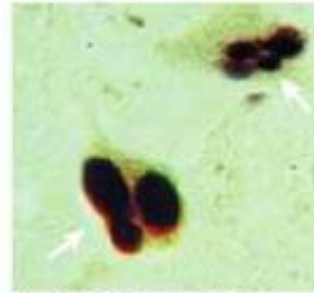


Nelle cellule infette da prioni si innesca un processo a catena che provoca gravi lesioni:

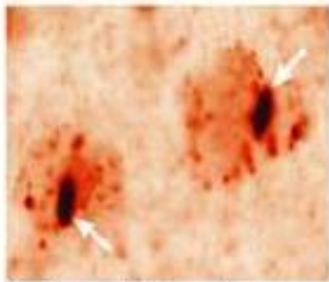




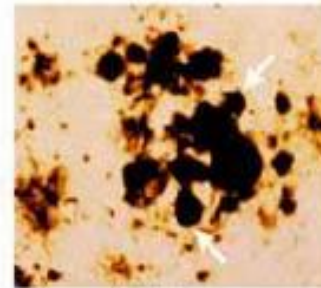
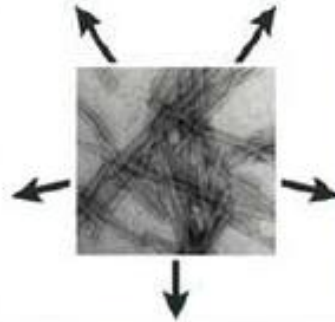
Alzheimer's plaques and tangles



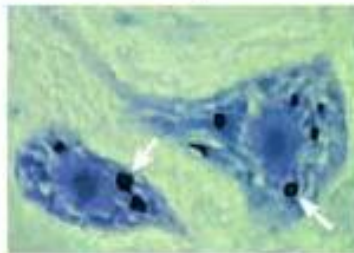
Parkinson's Lewy bodies



Huntington's intranuclear inclusions



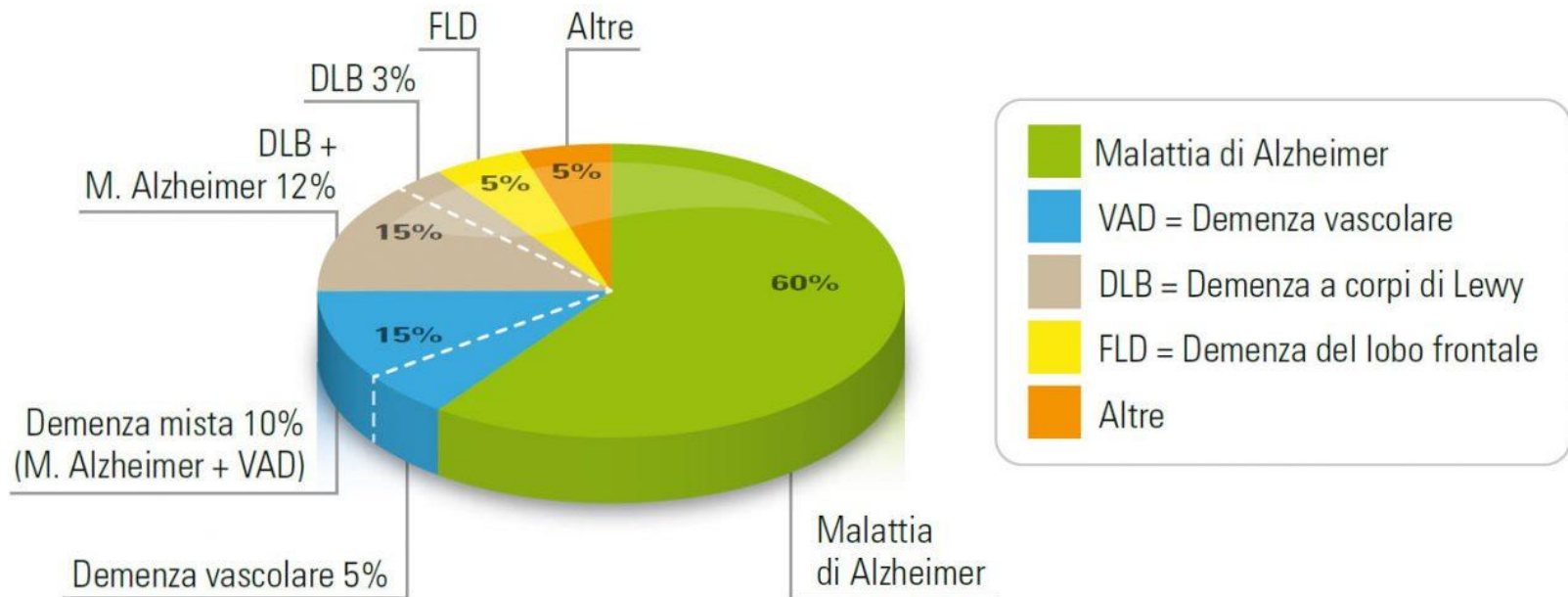
Prion amyloid plaques



Amyotrophic lateral sclerosis aggregates

I depositi di fibrille dovuti a varie proteine sono presenti in più di 20 disordini degenerativi tra cui la malattia di Alzheimer, l'encefalite spongiforme (malattia da prione), il Parkinson e numerose forme fatali di amiloidosi, collettivamente indicate come “**protein misfolding diseases**”.

PREVALENZA DELLE VARIE FORME DI DEMENZA

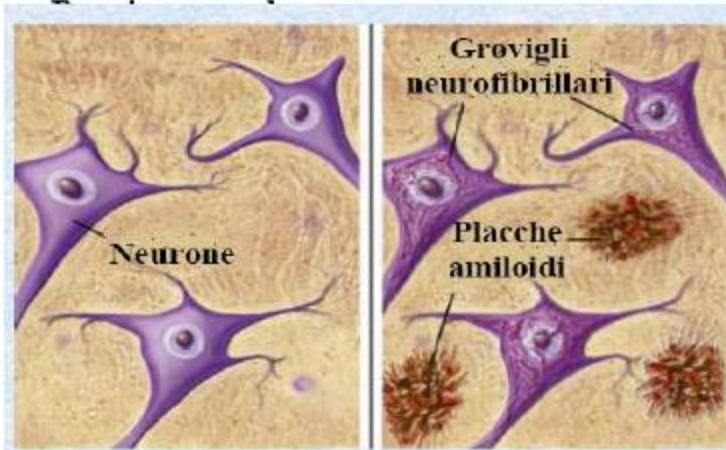


Amiloidosi trasmissibili

MALATTIE
NEURODEGENERATIVE



- Morbo di Parkinson
- Morbo di Alzheimer
- Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE)
 - ✓ CJD
 - ✓ nvCJD



Agente infettivo:

PROTEINA

X

Cos'è il Prione?

Il termine **Prione** è stato coniato nel 1982 da **Stanley Prusiner**, per denominare una particella infettiva con caratteristiche inedite, in particolare la resistenza ai raggi U.V., la mancanza di acidi nucleici e la composizione esclusivamente proteica

(pr per proteina, i per infettiva e one per particella).

Si tratta di una **glicoproteina**

(quindi non acido nucleico e resistente quindi all'azione degli enzimi che distruggono l'RNA ed il DNA.

L'alterazione dei Prioni genera l'ampio raggio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili, **TSE**, quelle che giornalmente vengono definite i 'virus della mucca pazza'



STORIA della scoperta

Nel 1939 venne scoperto che la Scrapie

(prototipo di un gruppo di malattie che influenzano sia l'uomo che gli animali, chiamate TSEs o encefalopatie spongiformi trasmissibili come la Kuru, la Creutzfeld-Jacob (CJD)etc) era trasmissibile agli animali da esperimento e che

l'agente infettante aveva:

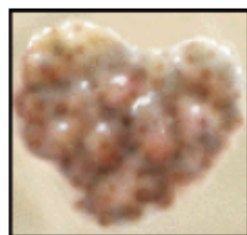
1. un lungo periodo di incubazione
2. era resistente ai metodi convenzionali di sterilizzazione come (altaT,uV, formaldeide)

nel 1968 Tikva Alper ipotizzò per la prima volta che l'agente infettante non avendo acido nucleico poteva essere una proteina

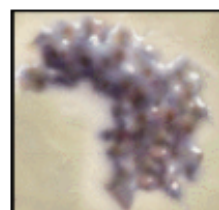
J.S:Griffith formulò l'ipotesi che questa proteina che funzionava come agente infettante era in realtà una forma modificata di una proteina normale che c'è nelle cellule

nel 1982 Prusiner (premio Nobel per la Fisiologia nel 97) purificò l'agente infettante della Scrapie e lo chiamò Prione per distinguerlo dai comuni batteri e virus; inoltre sembrava essere (anche se non inequivocabilmente) proprio una proteina e clonando il gene scoprì che c'erano due forme di PrP

X



PrP



una normale **PrPc**

e una modificata **PrPsc**

(presente solo negli organismi infettati dalla Scrapie)

Questa PrPsc venne trovata poi anche nelle TSE umane supportando così sperimentalmente l'ipotesi della sola proteina come agente infettante

■ **Nel 1989** in Gran Bretagna si sviluppò una nuova TSE o prion disease chiamata **BSE** (encefalopatia spongiforme bovina) causata dal cibo assunto dai bovini che proveniva da pecore contaminate con la Scrapie o frattaglie di bestiame contaminato .

I meccanismi che regolano l'alterazione dei Prioni da PrPc a PrPsc non sono ancora completamente noti; purtroppo oggi, il rinvenimento dei Prioni alterati è possibile soltanto all'atto dell'autopsia tramite indagini patologiche e con il metodo di Western-Blot (lo stesso usato nella diagnosi di infezioni HIV).

Contemporaneamente ci fu un aumento di **CJD** in Gran Bretagna e questo portò alla ipotesi di

trasmissibilità tra animale e uomo contagiato dall'assunzione di cibo contaminato

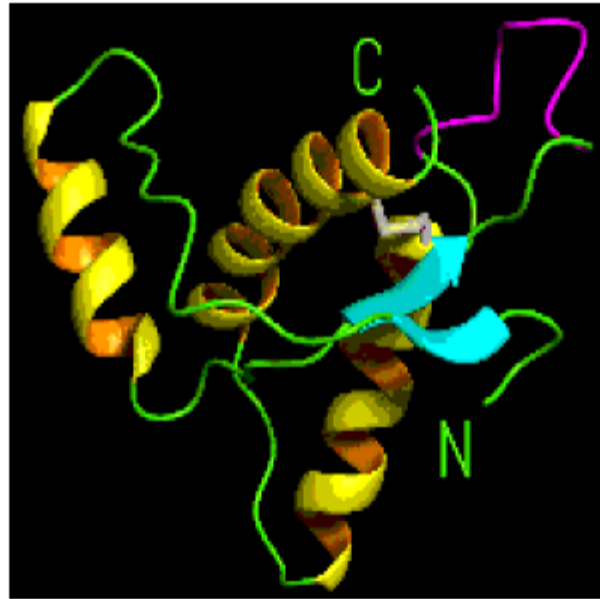
BIOCHIMICA del prione

Il prione è l'agente trasmissibile che causa le TSEs ed è una forma modificata di una normale proteina chiamata PrPc.

La PrPc è una glicoproteina

Dove si trova ?

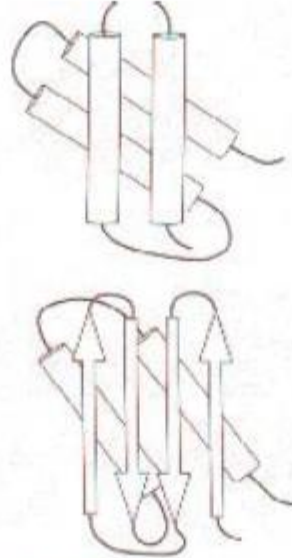
L'isoforma fisiologica della proteina Prionica (PrPC, Prion related Protein) è presente sulla superficie di tutte le cellule nucleate, ma è maggiormente espressa nei neuroni e viene codificata da un gene situato sul braccio corto del cromosoma 20 dell'uomo.



Essa è formata da **una singola catena polipeptidica** che contiene due siti di glicosilazione ed è attaccata alla superficie cellulare dalla parte **C** terminale mediante un glicosil fosfatidilinositolo.

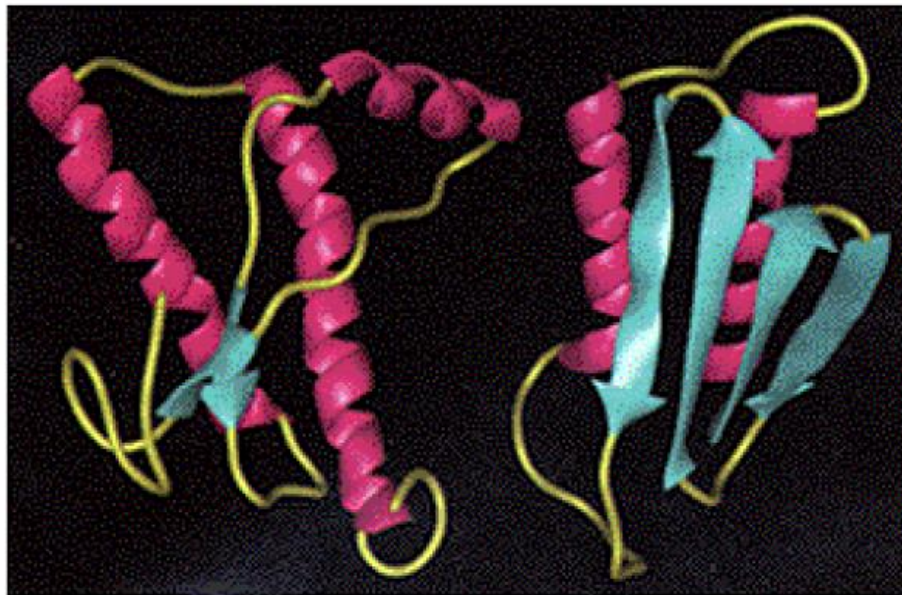
Il peso molecolare è di circa 33-35 kDa (231 Aa) con un ponte disolfuro intracatena

E' sensibile alla proteinase K che la degrada in piccoli frammenti non identificabili nel **SDS Page**



Nella forma benigna, il suo scheletro si ripiega formando diverse eliche (mostrate come spirali nel plausibile modello a nastro a sinistra, e come cilindri nello schema in alto a destra). La PrPc si converte nella forma infettiva (PrPSc) quando gran parte dello scheletro si distende, formando i cosiddetti filamenti beta (rappresentati come frecce nella struttura ipotetica in basso a destra). I siti in rosso nel modello a nastro della PrP normale evidenziano posizioni nelle quali la sostituzione di un amminoacido promuove probabilmente l'avvolgimento nella forma infettiva

Per diventare PrPsc deve effettuare una modifica conformazionale e come altre proteine ancorate alla membrana tramite GPI (glicosilfosfatidilinositolo) rientra nella cellula tramite un compartimento cellulare particolare, un endosoma ricco di colesterolo non acido, e solo tramite questo compartimento la PrPc può o essere trasformata in PrPsc o essere parzialmente degradata.



