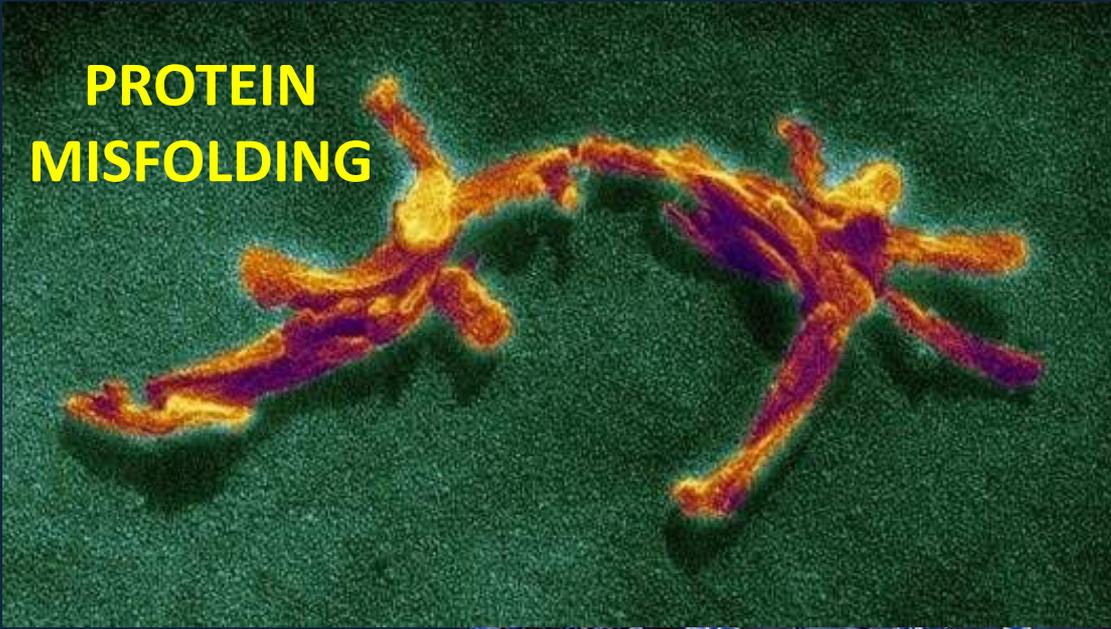


PROTEIN MISFOLDING



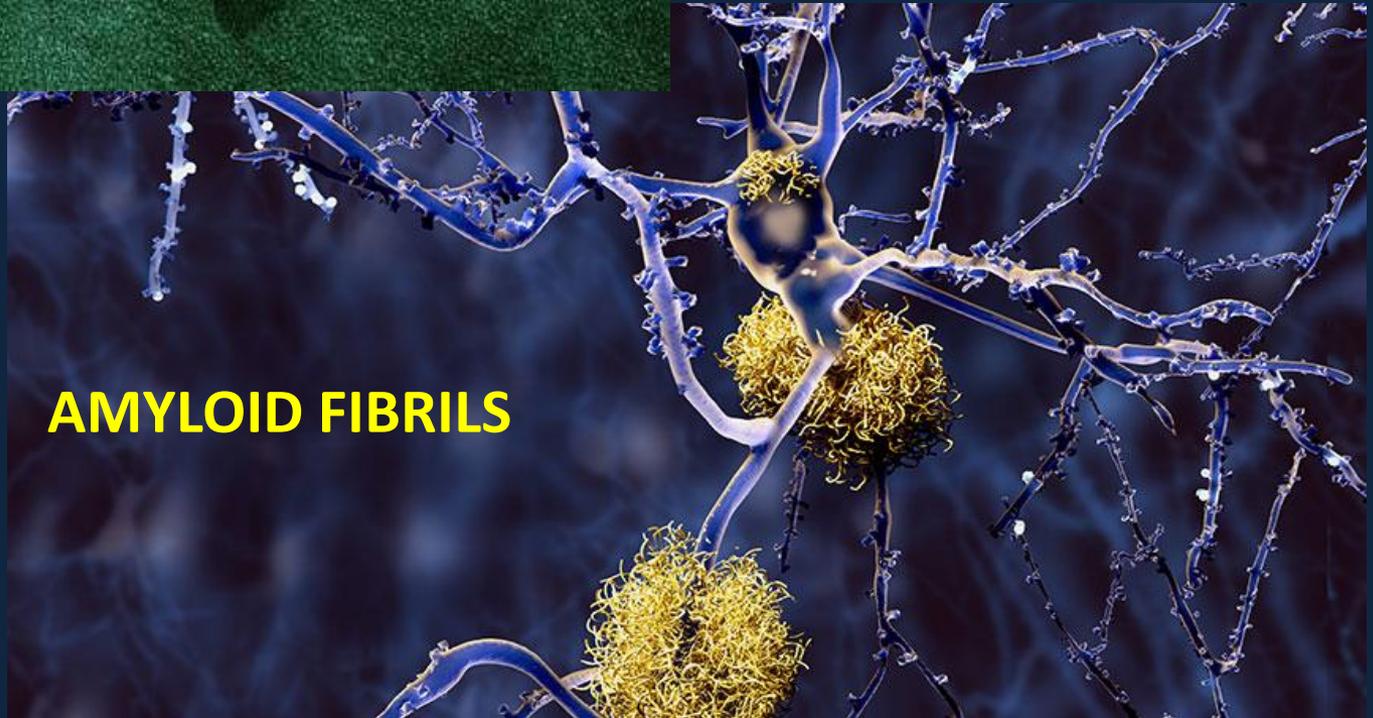
Corso di Proprietà di Biopolimeri

Prof. Ranieri URBANI

Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche
e-mail: rurbani@units.it

a.a. 2022-2023

AMYLOID FIBRILS



x

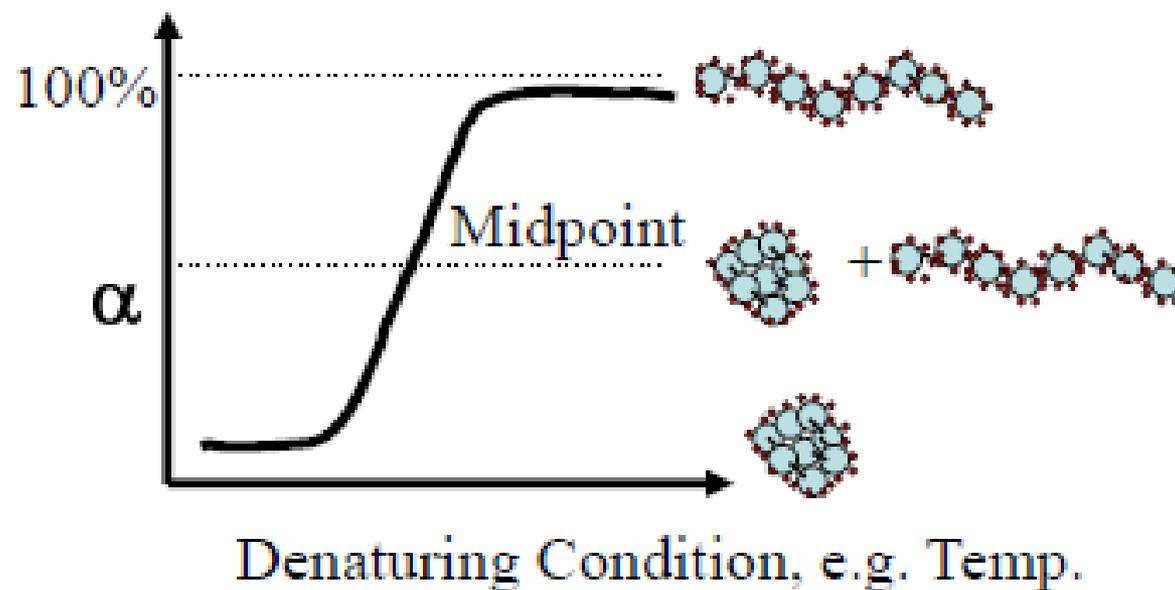
Folding e Misfolding delle proteine

- **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

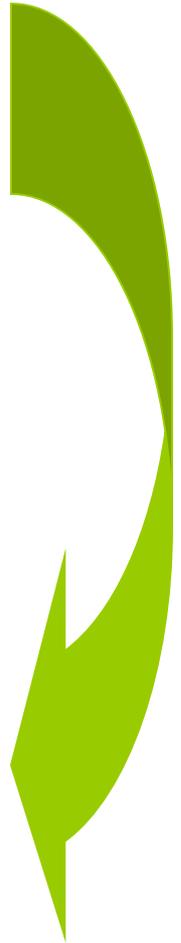
Esposizione di regioni idrofobiche o che si ripiegano lentamente

Instabilità delle proteine nell'ambiente cellulare

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

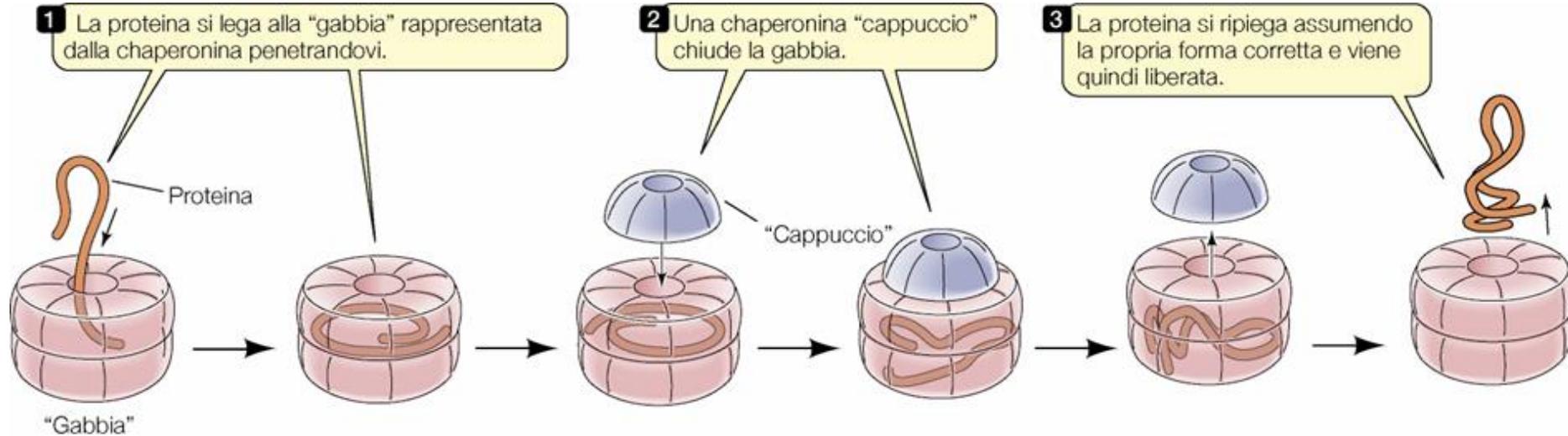
Esposizione ad agenti tossici ambientali:
radicali dell'O₂, metalli pesanti, alcuni antibiotici...

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



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)

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.

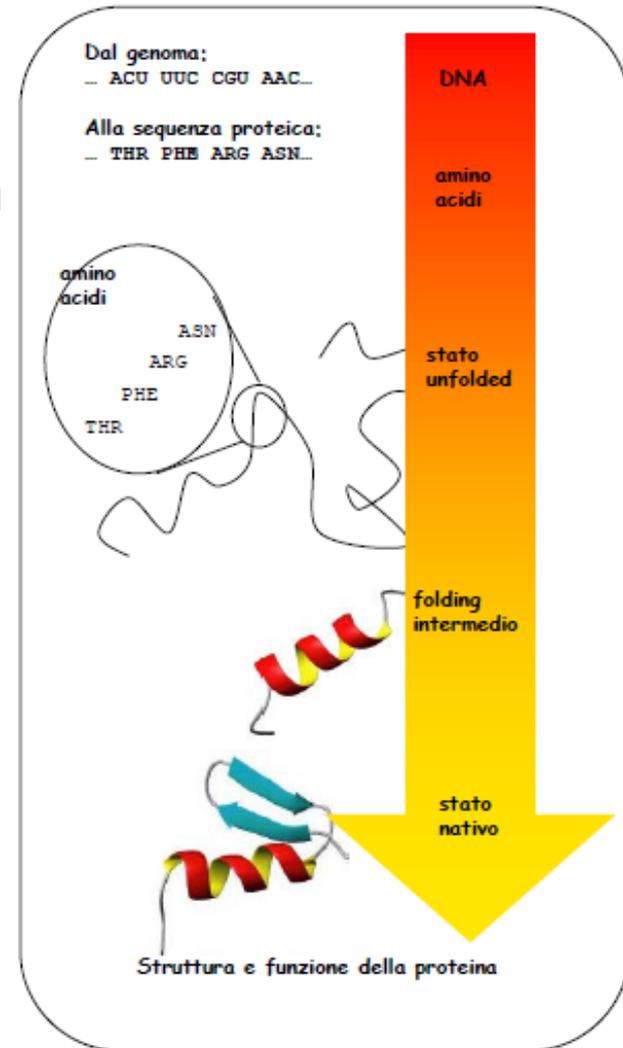
Tutte le funzioni vitali dipendono dalle proteine e, come noto, l'alterazione della struttura di una proteina porta ad una alterazione o perdita della funzione specifica, come avviene nelle malattie genetiche

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

Questo processo di "strutturazione" delle proteine (detto *folding*) 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 *folding* di una proteina, infatti, può provocare delle malattie di tipo degenerativo



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 distrutte. |

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

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.

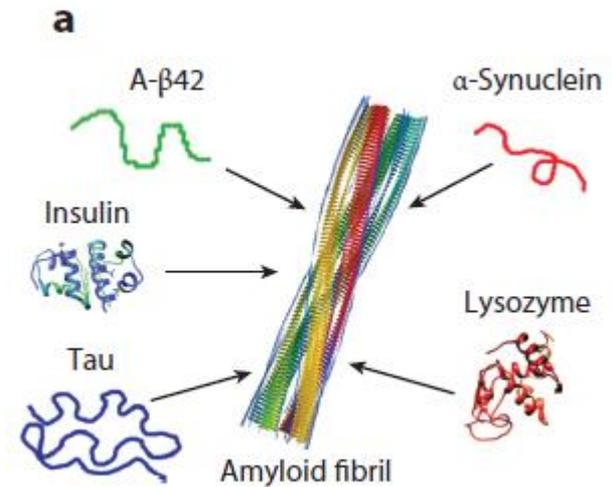
La comprensione del modo in cui peptidi e proteine normalmente solubili si aggregano per formare **fibrille amiloidi** è fondamentale per molte aree della moderna scienza biomolecolare, che spaziano dallo sviluppo di **biomateriali funzionali** alla progettazione di **strategie terapeutiche** razionali contro condizioni mediche sempre più diffuse, come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson.