La propagazione della proteina prionica infettiva avviene tramite la conversione di una proteina prionica normale (PrPc, a sinistra) in una forma che causa la malattia (PrPsc, a destra). Nel processo di ripiegamento, alcune delle regioni della proteina PrPc denominate eliche alfa (le spirali viola) si aprono, formando un'estesa regione detta strato beta (le frecce piatte azzurre).

x

DIFFERENZE TRA PrP^c e PrP^{sc}

PrP^c

Localizzata su
membrana cell.

Strutt. II:
+ a-eliche
- b-foglietti

PrP^{sc}

Localizzata in
citoplasma

Strutt. II:
+ b-foglietti
- a-eliche

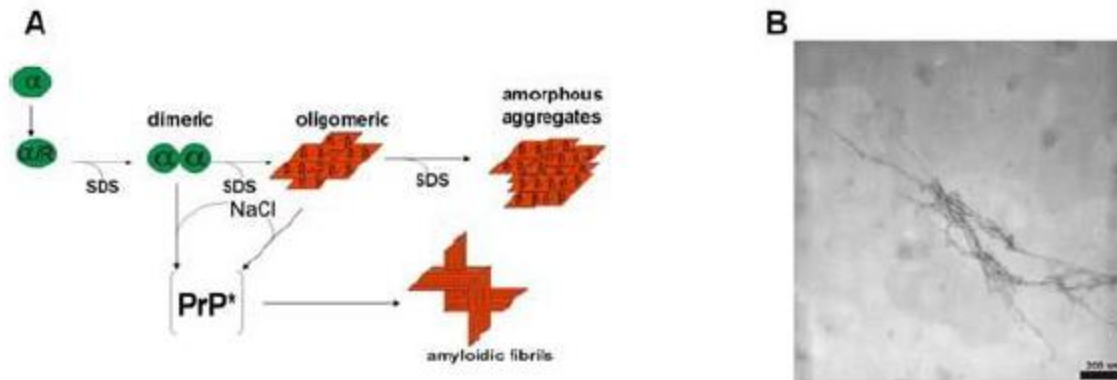
Sensibile



proteasi
calore
sostanze alchilanti
solventi organici



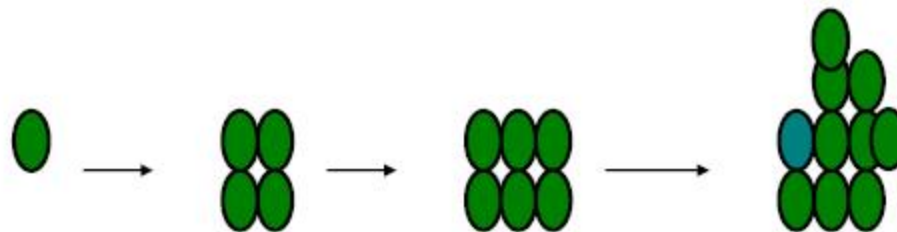
Resistente

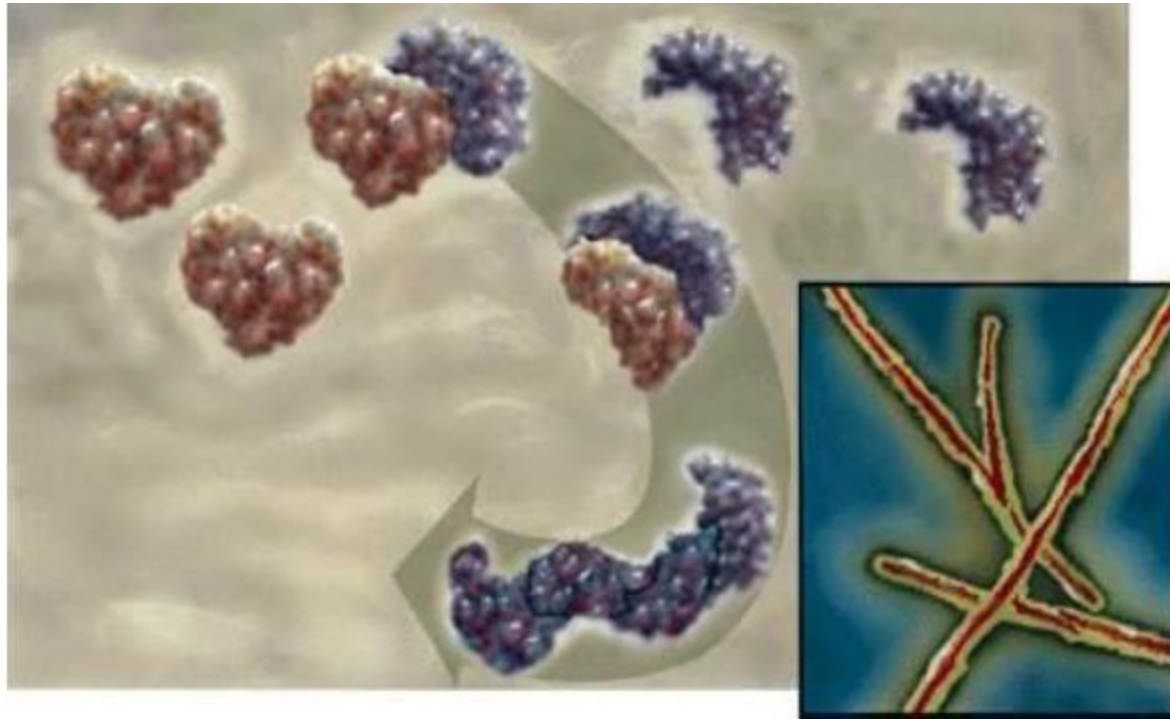


La PrPsc si forma stabilmente solo quando viene raggiunta una soglia oltre la quale si formano gli aggregati di PrPsc

All'inizio il processo è lento poi sempre più veloce.

Questo tempo è anche il tempo di latenza o di incubazione della malattia variabile da specie a specie



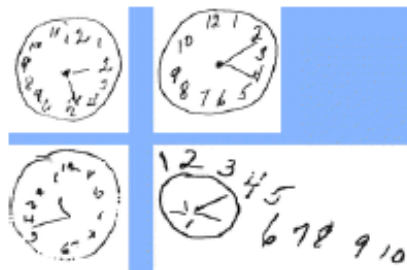


Il Prione esiste in due forme. Quella normale, innocua (PrPc), può cambiare la sua forma e diventare patogena (PrPSc). La conversione da PrPc a PrPSc procede poi con una reazione a catena. Quando viene raggiunta una concentrazione sufficiente di proteine PrPSc, queste si aggregano a formare un lungo filamento che gradualmente danneggia il tessuto neuronale

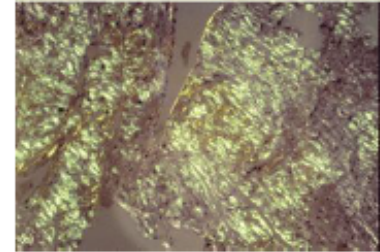
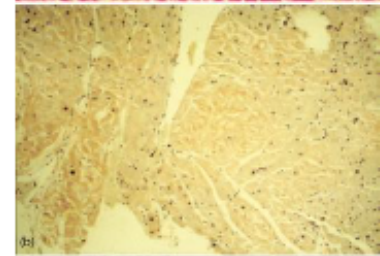
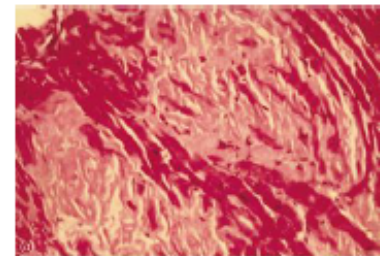
Alzheimer

Malattia neurologica progressiva debilitante che porta a perdita irreversibile di memoria ad un *deterioramento cognitivo fino alla demenza* ed altre capacità, fino alla completa dipendenza da assistenza. Caratterizzato morfologicamente, dalla presenza di placche senili contenenti β -amiloide e da ammassi neurofibrillari costituiti da filamenti di proteina tau

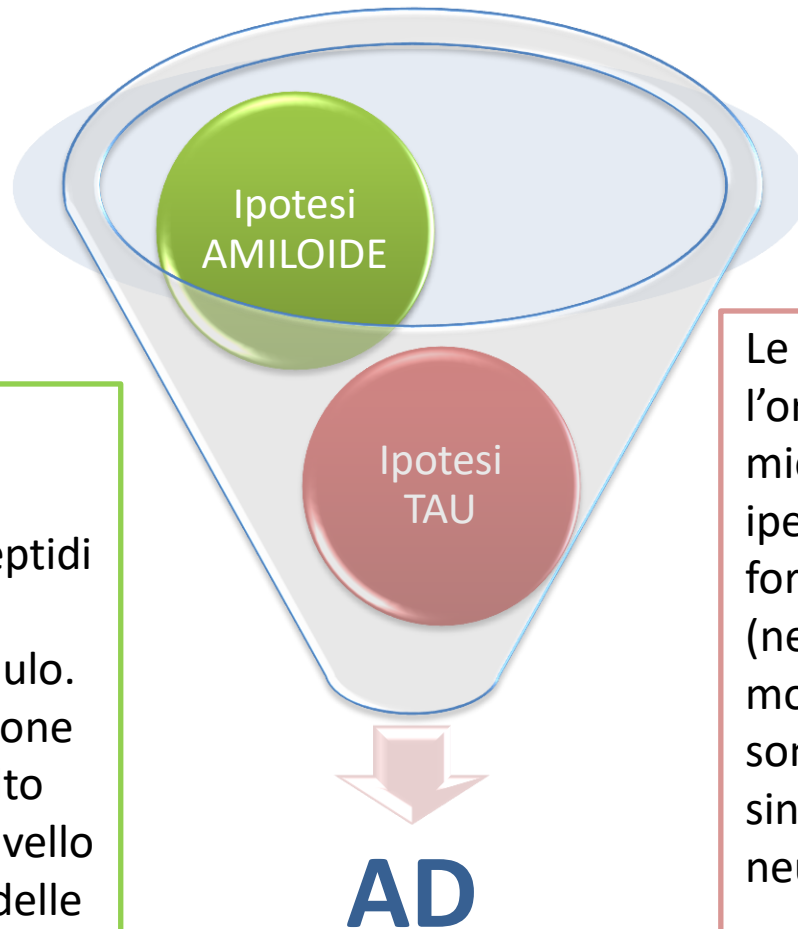
Tempo di sviluppo: circa 8 anni dopo la diagnosi.



Diagnosi per mezzo di test neuropsicologici

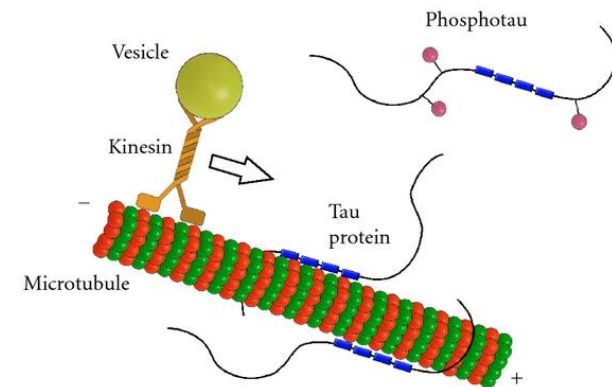


Prove istologiche (*post mortem*) nel cervello: depositi di placche amiloidi (*in vivo* con PET)

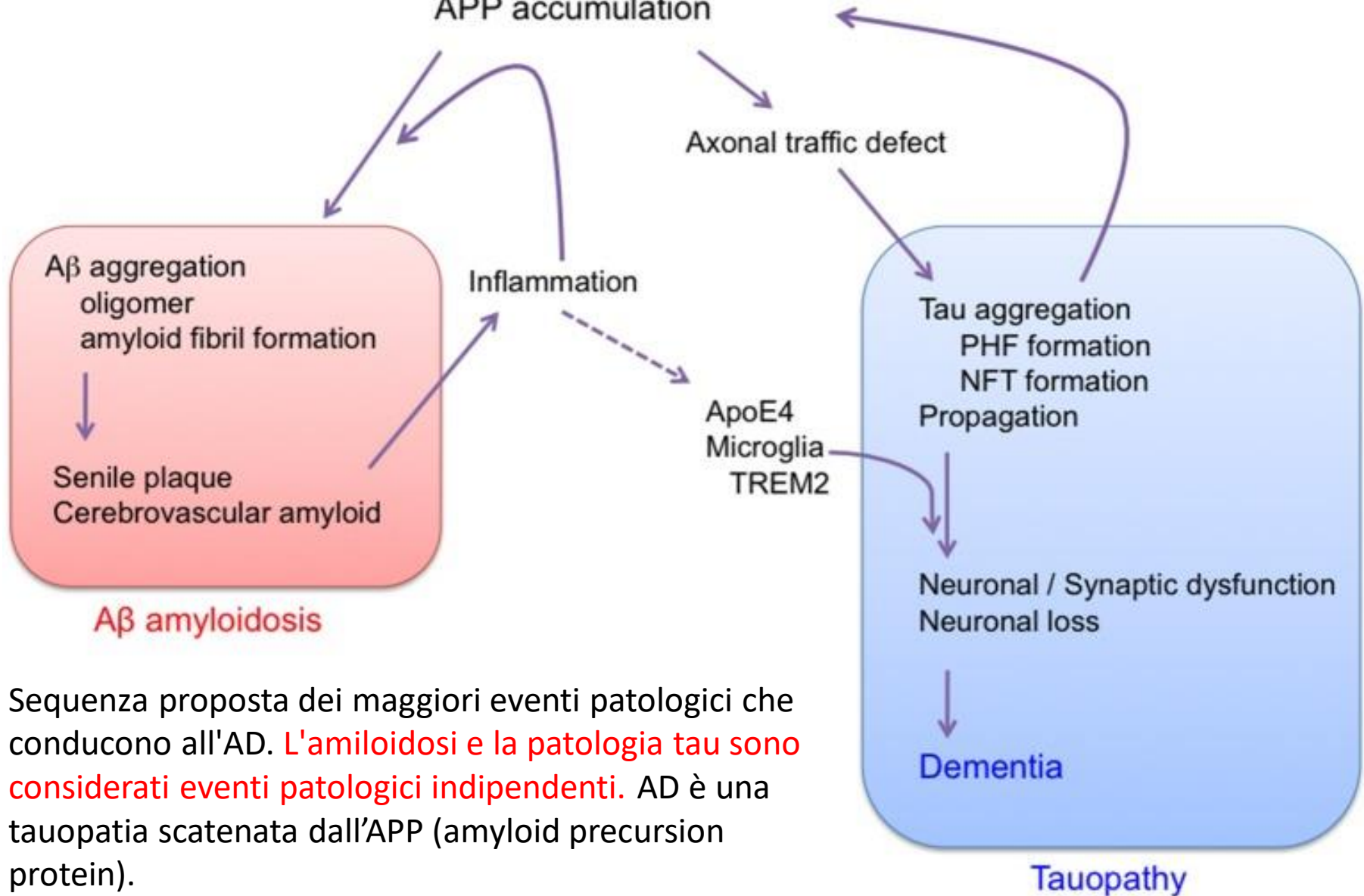


In soggetti anziani o in condizioni patologiche, la capacità di degradare i peptidi **A β amiloidi** diminuisce, generando un loro accumulo. Questo porta alla formazione delle fibrille amiloidi (molto stabili) e delle placche a livello cerebrale ritenute causa delle neurodegenerazioni.

Le **proteine tau** regolano l'organizzazione dei microtubuli, ma quando sono iperfosforilate si accumulano formando fibrille (neurofibrillary tangles, NTFs) molto stabili. Le lesioni tau sono strettamente correlata ai sintomi clinici e cognitivi nelle neurodegenerazioni.



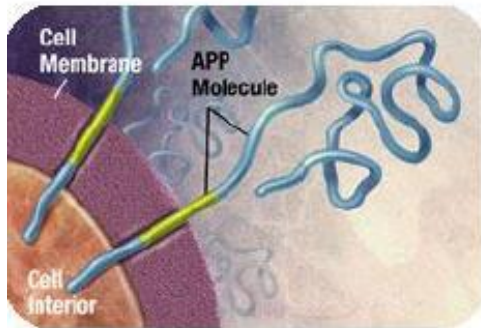
APP metabolic impairment
C-terminal fragments accumulation
APP accumulation



Sequenza proposta dei maggiori eventi patologici che conducono all'AD. **L'amiloidosi e la patologia tau sono considerati eventi patologici indipendenti.** AD è una tauopatia scatenata dall'APP (amyloid precursor protein).

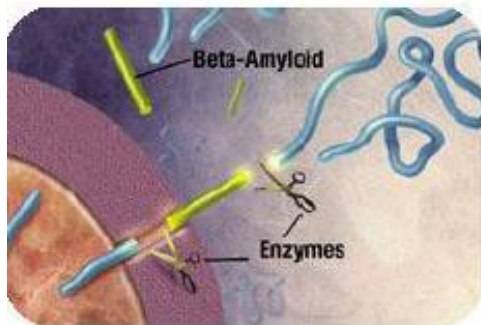
X

BETA AMILOIDE

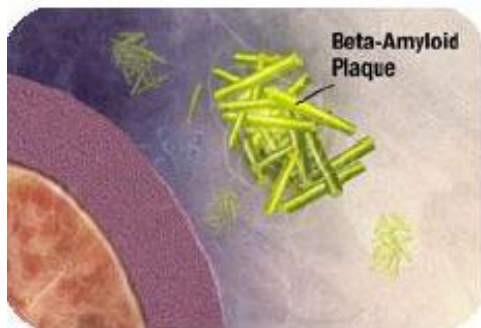


La proteina precursore dell'amiloide (APP):

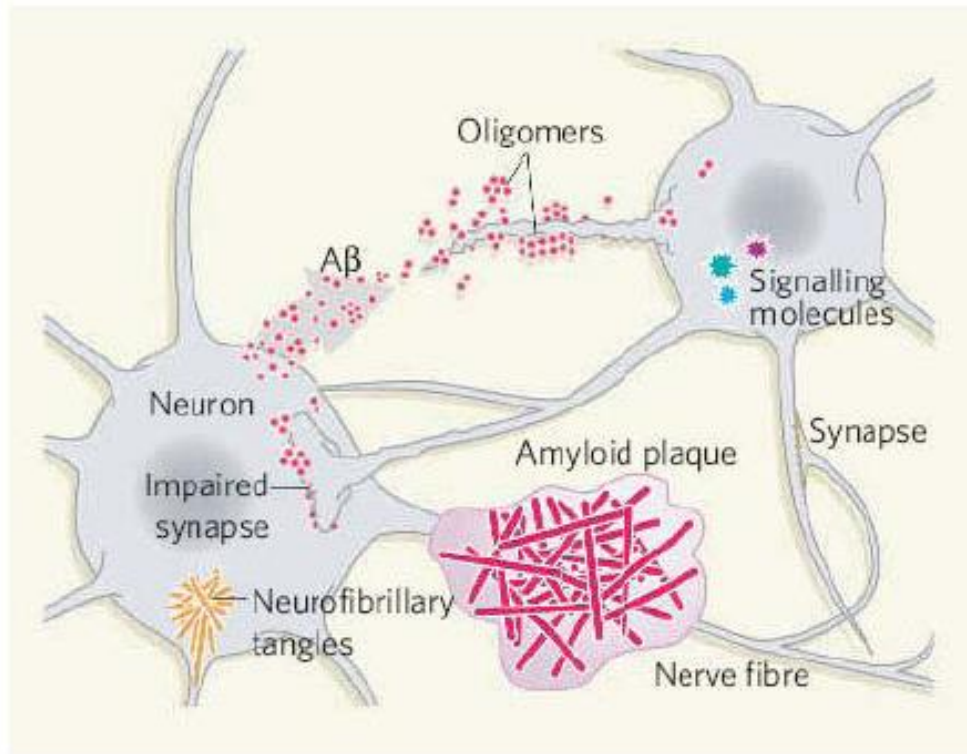
1. si attacca alla membrana Neuronale



2. viene scissa in frammenti da enzimi, fra cui la beta amiloide

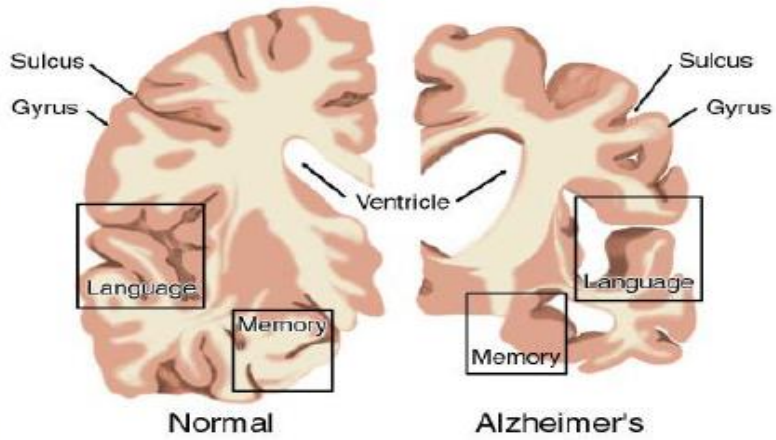


3. I frammenti di beta amiloide si uniscono a formare placche che si depositano al di fuori ed intorno ai neuroni.



Gli aggregati di maggiori dimensioni sono le placche senili, che distorcono le ramificazioni nervose. Oligomeri di dimensioni minori, come quelli formati da 12 unità, potrebbero avere un effetto ancora più forte sulla perdita di memoria, alterando la funzione sinaptica

Brain Cross-Sections



Cervello normale



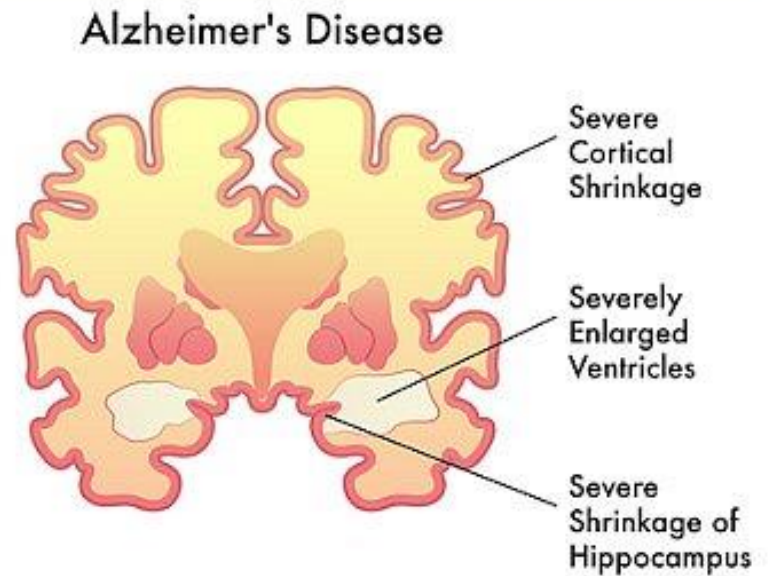
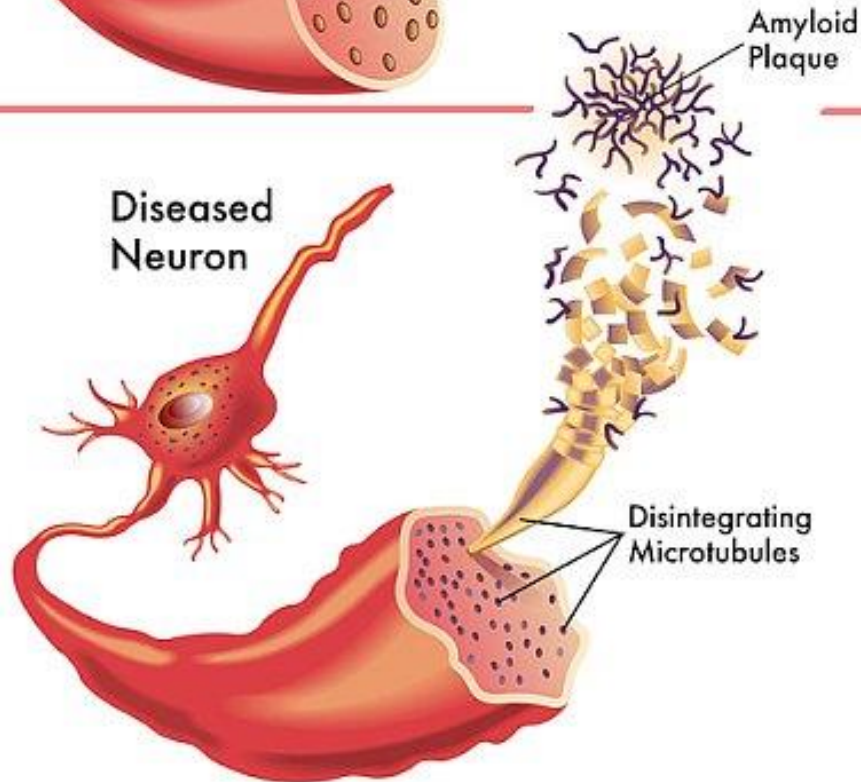
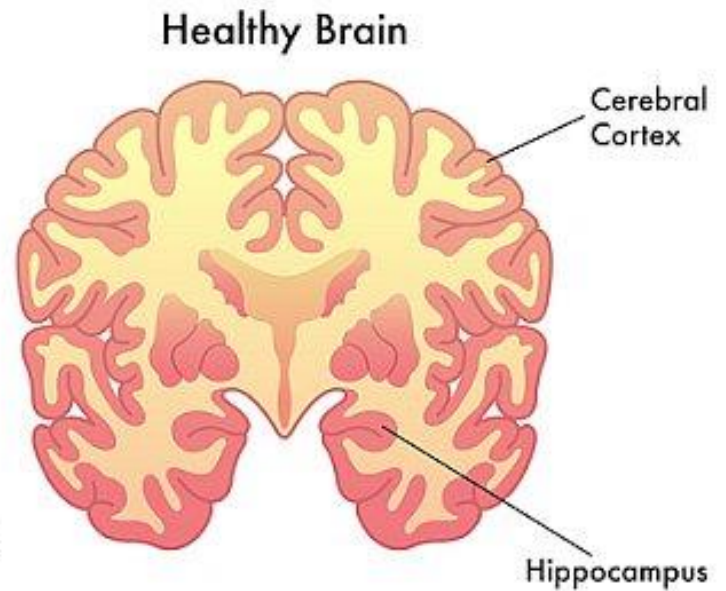
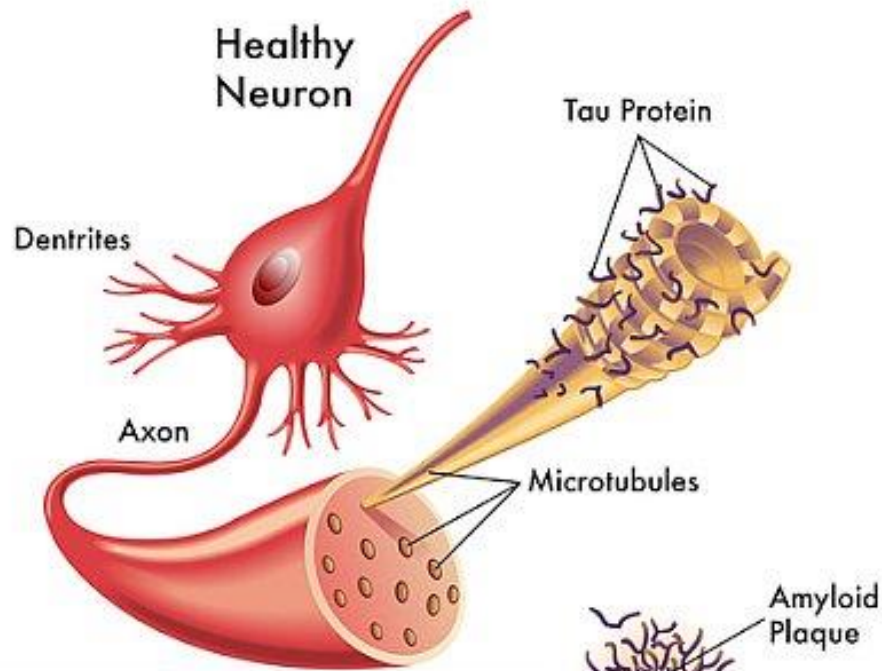
Cervello Alzheimer atrofico