Per questo motivo, c'è una grande necessità di **sviluppare modelli** per descrivere meccanicisticamente come si formano le fibrille amiloidi a partire da peptidi e proteine precursori.

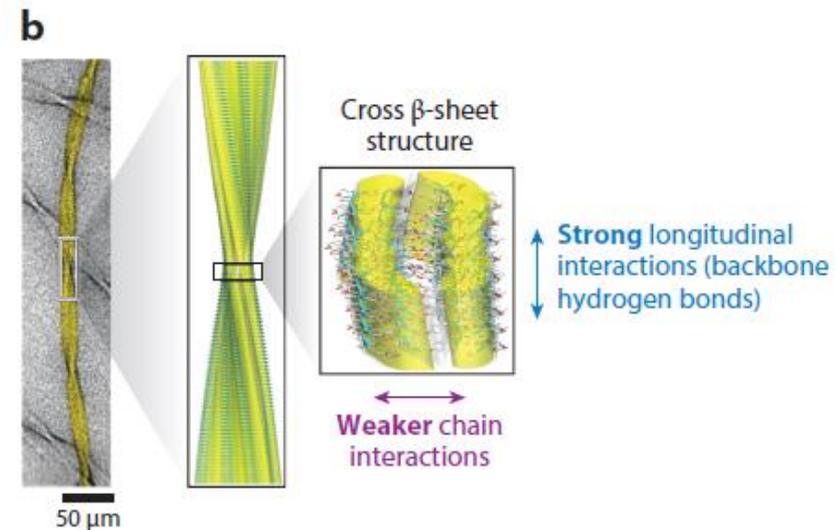
L'aggregazione di proteine e peptidi in fibrille amiloidi è un esempio molto comune di «**self-assembly**», molecolare e lineare.

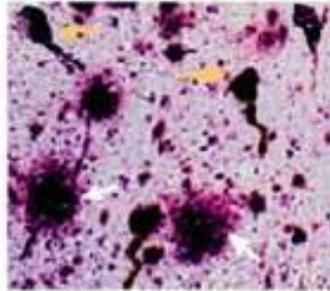
Un gran numero di peptidi e di proteine con sequenze e pieghe strutturali molto diverse possono aggregarsi in fibrille amiloidi che possiedono una struttura caratteristica comune ricca di **foglietti β**

(a) Natura generica della formazione delle fibrille amiloidi.

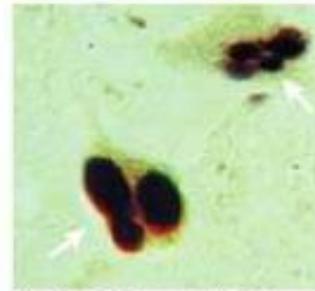


(b) Struttura gerarchica di un polimorfo delle fibrille amiloidi formate da un frammento di 11 residui di transtiretina (TTR), determinata con la microscopia crioelettronica.

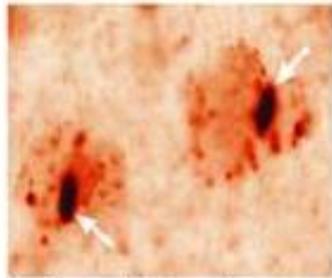




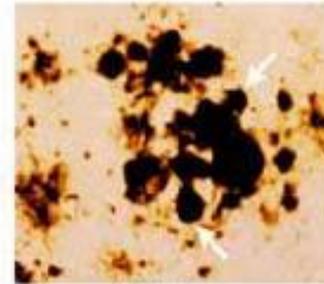
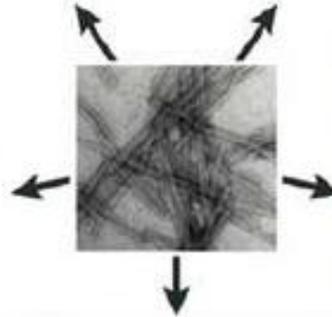
Alzheimer's plaques and tangles



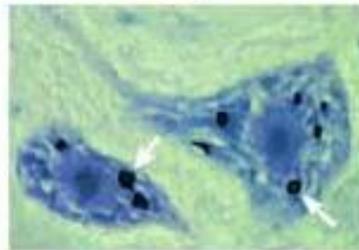
Parkinson's Lewy bodies



Huntington's intranuclear inclusions



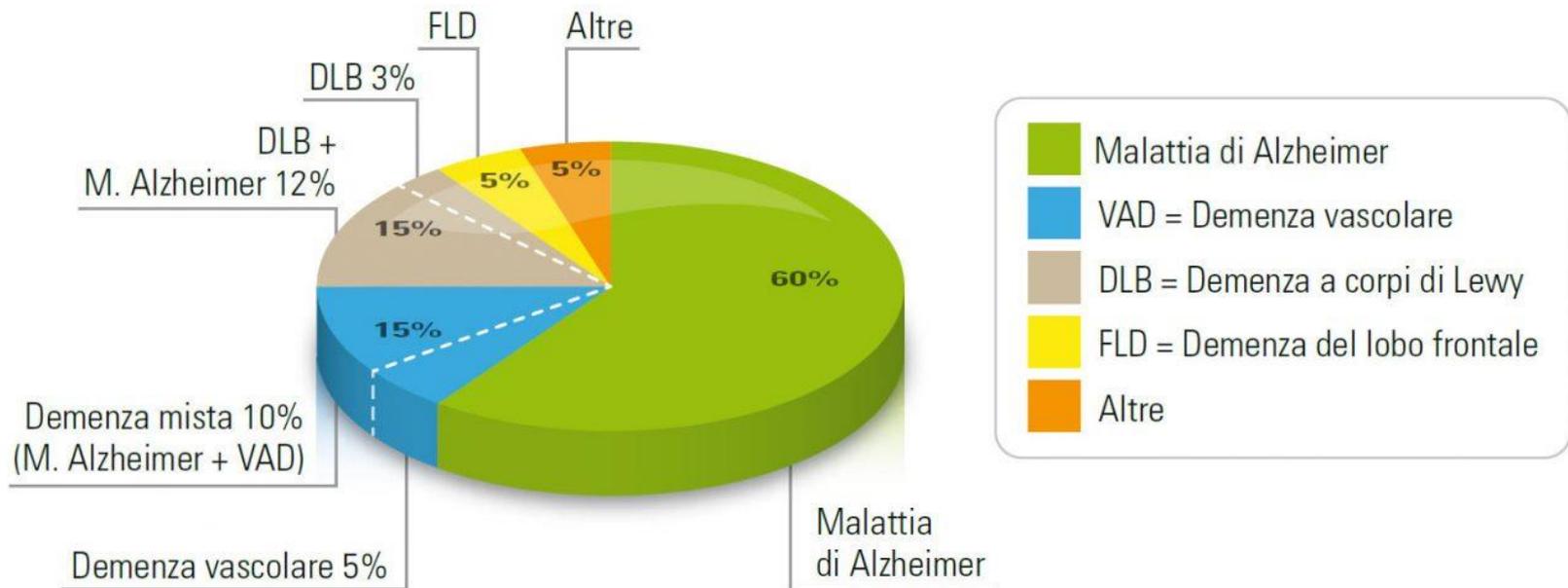
Prion amyloid plaques



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



Le domande che sorgono sono:

- Perché le proteine o i peptidi si auto-assemblano in fibrille amiloidi?
- Attraverso quali meccanismi molecolari lo fanno?
- Quali di questi meccanismi molecolari causano tossicità o coinvolgono specie tossiche?
- Come possiamo per scopi terapeutici interferire con l'aggregazione amiloide per prevenire o sopprimere la tossicità associata?