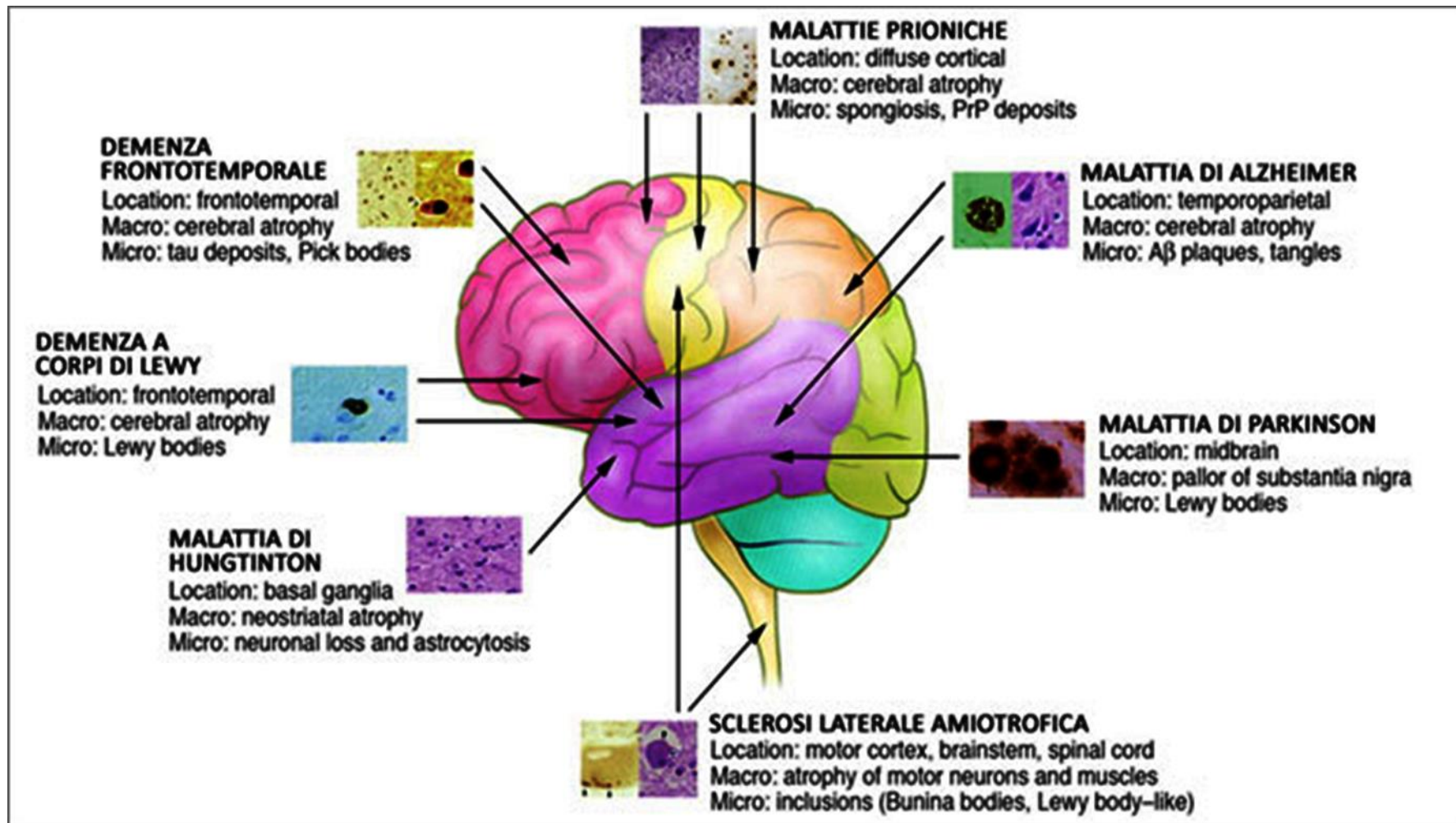
Nella malattia di Alzheimer, il peptide β -amiloide è considerato il responsabile della formazione delle placche extracellulari e le sue proprietà fibrillogeniche sembrano essere associate alla conversione strutturale da α -elica a foglietto β .

È stato però recentemente dimostrato che anche le forme **protofibrillari** possono rallentare la trasmissione sinaptica causando i *deficit di memoria e apprendimento* caratteristici della malattia.

Ciò implica che gli eventi iniziali del processo amiloidogenico, che precedono l'aggregazione fibrillare dell'amiloide, potrebbero essere sufficienti a compromettere l'efficienza sinaptica

L'interazione della beta amiloide con la PRPc favorirebbe la sua transizione a beta foglietto e quindi alla formazione delle placche con conseguente inibizione della trasmissione del segnale neuronale





The image shows a microscopic view of amyloid structure, characterized by a dense, fibrous network of greyish-brown fibers. Overlaid on this structure are several horizontal, semi-transparent ribbons in various colors: orange at the top, yellow in the middle, and purple at the bottom. The ribbons appear to be layered or stacked, with some overlapping each other. The text "AMYLOID STRUCTURE" is centered in the middle of the image in a bold, black, sans-serif font.

AMYLOID STRUCTURE

Molte proteine possono adottare una struttura metastabile, ossia conformazioni parzialmente strutturate stabilizzate attraverso una oligomerizzazione che precede la formazione delle fibrille amiloidi.

N. Cremades, C.M. Dobson / Neurobiology of Disease 109 (2018) 178–190

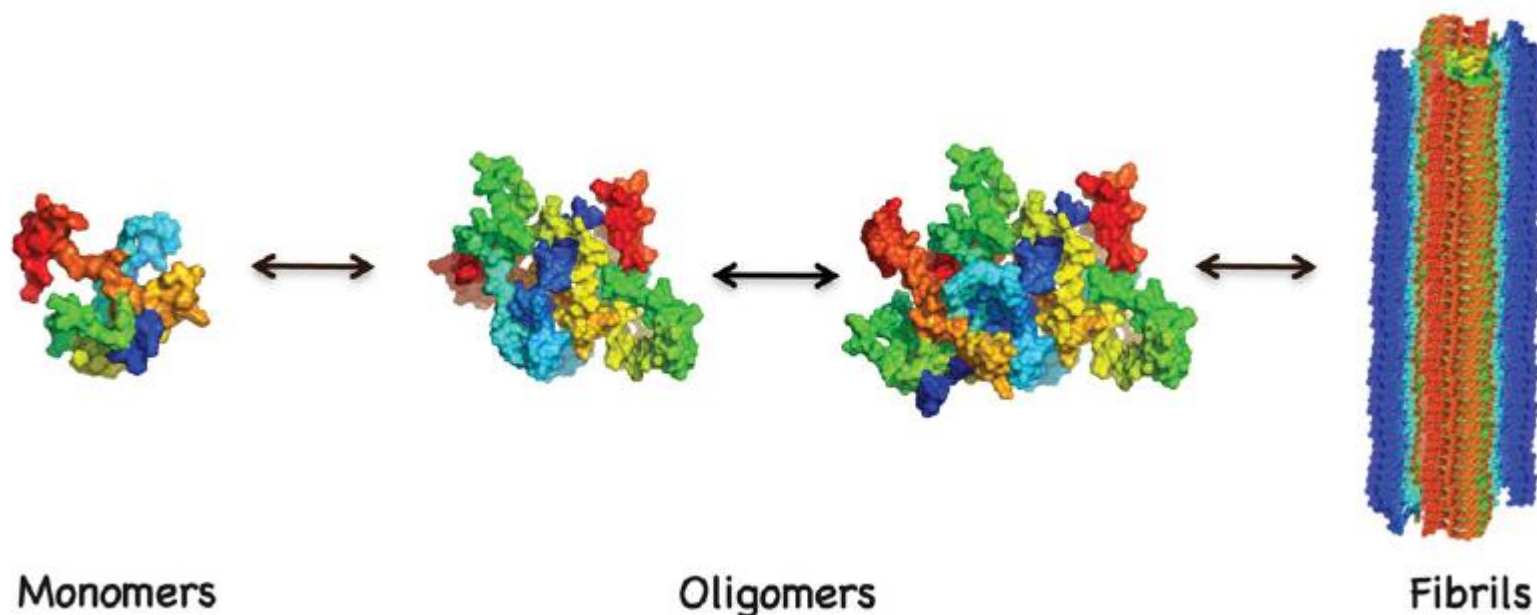
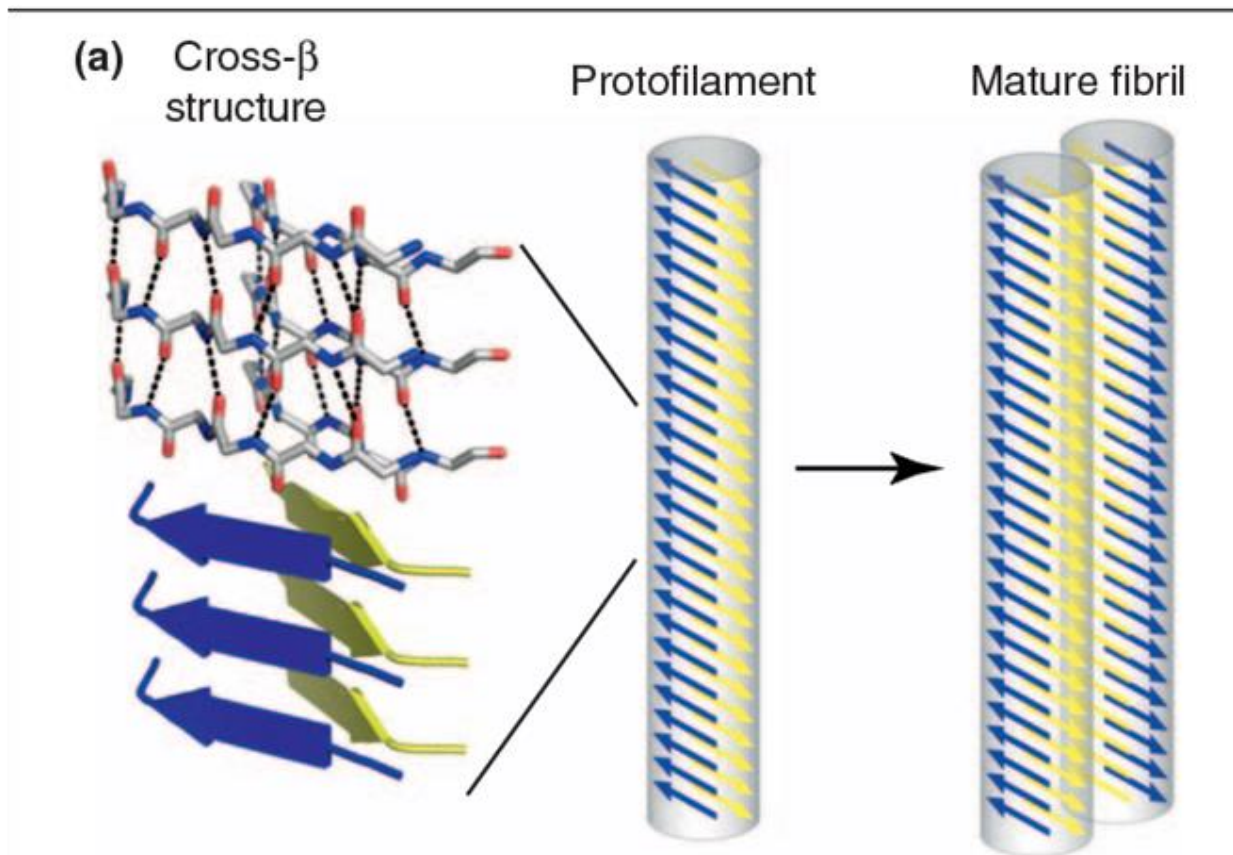


Fig. 1. Schematic representation of the process of amyloid formation. Natively folded or unfolded protein molecules, typically in monomeric form, undergo a process of misfolding and self-assembly generating initially oligomeric species and eventually amyloid fibrils. Once formed, these fibrils tend to accumulate into protein-rich inclusions that are the hallmark of a wide range of disease conditions. Although the general mechanism of amyloid formation has been established, the details of the formation, and conversion between the various species that are involved, along with their structures and properties, are still an important topic of investigation for specific proteins, under different conditions.