Perché è importante chiarire i meccanismi molecolari della formazione delle fibrille amiloidi?

La formazione di fibrille amiloidi è ritenuta un evento cruciale nella patologia di una serie di malattie devastanti e attualmente incurabili.

Attualmente ci sono più di 50 condizioni che sono associate allo stato amiloide, tra cui:

- la sindrome di Alzheimer (associata all'aggregazione dell'amiloide- β), che è attualmente tra le principali cause di morte nel mondo occidentale
- la sindrome di Parkinson (α -sinucleina)
- il diabete di tipo 2 (amilina)
- l'anemia falciforme (emoglobina)
- le malattie da prioni (proteina prionica)

Sebbene le fibrille amiloidi siano state scoperte per la prima volta nel contesto patologico, **lo stato amiloide è coinvolto in molti processi biologici funzionali e può contribuire alla normale fisiologia di cellule e tessuti.**

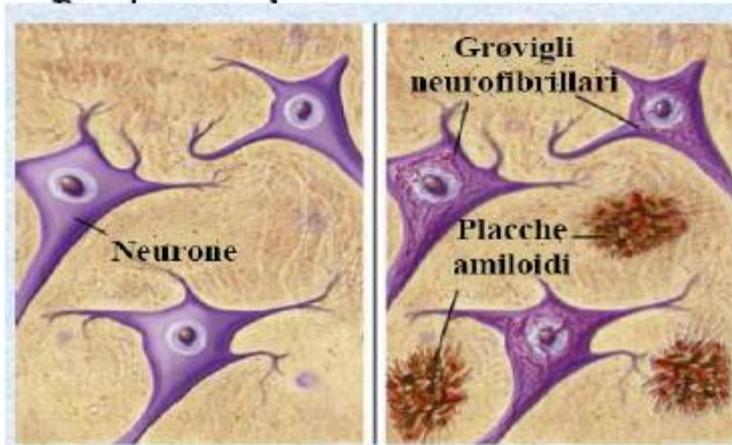
Esempi importanti di **amiloidi funzionali** comprendono:

- una classe di **ormoni proteici** che vengono immagazzinati sotto forma di strutture amiloidi nei granuli secretori del sistema endocrino
- i **prioni fungini** e la proteina amiloide Pmel17, che svolge un ruolo nella pigmentazione della pelle dei mammiferi
- le **fibre di curli** sulla superficie di *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*; nei batteri, dove costituiscono una componente proteica importante dei **biofilm batterici** e quindi svolgono un ruolo importante nell'adesione delle cellule ospiti, nell'invasione e nell'induzione dell'infiammazione dell'ospite
- gli amiloidi funzionali svolgono anche altri ruoli, come la protezione delle superfici di alcuni organismi, compresi i **funghi** (grazie alle idrofobine), **l'embrione della tarma della seta** e le **uova di pesce**, attraverso l'effetto idrofobico
- grazie alle loro proprietà uniche dei materiali, le fibrille amiloidi sono ampiamente utilizzate come **biomateriali per le nanotecnologie** con varie applicazioni interdisciplinari, come ad esempio nella scienza dell'alimentazione.

MALATTIE NEURODEGENERATIVE



- Morbo di Parkinson
- Morbo di Alzheimer
- Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE)
 - Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)
 - new-variant Creutzfeldt-Jakob (nvCJD) disease



Agente infettivo:

PROTEINA

The Structure of Mammalian Prions and Their Aggregates

un **prione** può essere definito in senso stretto come una proteina infettiva

ed è una forma modificata di una normale proteina chiamata **PrPc**.

La PrPc è una glicoproteina

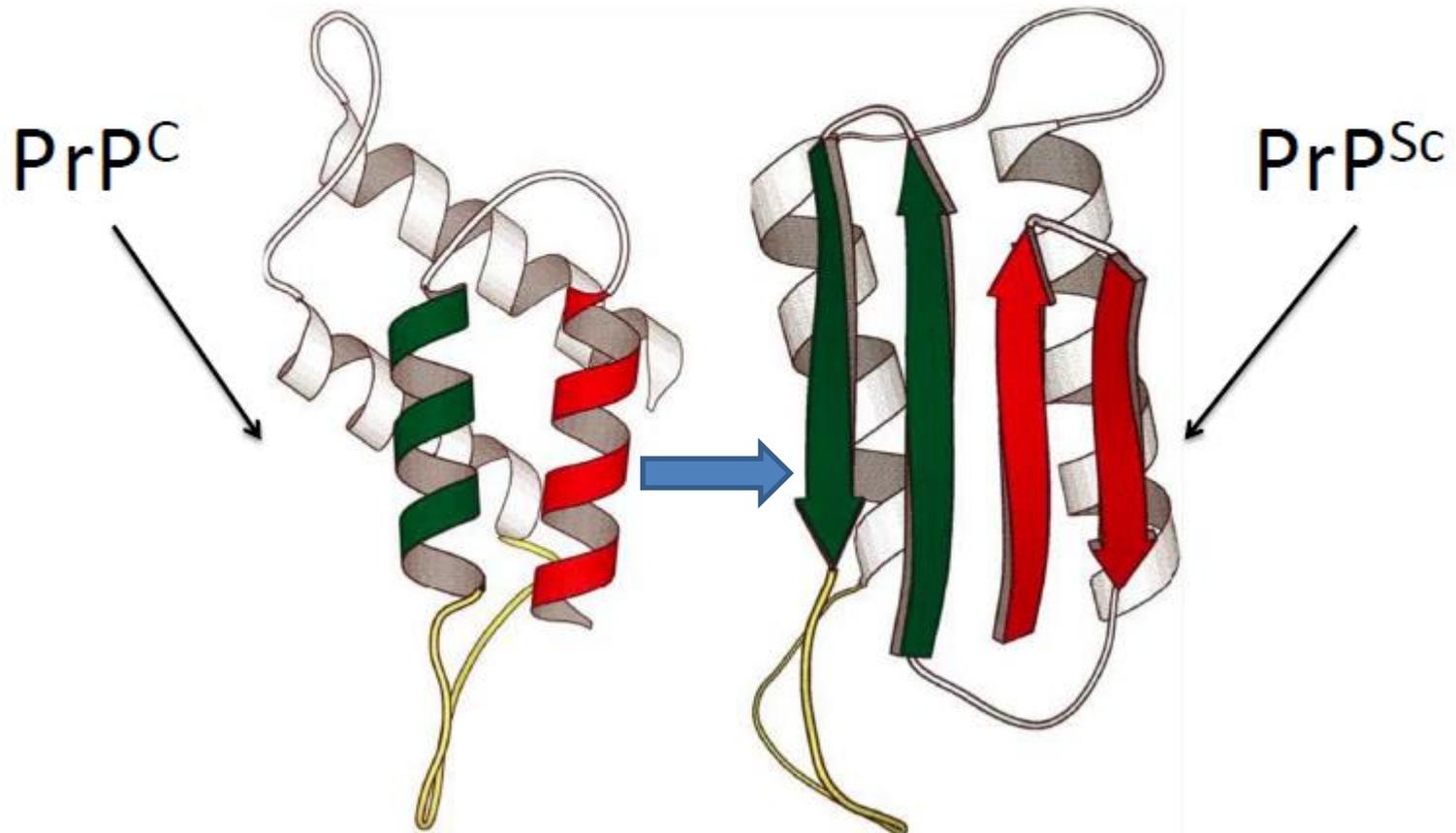
Dove si trova ?