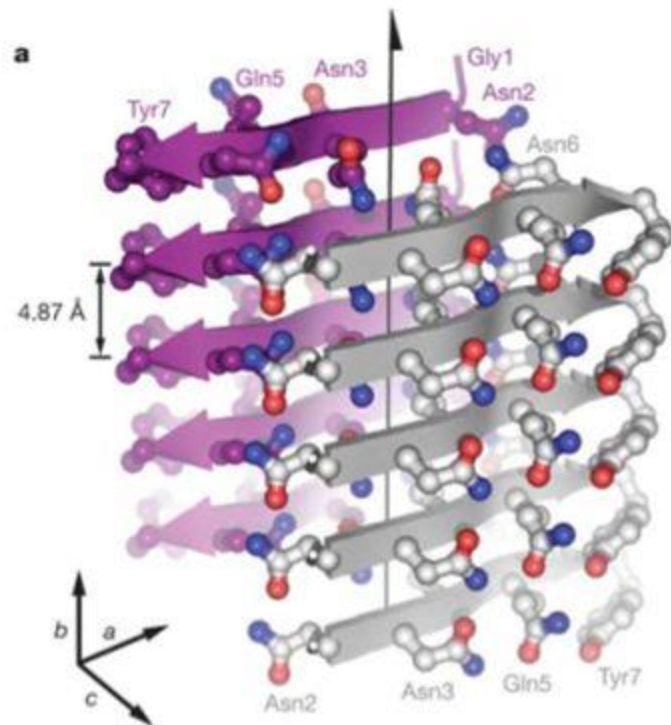
Una fibrilla amiloide contiene un motivo "cross- β ", ossia un foglio β a forma di nastro, composto da β -segmenti quasi perpendicolari alla direzione di crescita della fibrilla, collegati da legami idrogeno intercatena che corrono quasi parallelamente alla direzione di crescita.

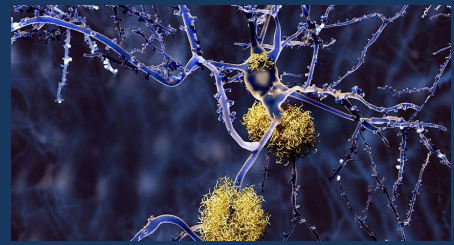


Structure of Amyloid Fibrils

Nelson R et al., *Nature* **435**, 773-778 (2005)

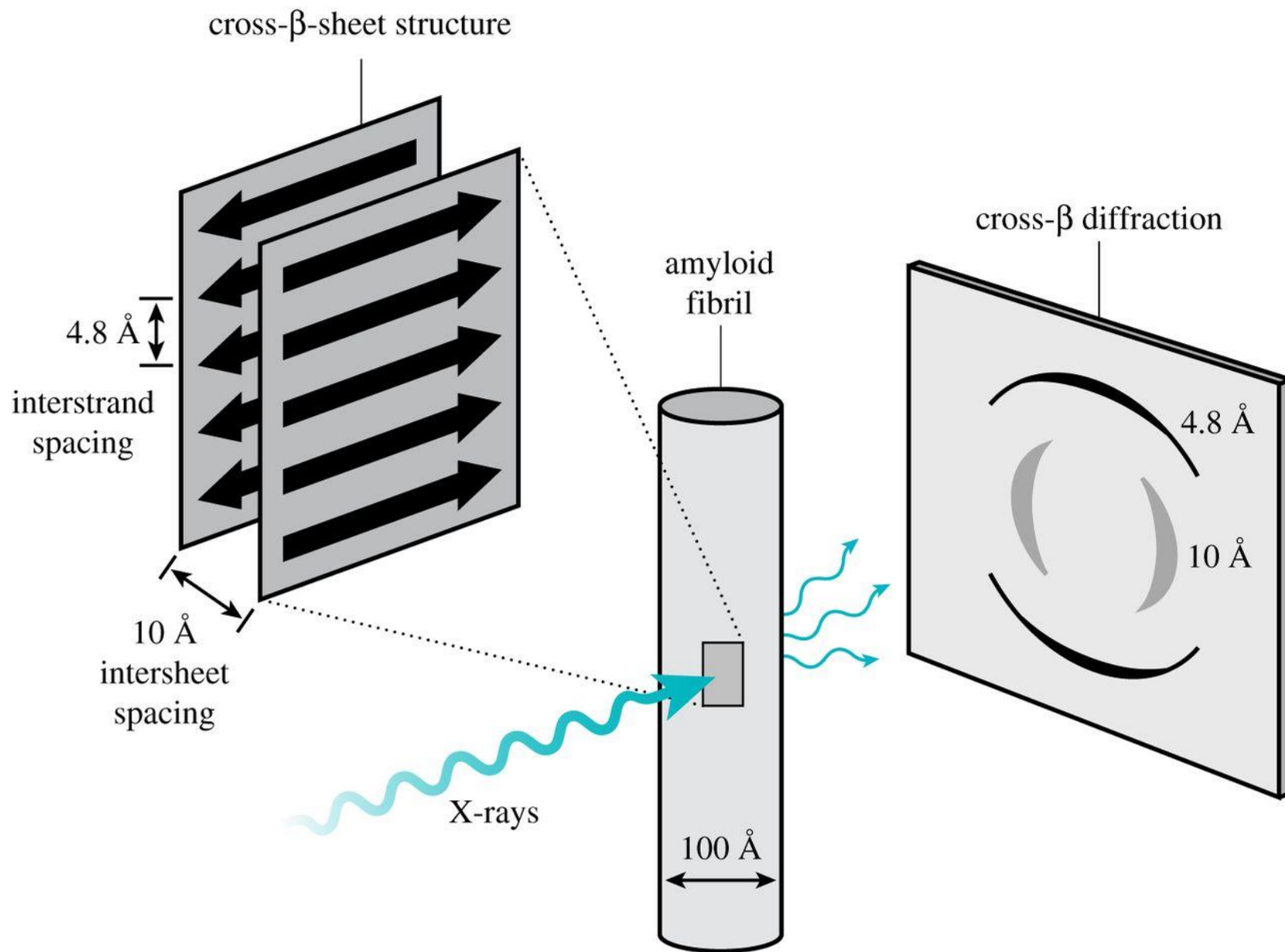
- Common characteristics
 - Elongated, unbranched
 - Cross-beta diffraction pattern
 - Binding Congo red and thioflavin T
 - **Unusual stability**
- 3 levels of organization within fibril
 - Formation of beta-sheet (H-bonds within each sheet)
 - Pair-of-sheets (van der Waals forces; dry interface; “steric zipper”)
 - Non-covalent forces form fibrils

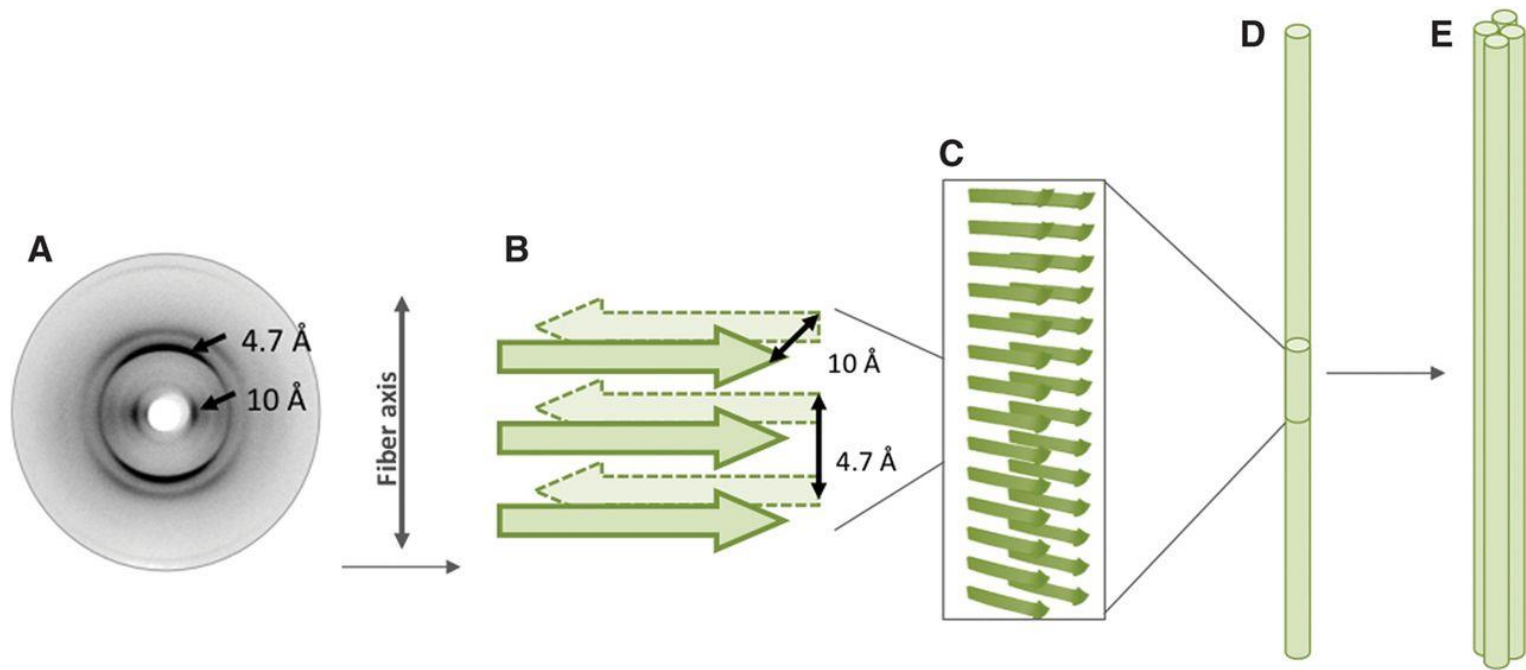




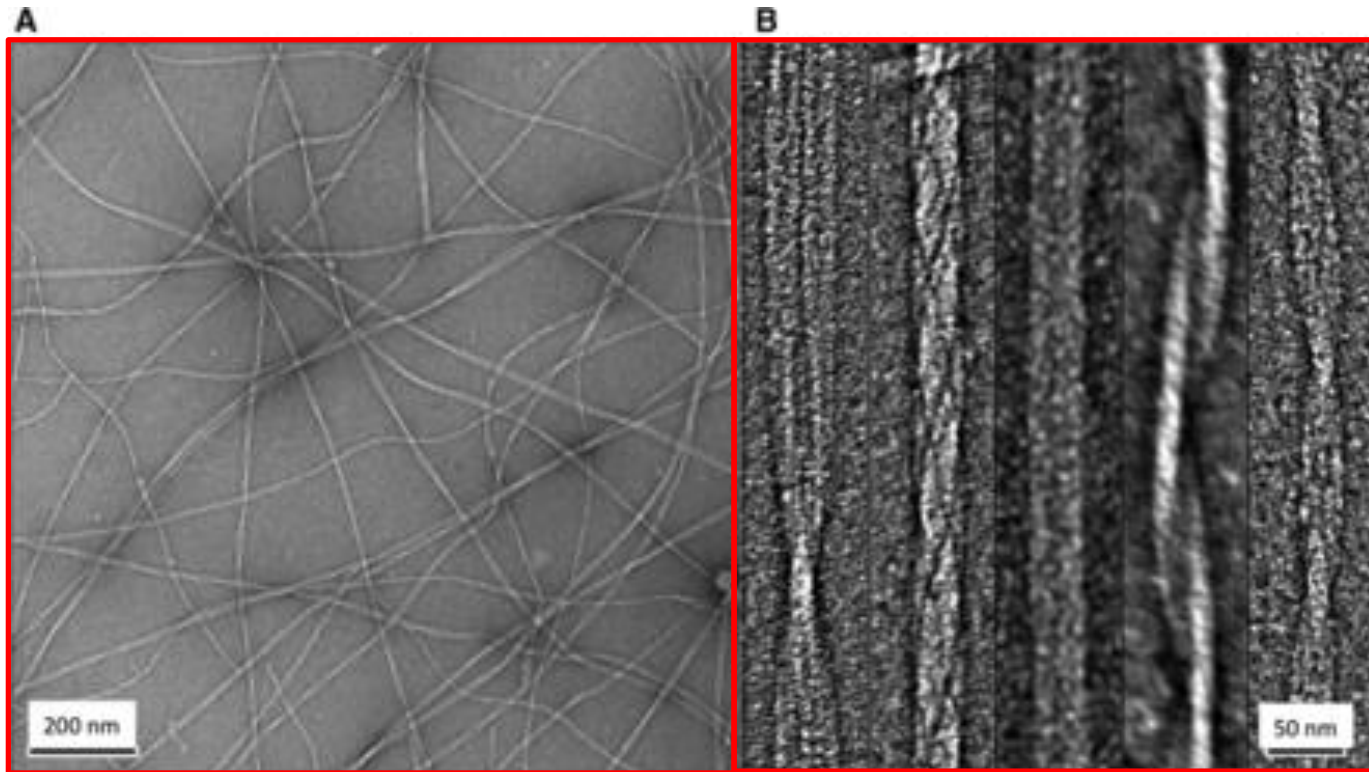
Misure sperimentali

- ❖ Diffrazione di raggi X
- ❖ Micrografia elettronica
- ❖ NMR allo stato solido
- ❖ Dicroismo circolare
- ❖ Differential scanning calorimetry (DSC)
- ❖ Isothermal Titration Calorimetry (ITC)
- ❖ Atomic Force Microscopy (AFM)