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.

Misfolding prionico

Le malattie da prioni sono patologie neurodegenerative trasmissibili che colpiscono l'uomo e un'ampia gamma di specie animali. La patogenesi delle malattie da prioni è associata all'accumulo di aggregati di conformeri mal ripiegati (PrP^{Sc}) della proteina prionica cellulare codificata dall'ospite (PrP^{C}).

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



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

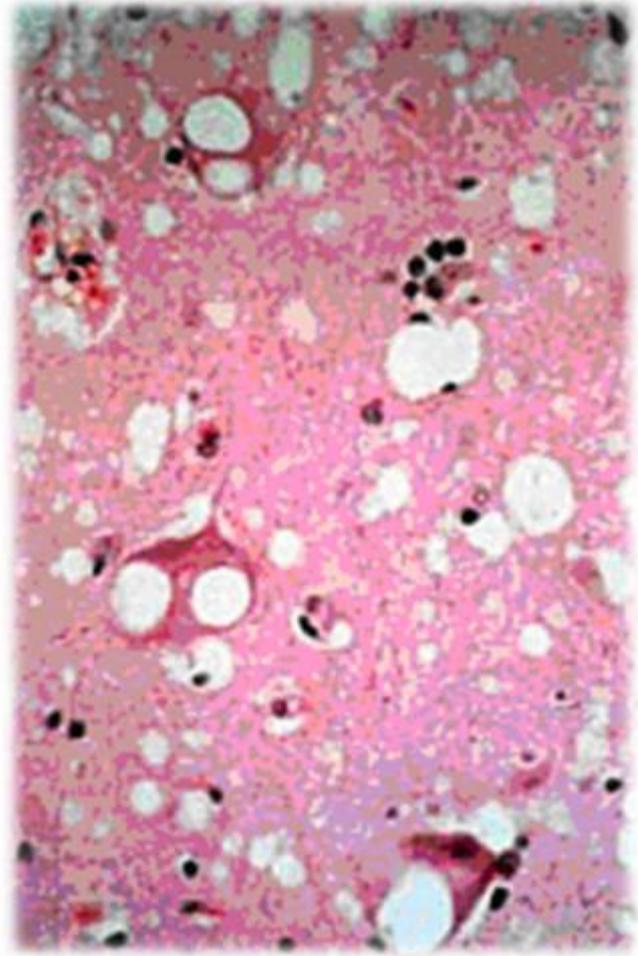
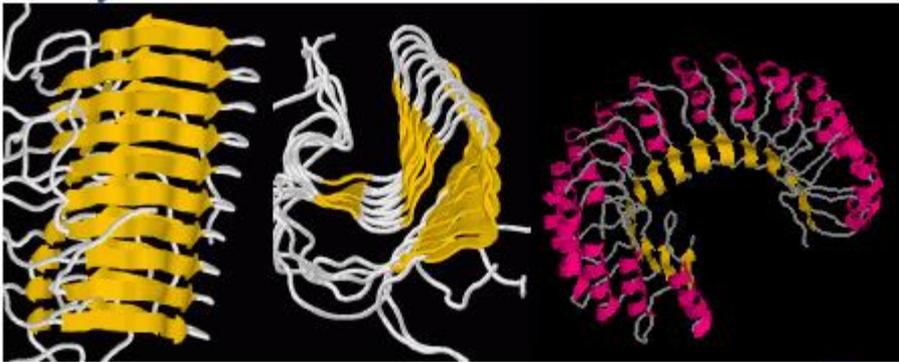
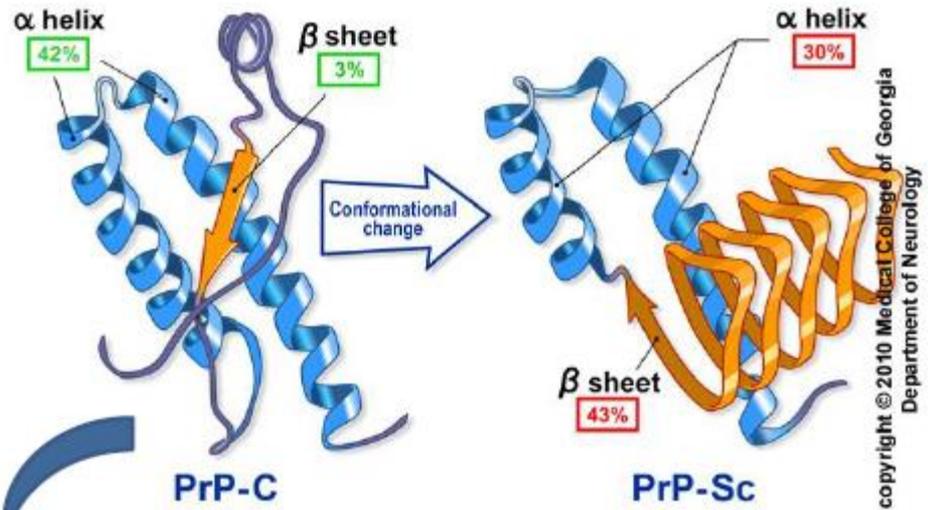
Sensibile



proteasi
calore
sostanze alchilanti
solventi organici



Resistente



Vertical line on the right side of the slide.

PrP^{Sc} è stato il **primo prione** identificato (1982) ed è stato isolato come il componente principale del materiale proteico infettivo presente nei cervelli di criceti siriani infettati da scrapie, una malattia neurodegenerativa letale e trasmissibile.

Da allora, molti altri prioni sono stati identificati in lieviti, funghi filamentosi e altri organismi, ma questi prioni non sono correlati alla malattia, né hanno alcun tipo di relazione evolutiva con la proteina prionica.

PrP^{Sc} è l'**agente causale delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE)** un gruppo di malattie neurodegenerative fatali che, tra le altre, includono la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) e Kuru, che entrambi colpiscono gli esseri umani, l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), la scrapie, che colpisce pecore e capre.

In tutti i casi, dopo aver devastato il cervello in cui è ospitato, da meccanismi ancora poco conosciuti, **PrP^{Sc}** ha il **potenziale di trasmettersi** ad altri individui della stessa specie, o anche di altre specie.

Come può una proteina essere infettiva? La caratteristica chiave del classico agente contagioso è che si riproduce, e quindi, si moltiplica, all'interno del loro ospite perché portano con sé un bagaglio genetico che può essere copiato.

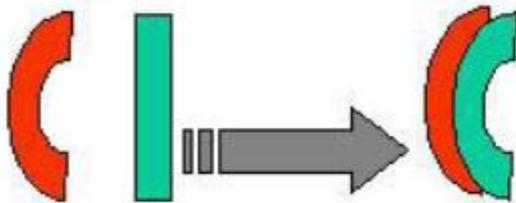
In contrasto con gli acidi nucleici, la cui propagazione comporta la riproduzione della loro struttura primaria, la propagazione dei prioni comporta la riproduzione della loro struttura secondaria, terziaria e quaternaria, cioè la loro conformazione

«Proteine infettive»: il contagio conformazionale

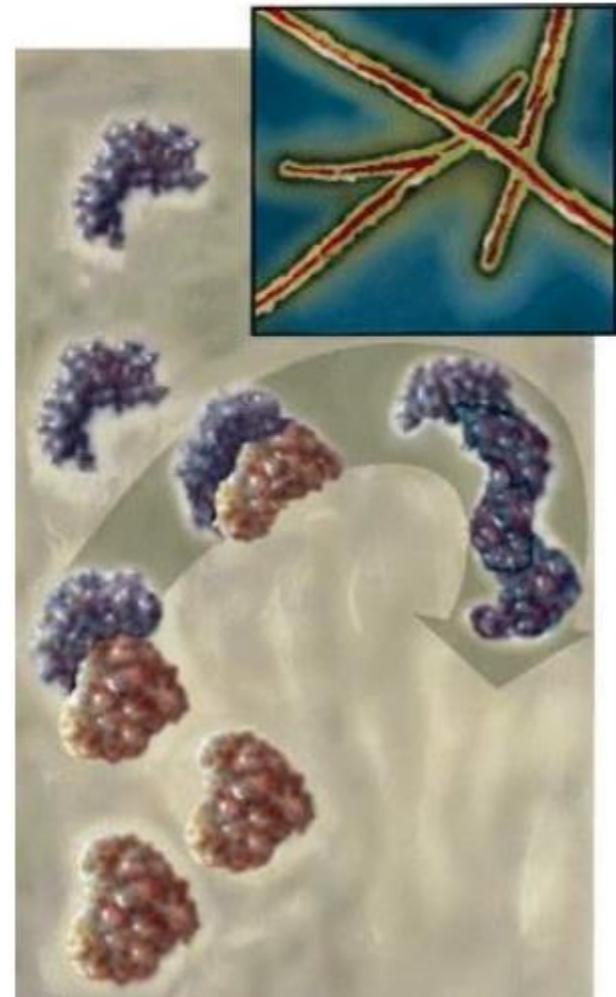
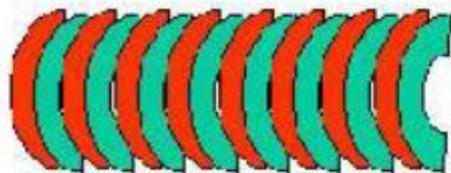
| forma del prione | forma della proteina normale |
|------------------|------------------------------|
|------------------|------------------------------|

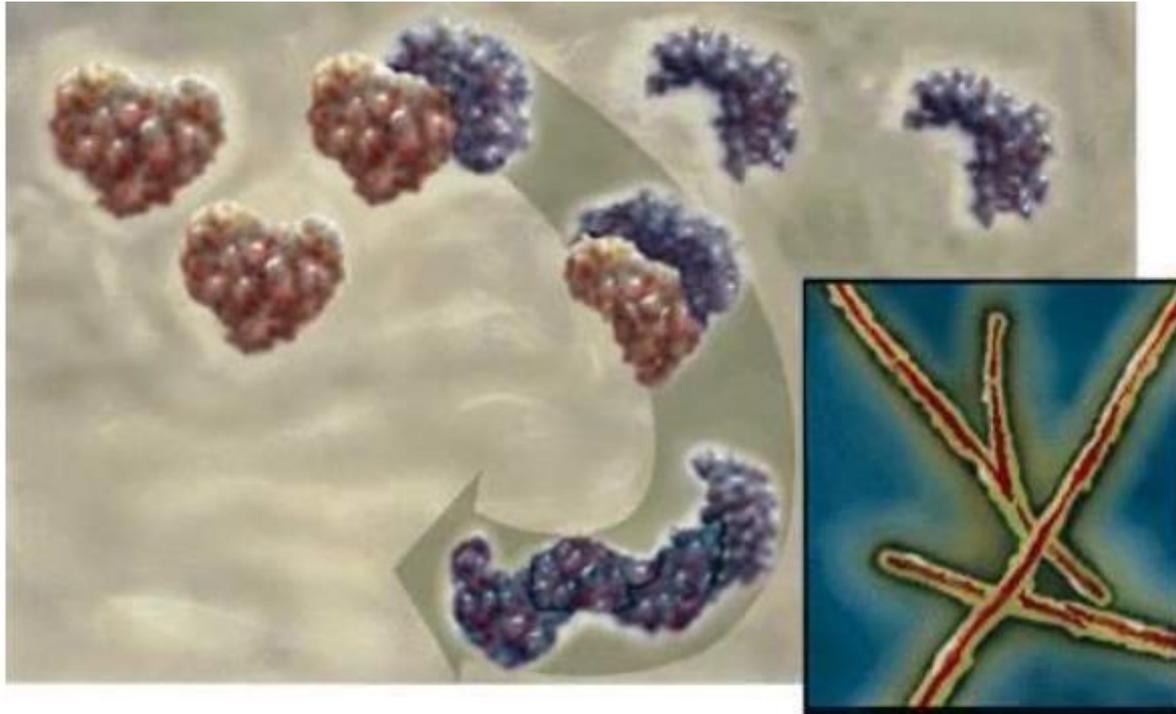


Quando il prione entra in contatto con la proteina normale, questa assume la stessa forma del prione:

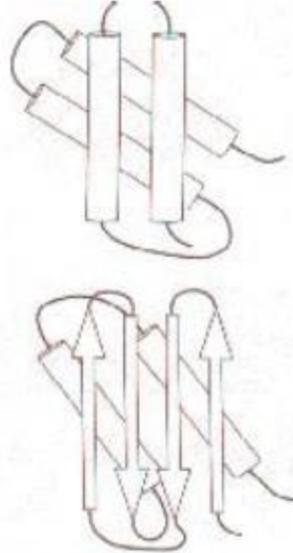


Nelle cellule infette da prioni si innesca un processo a catena che provoca gravi lesioni:





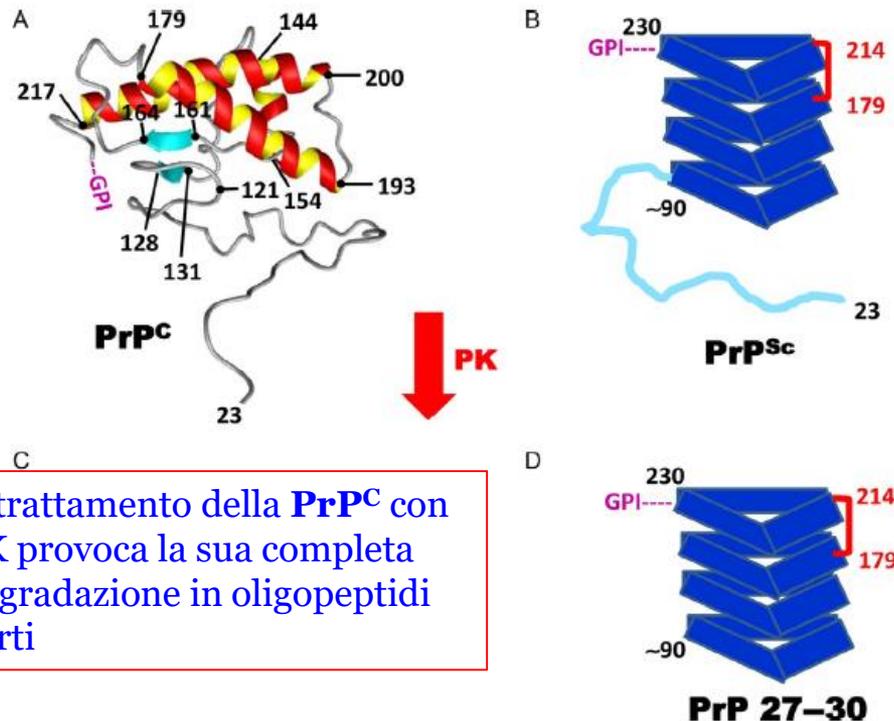
Il Prione esiste in due forme. Quella normale, innocua (PrPc), può cambiare la sua forma e diventare patogena (PrPSc). La conversione da PrPc a PrPSc procede poi con una reazione a catena. Quando viene raggiunta una concentrazione sufficiente di proteine PrPSc, queste si aggregano a formare un lungo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



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

La resistenza alla proteasi, l'insolubilità e l'aggregazione sono tre caratteristiche molecolari di PrP^{Sc} che la distinguono dalla PrP^C nativa.

La resistenza parziale alla **proteinasasi K** (PK) è stata la base dei **test** effettuati per identificare la PrP^{Sc} negli omogenati cerebrali di bovini sottoposti a programmi di sorveglianza durante la crisi europea della BSE o "morbo della mucca pazza" negli anni ottanta e novanta.



Il trattamento della PrP^C con PK provoca la sua completa degradazione in oligopeptidi corti

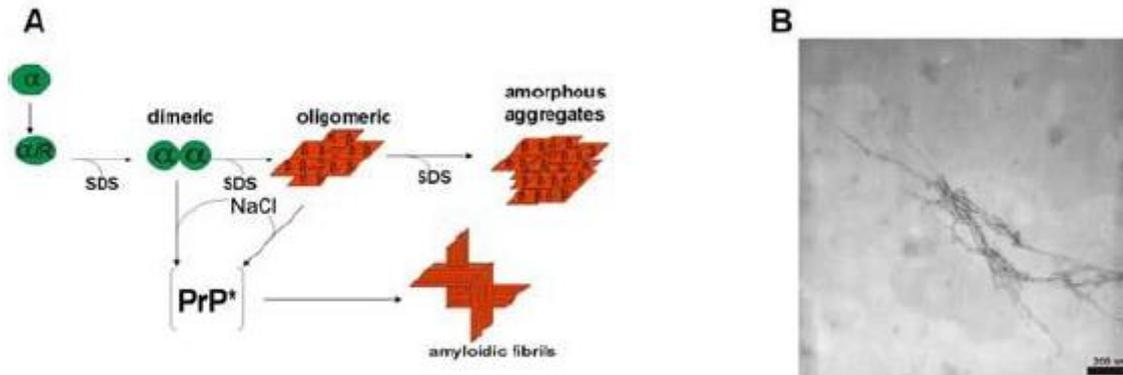
Nel **PrP^C** il dominio folded è dominato da tre α -eliche, dei residui 144-154, 179-193 e 200-217, e contiene anche due β filamenti corti dei residui 128-131 e 161-164.

Nel **PrP^{Sc}** esistono ancora due domini, una coda N-terminale leggermente più corta e *unfolded*, fino circa alla posizione 90 e una parte compatta β a quattro spire dalla posizione 90 fino al terminale C.

Le tre α -eliche, i β filamenti corti, i *loops* e parte della coda N-terminale che sono presenti in **PrP^C**, sono stati completamente ristrutturati (B).

Sperimentalmente, la PrP^{Sc} è trattata ad una concentrazione di PK di 20–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per 1 ora a 37°C.

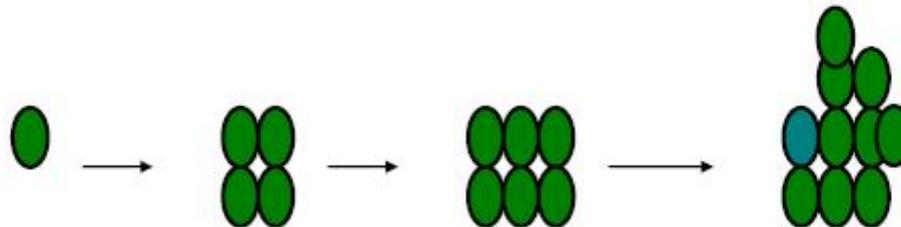
Al contrario, il trattamento di **PrP^{Sc}** con PK provoca la distruzione del dominio N-terminale, mentre il terminale C è conservato (frammento PrP 27-30 PK resistente)



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.

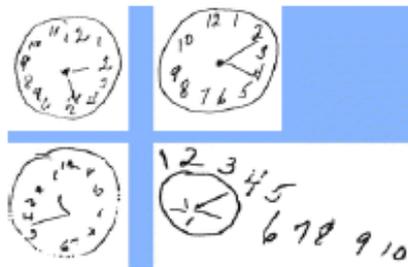
Questo tempo è anche il tempo di latenza o di incubazione della malattia variabile da specie a specie



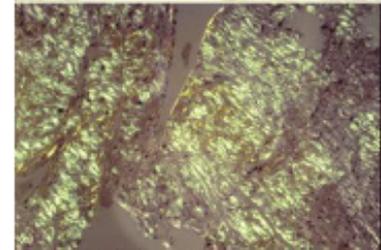
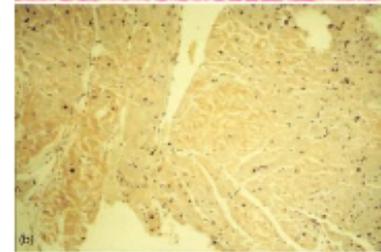
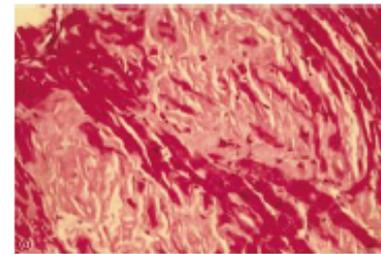
Alzheimer