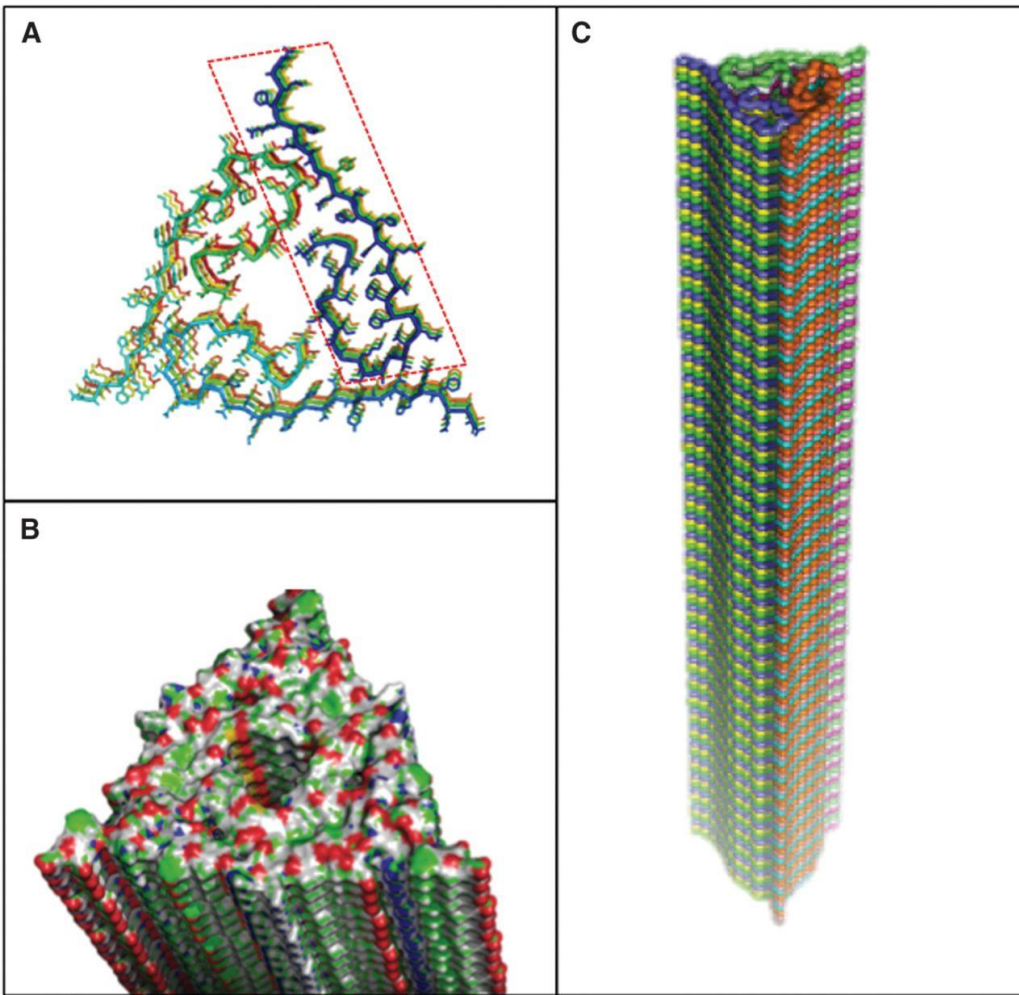




X-ray fibre diffraction gives information about the repetitive structure within the amyloid protofilament (A). The cross-β diffraction pattern obtained from amyloid fibrils arises from the (B) cross-β structural core of the protofilament shown in (C). The protofilaments shown in (D) self-associate to form the mature amyloid fibril (E).



Electron micrographs of negatively stained amyloid fibrils
(A) Amyloid fibrils formed by the islet amyloid polypeptide associated with Type 2 diabetes. (B) Alternative morphologies that can be formed by amyloidogenic peptides such as twisted ribbons, tubes, tapes and ropes.



The structure of the Aβ(1-40) amyloid fibril elucidated using **solid-state NMR**

(A) The view down the axis of the fibre showing the side chains. A single Aβ(1-40) molecule is highlighted and the molecules are coloured according to chain identifier.

(B) A surface representation showing the fibre coloured according to atom type and revealing the nature of the stacking along the fibre axis.

(C) The full fibre is generated from the PDB code 2M4J by using PyMOL (<http://www.pymol.org>), coloured by chain and represented as ribbons.

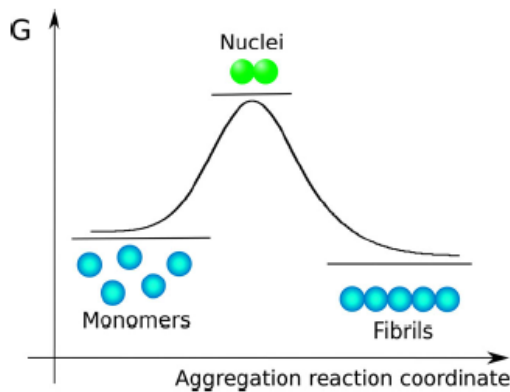


Fig. 2 Free energy diagram of amyloid fibril formation. The nucleus is the state with the highest free energy. Fibrils and monomers may have similar free energy, and the total concentration of monomer governs which state dominates at equilibrium.

Dicroismo circolare (CD)

La cinetica di formazione delle fibrille amiloidi può essere seguita con il dicroismo circolare. Si monitora la variazione nella concentrazione di monomeri (random coil) e la formazione di aggregati (ricchi in β -sheet)

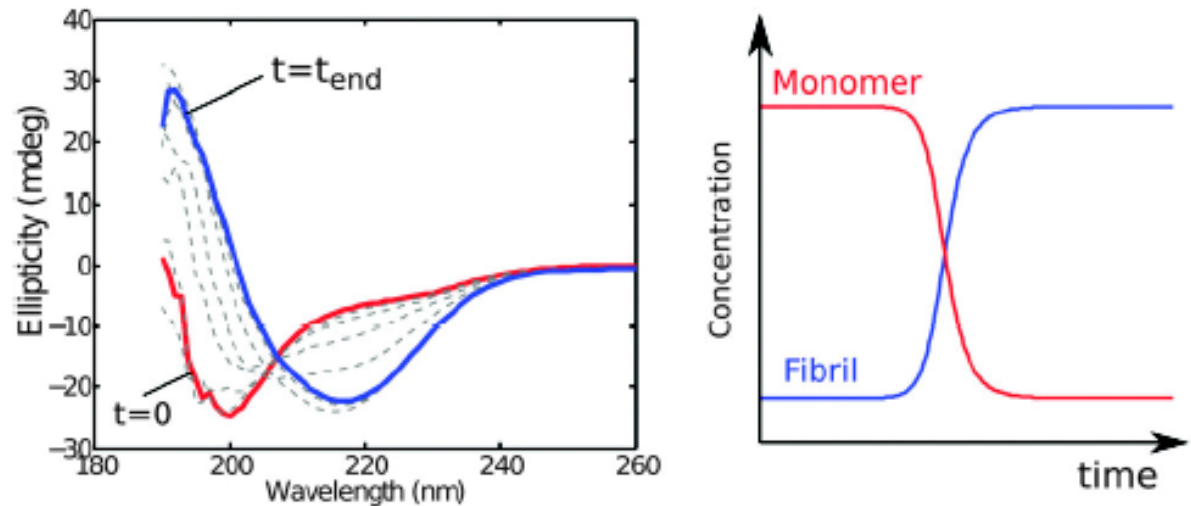
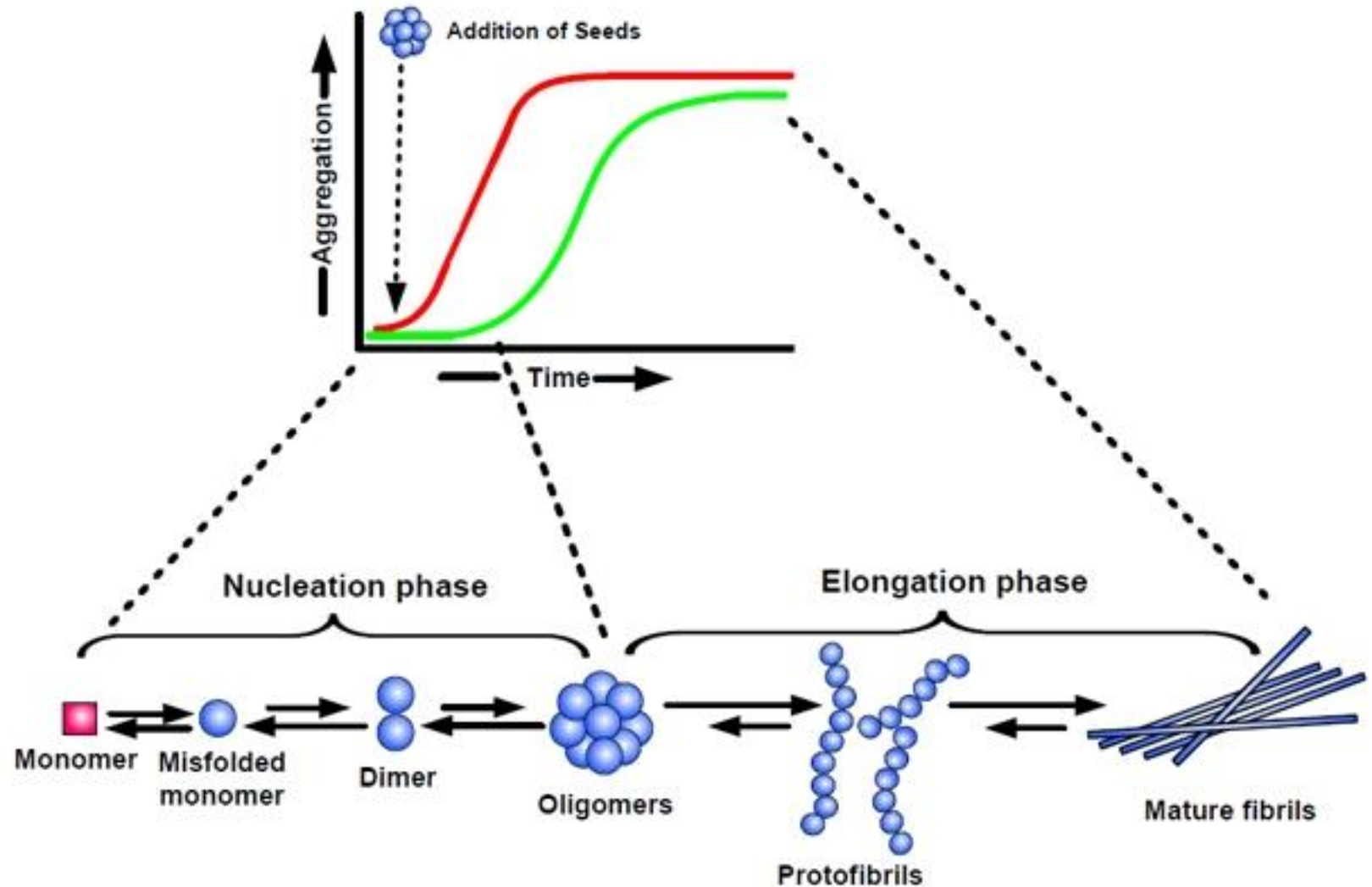
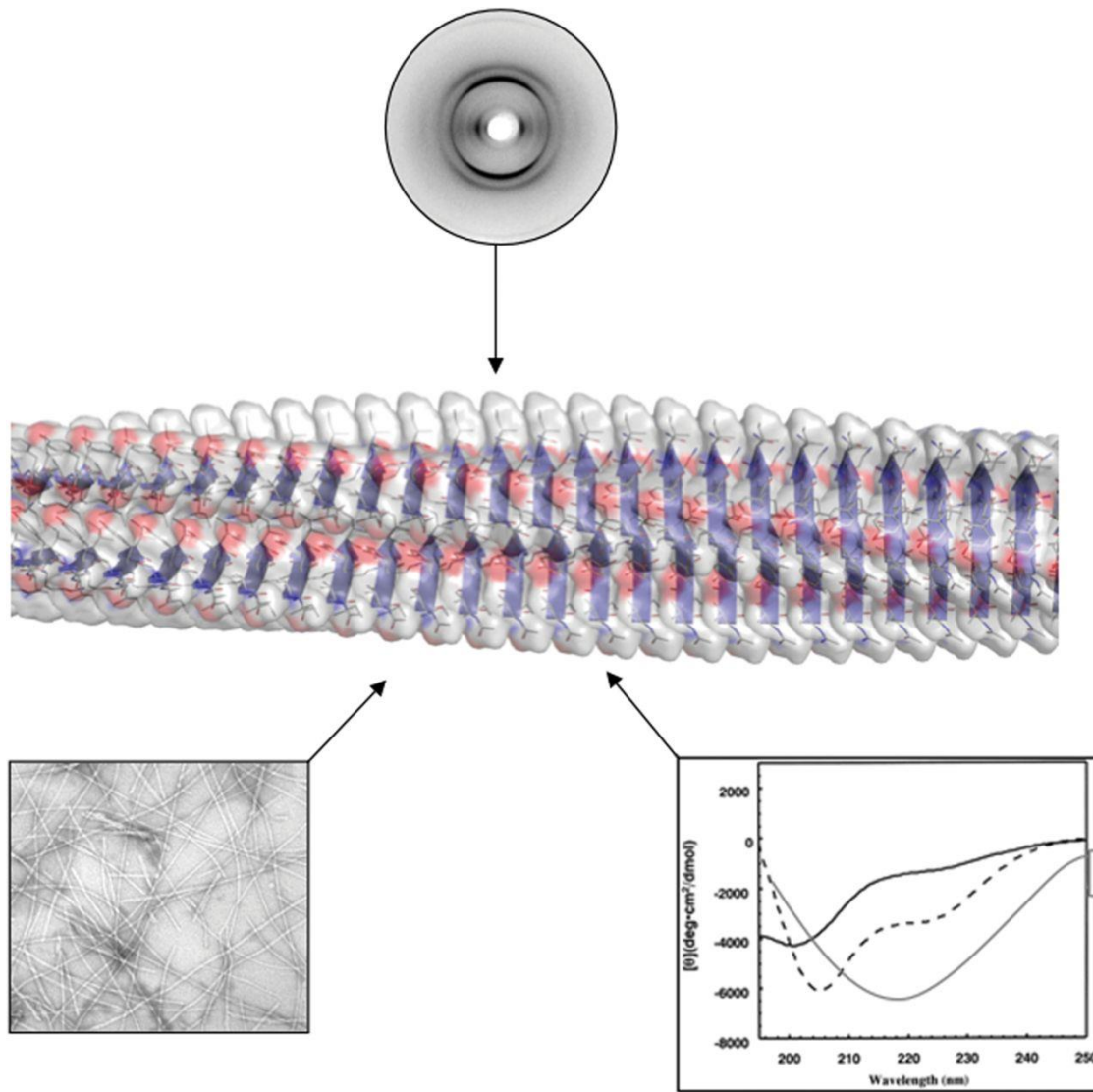


Fig. 4 CD spectra acquired during an ongoing reaction (left). The first spectrum (red) shows the unfolded monomer and the last spectrum (blue) the β -sheet fibril. The monomer and fibril concentration as a function of time (right) can be extracted by fitting superpositions of the start and end spectra to the experimental data acquired at different time points.

I nuclei (“seeds”) forniscono una sorta di stampo dove altre proteine “misfolded” o parzialmente ripiegate sono reclutate, aumentando in tal modo la dimensione degli aggregati che alla fine producono le fibrille.





Structural methods can be combined to elucidate models for the amyloid structure. The diagram shows the contribution of X-ray fibre diffraction, electron microscopy and circular dichroism that can be combined to produce a structural model for the amyloid fibril.

STABILITA' DELLE FIBRILLE

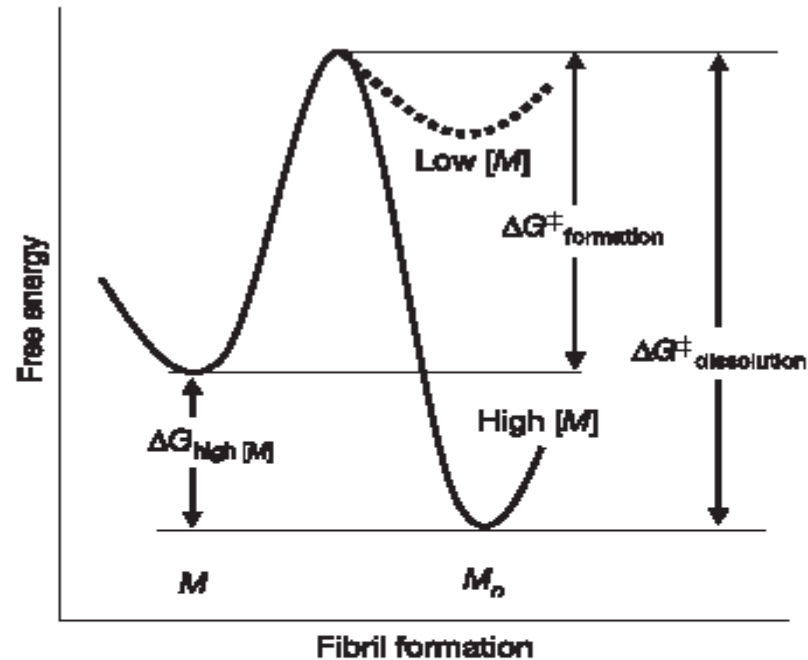
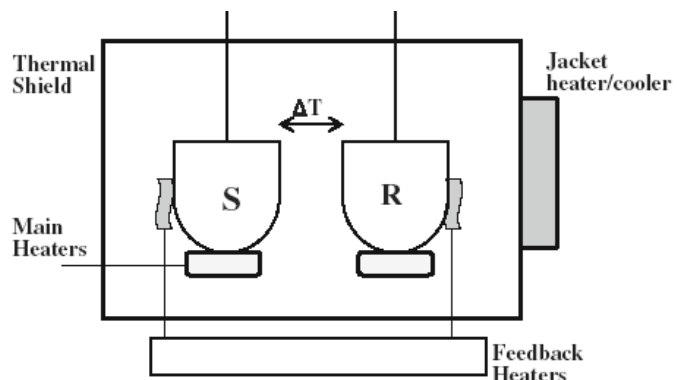


Figure 3 | A conjectural plot of the free energy, G , for conversion of monomeric GNNQQNY, M , to the aggregated state, M_n . The standard free energy change ΔG^0 for the conversion is small, so that the change in ΔG is controlled mainly by the concentration of monomer. At low concentrations, the monomeric state is favoured over the aggregated state, and the aggregated state is favoured at high concentrations. There is a significant kinetic barrier to formation of the aggregated state, $\Delta G_{\text{formation}}^{\ddagger}$. At high concentrations of protein, the barrier to re-dissolve fibres, $\Delta G_{\text{dissolution}}^{\ddagger}$, is very large.



Differential Scanning Calorimetry (DSC)

As the temperature increases, thermally induced processes occurring in the sample cell that absorb or release heat will result in a thermal imbalance between the sample and reference cells which is compensated for by electrically powered feedback heaters. This electrical power signal provides a direct measure of the heat capacity (C_p) difference between the sample solution and the solvent: $C_p^{\text{sol}} - C_p^{\text{solv}}$ (in units of J K^{-1}). As the heat capacity corresponding to β_2 -microglobulin (β_2 -m) amyloid fibril (protein) solution is detected as negative values (Fig. 2a), it is termed the apparent heat capacity ($C_{p,\text{app}}$). The $C_{p,\text{app}}$ -temperature traces of the fibrils in Fig. 2b are well approximated by:

$$C_{p,\text{app}} = C_{p,\text{app}}(T_1) + a(T - T_1) + b(T - T_2)^2$$

where **a** and **b** are constants, and T_1 is a reference temperature. As the heat capacity ($C_{p,\text{app}}$) at constant pressure is a temperature derivative of the heat quantity from the sample solution, the heat quantity (Q_{1-2}) needed to induce the exothermic process is represented in the temperature range from T_1 to T_2 by:

$$Q_{1-2} = (C_{p,\text{app}}(T_1) - C_{p,0}) (T_2 - T_1) + a/2 (T_2 - T_1)^2 + b/3 (T_2 - T_1)^3$$

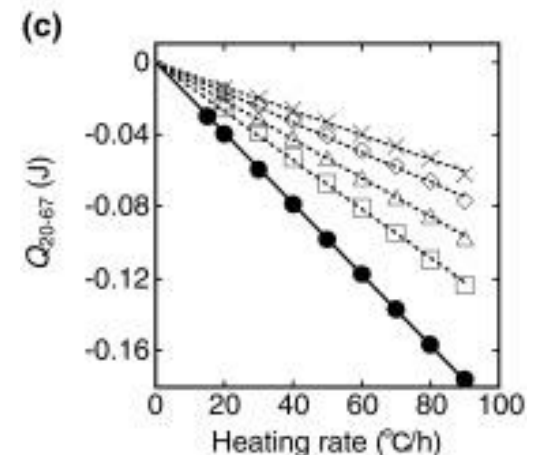
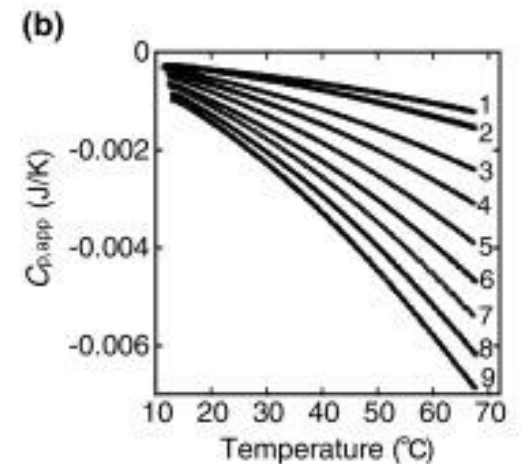
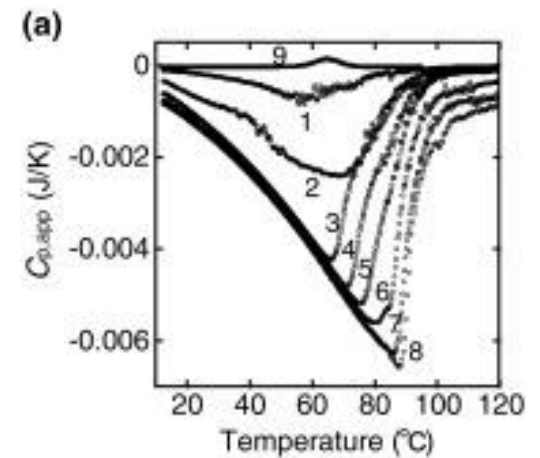
In the calculation of Q_{1-2} , T_1 and T_2 are set at 20°C (293.15 K) and 67°C (340.15 K), respectively. The $C_{p,\text{app}}$ values extrapolated to the zero heating rate at 67°C were used as $C_{p,0}$, which corresponds to that of the monomeric state within the heat scale used. With a non-linear least-square fitting program, the calculated DSC curves were fitted to the observed curves so that **a** and **b** were determined (Sasahara et al. 2005)

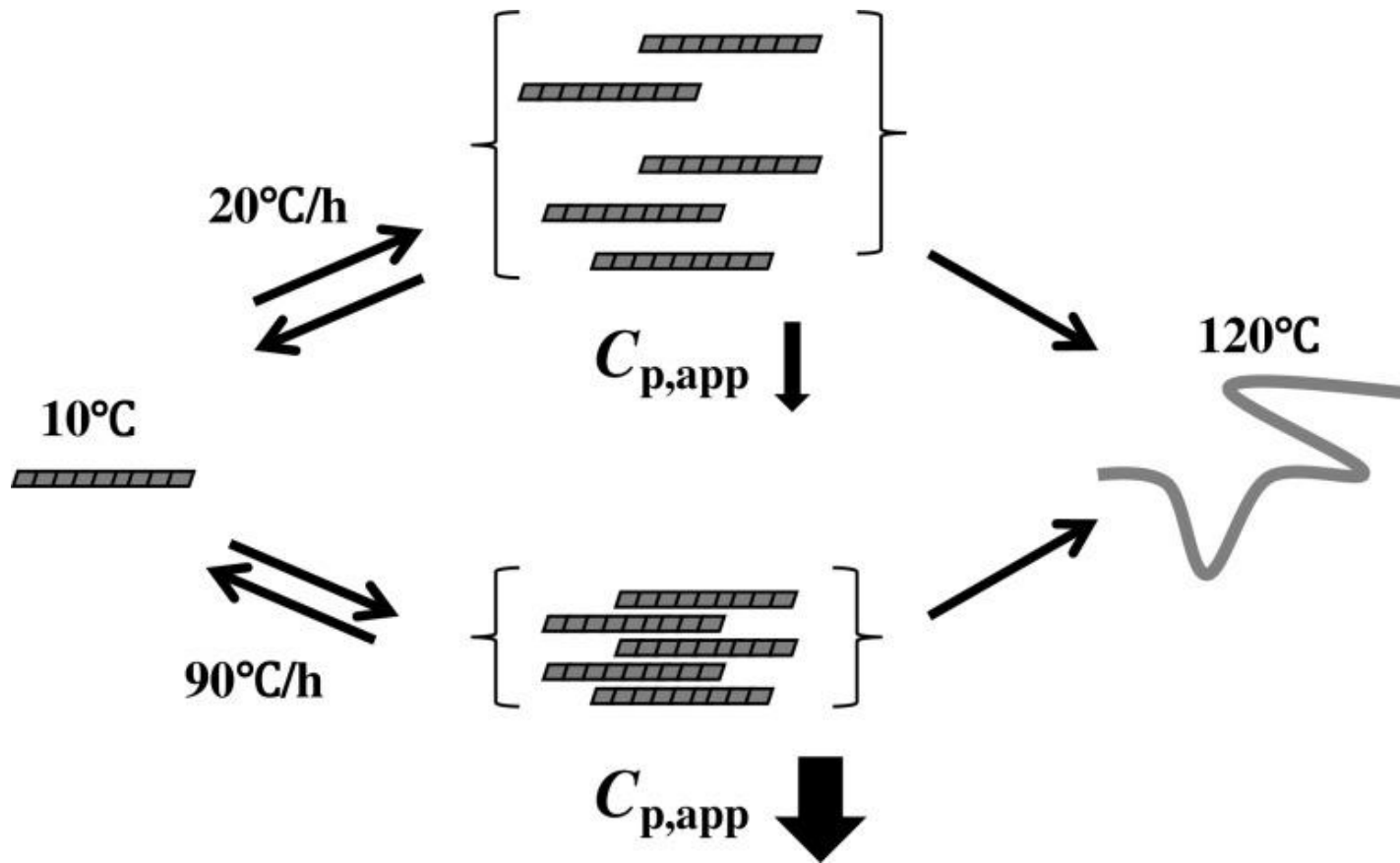
Thermal response of β_2 -m amyloid fibrils measured by differential scanning calorimetry (DSC) at pH 2.5.

a Representative DSC thermograms of β_2 -m amyloid fibrils. The **fibril concentration** varies from 0.015 to 0.28 mg/mL. *Lines: 1* 0.015, *2* 0.025, *3* 0.04, *4* 0.075, *5* 0.125, *6* 0.17, *7* 0.2, *8* 0.28 mg/mL. The heating rate is 60 °C/h. For comparison, a DSC thermogram of native β_2 -m (0.125 mg/mL) at pH 7.0 is recorded (*line 9*).

b DSC thermograms of the fibrils (0.1 mg/mL) recorded at various **heating rates** from 10 to 68 °C. The heating rate is varied in repeated consecutive scans from 90 to 15 °C/h: 90 (*line 9*) \rightarrow 80 (*8*) \rightarrow 70 (*7*) \rightarrow 60 (*6*) \rightarrow 50 (*5*) \rightarrow 40 (*4*) \rightarrow 30 (*3*) \rightarrow 20 (*2*) \rightarrow 15 °C/h (*1*). Furthermore, heating is carried out twice at each heating rate.

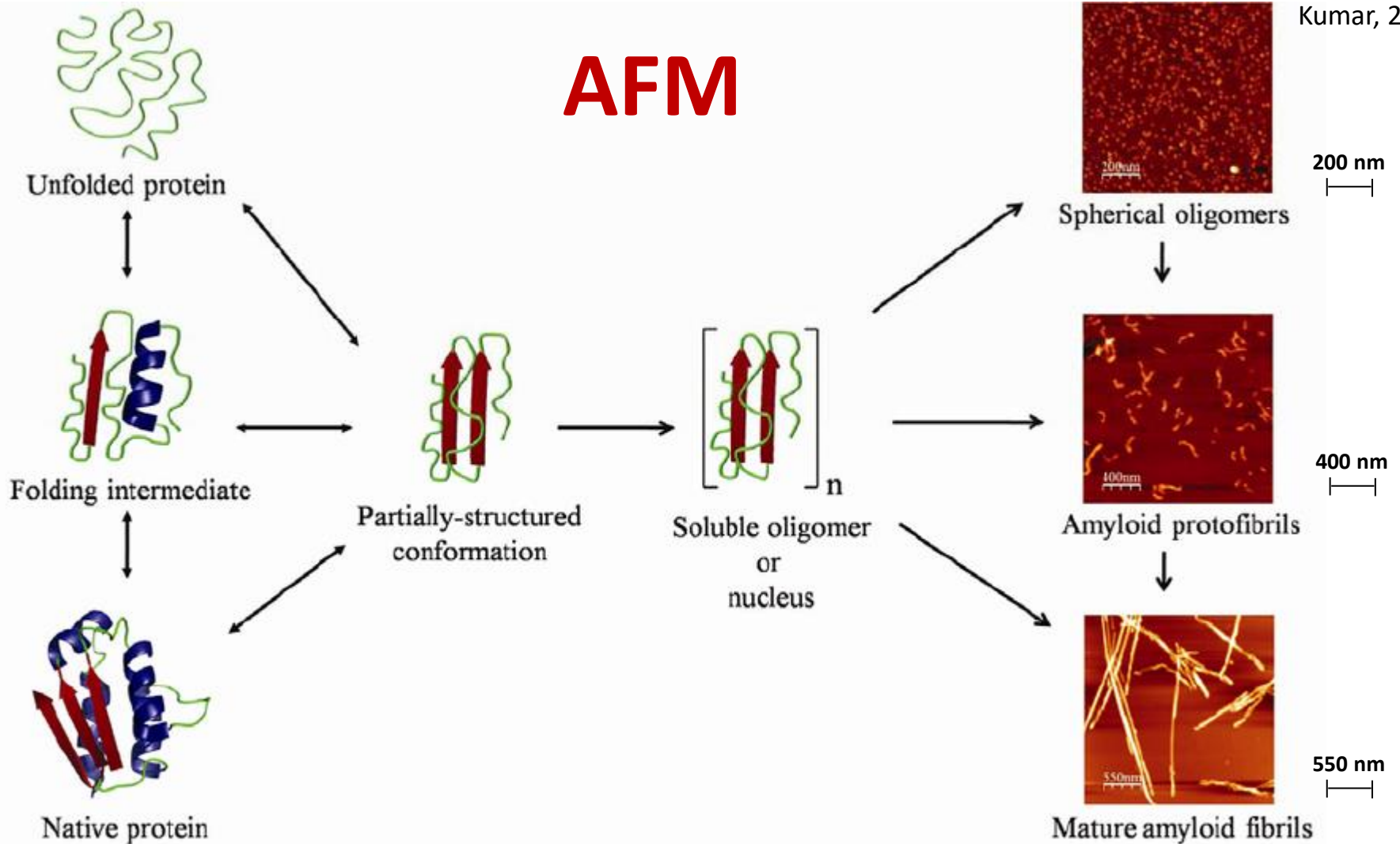
c Dependence of the Q_{20-67} value on the heating rate. The heat quantity (Q_{20-67}) needed to induce the exothermic process in the temperature 20–67 °C was calculated from DSC thermograms of the fibrils (0.1 mg/mL) in the absence and presence of polyethylene glycol (PEG) 6000 at different concentrations: *circles* 0 g/L, *squares* 20 g/L, *triangles* 40 g/L, *diamonds* 60 g/L, *crosses* 80 g/L. Adapted from Sasahara et al. ([2005](#), [2009](#))



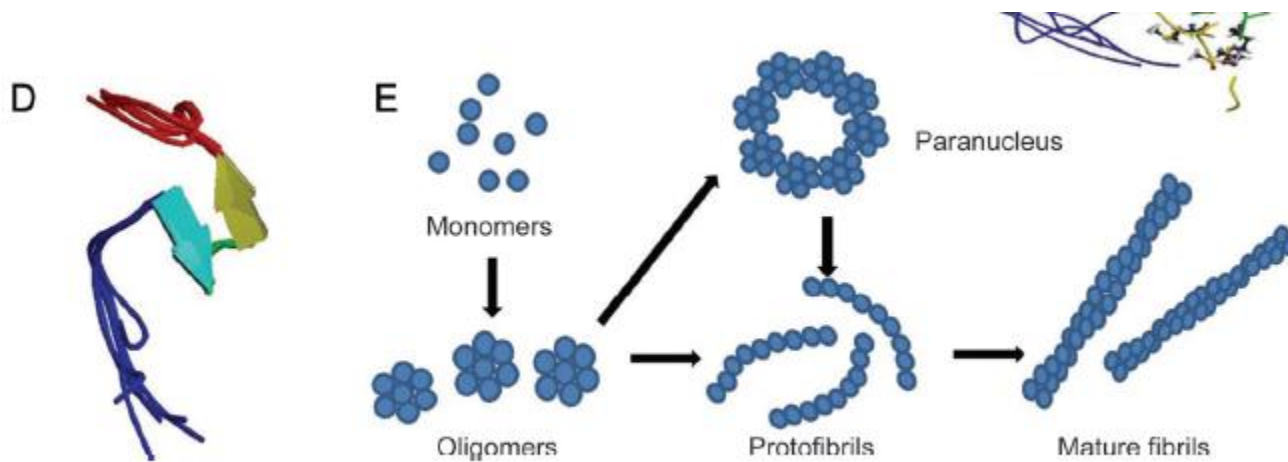


A model representing the transient **inter-fibrillar association** during heating. The association, which is reversibly heating rate-dependent, results in a decrease in the surface area of the fibrils accessible to the solvent water and, concomitantly, the decrease in $C_{p,app}$. Amyloid fibrils thermally depolymerize upon heating up to 120 °C

AFM



Protein folding and amyloid formation. Amyloid fibril formation commences from partially (un)folded conformers, which can form by partial unfolding of globular proteins, partial folding of natively unfolded proteins, or by conformational change in folding intermediates. **These partially (un)folded amyloidogenic conformations self-assemble into amyloid fibrils.** During the amyloid fibril formation reactions of many proteins, the conversion of partially (un)folded conformations into fibrils occurs through pre-fibrillar aggregates (spherical oligomers and/or protofibrils). The scale bars in the atomic force microscopy images of spherical oligomers, protofibrils and mature fibrils represent, respectively 200, 400 and 550 nm.



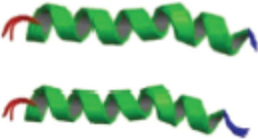
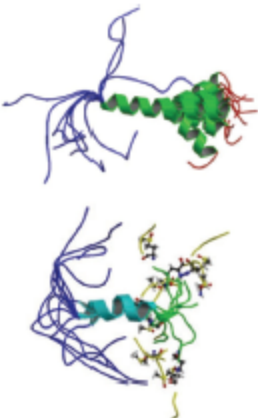

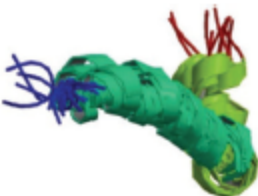
(D) Amyloid beta peptide (10-35) forms a collapsed coil structure (PDB code: 1HZ3). It collapsed into a compact series of loops, strands, and turns with no alpha-helical or beta-sheet structure. The van der Waals and electrostatic forces maintain its conformational stabilization. Approximately 25% of the surface is uninterrupted hydrophobic, and the compact coil structure is meta-stabled, which may lead to a global conformational rearrangement and formation of intermolecular beta-sheet secondary structure caused by fibrillization. (E) Proposed pathway for the conversion of amyloid beta monomers to higher order oligomers, protofibrils and fibrils. $A\beta$ monomers can form higher order assemblies ranging from low molecular weight oligomers, including dimers, trimers, tetramers, and pentamers, to mid-range molecular weight oligomers including hexamers, nonamers and dodecamers to protofibrils and fibrils.



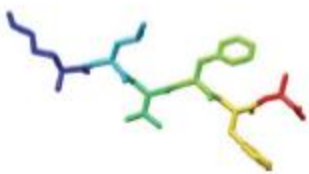

...in «Introduzione» al corso avevamo parlato di :


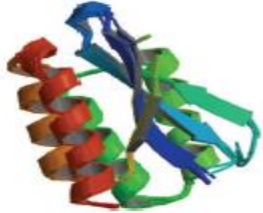
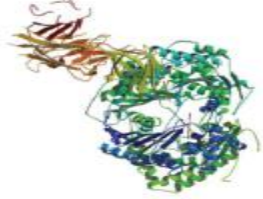



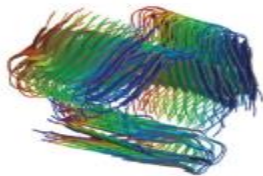
Strategie di base nello studio dei biopolimeri

- Utilizzare sistemi più piccoli come modelli
- Utilizzo di marcatori
- Paragonare due sistemi simili
- Isolare stati discreti del sistema

Table 1. Summary of A β structural studies.

| Proteins and peptides | Structure | Characteristic | PDB code |
|----------------------------|---|--|--------------|
| A β 1-28 |  | Monomer; NMR; In membrane-like media the peptide folds to form a predominately alpha-helical structure with a bend centered at residue 12. | 1AMC 1AMB |
| A β 1-40 with Met(O) |  | Monomer; NMR; forms C-terminal alpha-helix; two acidic amino acids promote a helix-coil conformational transition. | 1BA4 1BA6 |
| A β 10-35 |  | Monomer; NMR spectroscopy; A β collapsed into a compact series of loops, strands, and turns and the absence of alpha-helical or beta-sheet structure in water. | 1HZ3 |
| A β 1-42 |  | Monomer; NMR; two helical regions encompassing residues 8-25 and 28-38, connected by a regular type I beta-turn. | 1IYT |

| Proteins and peptides | Structure | Characteristic | PDB code |
|-----------------------|---|---|------------------------------|
| A β 25-35 |  | Monomer; CD and NMR; A β (25-35) is highly toxic and forms fibrillar aggregates. | 1QWP 1QXC 1QYT |
| A β 1-42 |  | Monomer; CD and Solution NMR; Alpha helix embedded in membrane, beta-sheet structures of amyloid fibrils | 1Z0Q |
| A β 16-21 |  | X-Ray; fiber-forming segments of A β . Self-complementing pairs of β -sheets termed steric zippers. | 2Y29 |
| A β 35-42 |  | Polymorphic oligomers, protofibrils, and fibers; Homo tetramer-A4; β -sheets termed steric zippers. | 2Y3L |

| Proteins and peptides | Structure | Characteristic | PDB code |
|---|---|--|----------------------|
| A β 17-36 |  | Homo 16-mer-A16; X-Ray; Crystallizes to form trimers that further assemble into oligomers; Trimers consist of three β -hairpins; Two trimers form hexamer; four trimers form dodecamer, and 5 dodecamers form an annular pore. | 5HOW |
| A β 1-40 in complex with affibody protein Z (A β 3) |  | Homo trimer-A3; Solution NMR; Z(A β 3), nanomolar affinity, Bound A β (1-40) features beta-hairpin comprising residues 17-36 | 2OTK |
| A β 1-40 in complex with Fab-bound human Insulin Degrading Enzyme (IDE) |  | Hetero trimer-ABC; X-Ray | 4M1C |
| A β 1-40 complex with an engineered lipocalin (Anticalin H1GA) |  | X-Ray | 4MVI 4MVK 4MVL |
| A β 1-42 fibrils |  | Homo pentamer-A5; Solution NMR; residues 18-42 form intermolecular parallel beta-strand-turn-beta-strand motif | 2BEG |
| A β 37-42 fibrils |  | Homo tetramer-A4; X-Ray; a pair of beta-sheets, with the facing side chains of the two sheets interdigitated in a dry 'steric zipper' | 2ONV |
| A β fibrils |  | Fibrils; solid-state NMR; the fibril backbone arrangement, stacking registry, and "steric zipper" core interactions | 2MPZ |