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

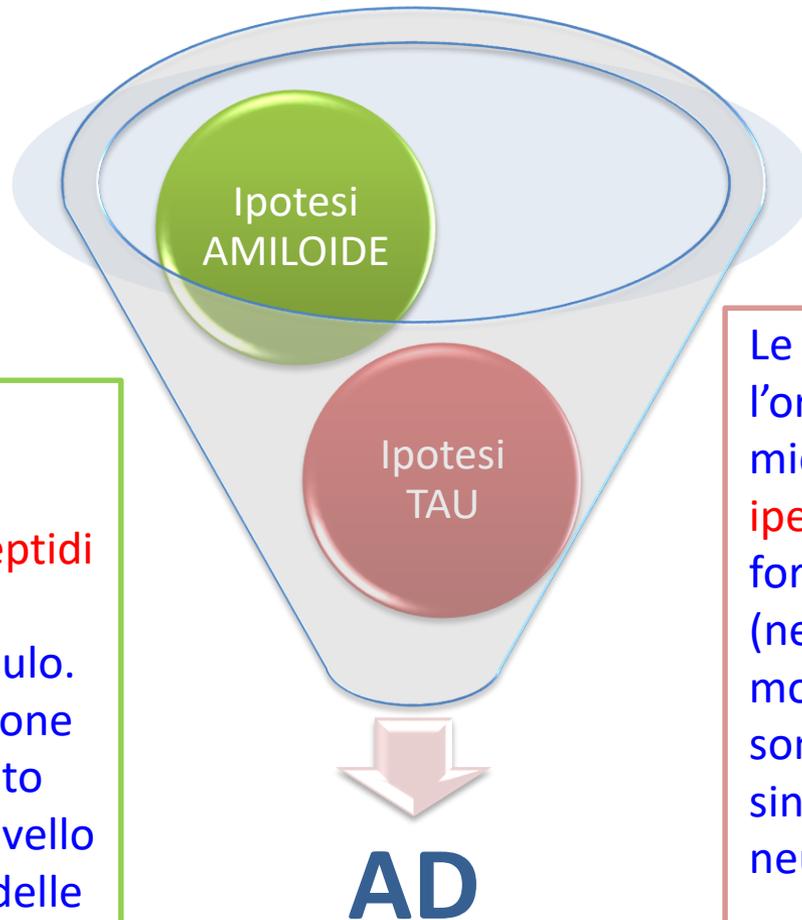
Tempo di sviluppo: circa 8 anni dopo la diagnosi.



Diagnosi per mezzo di test neuropsicologici

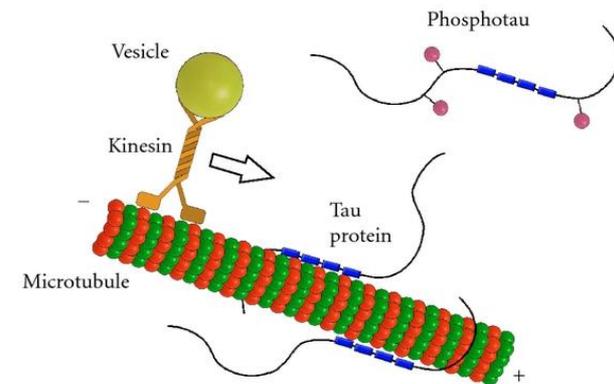


Prove istologiche (*post mortem*) nel cervello: depositi di placche amiloidi (*in vivo* con PET)



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

Axonal traffic defect

Inflammation

A β aggregation
oligomer
amyloid fibril formation

Senile plaque
Cerebrovascular amyloid

A β amyloidosis

Tau aggregation
PHF formation
NFT formation
Propagation

ApoE4
Microglia
TREM2

Neuronal / Synaptic dysfunction
Neuronal loss

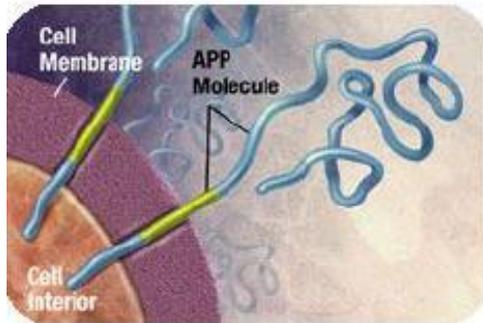
Dementia

Tauopathy

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).

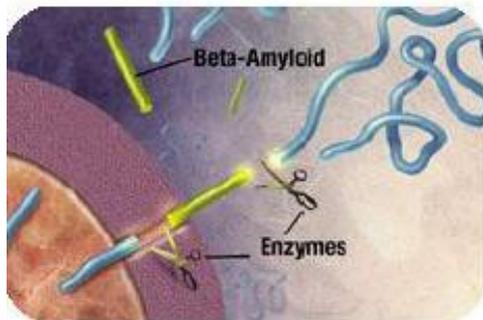
X

BETA AMILOIDE

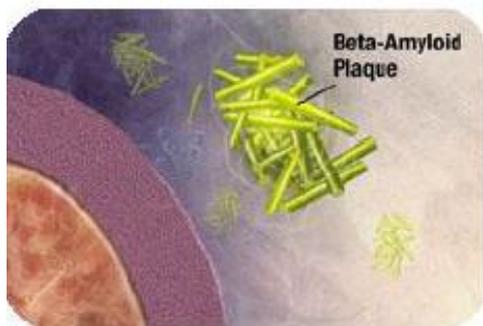


La proteina precursore dell'amiloide (APP):

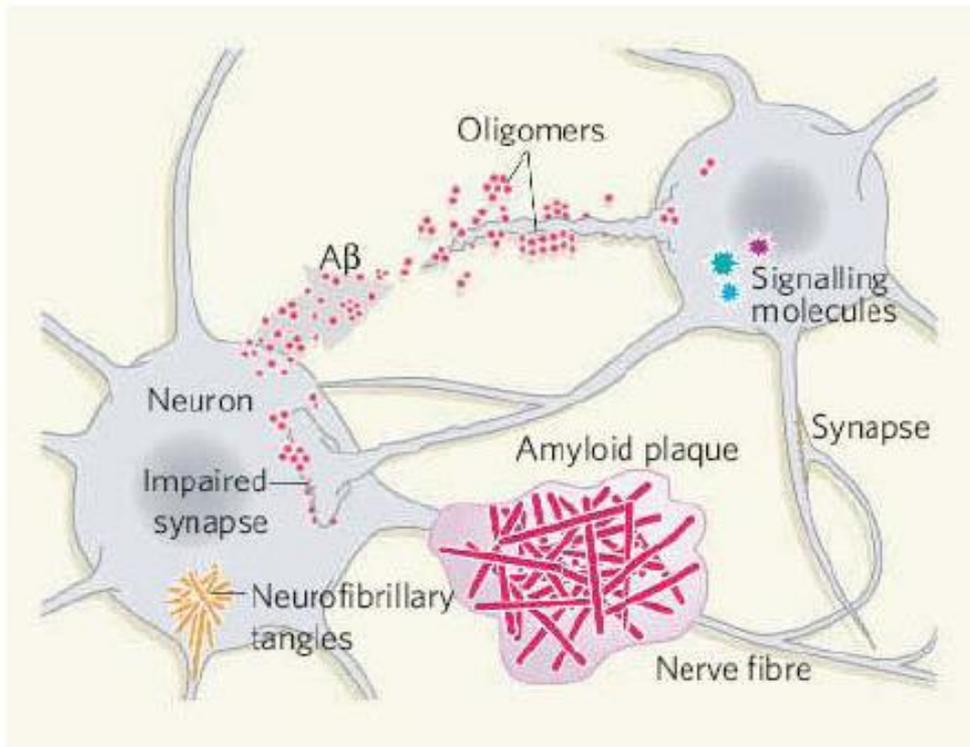
1. si attacca alla membrana Neuronale



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

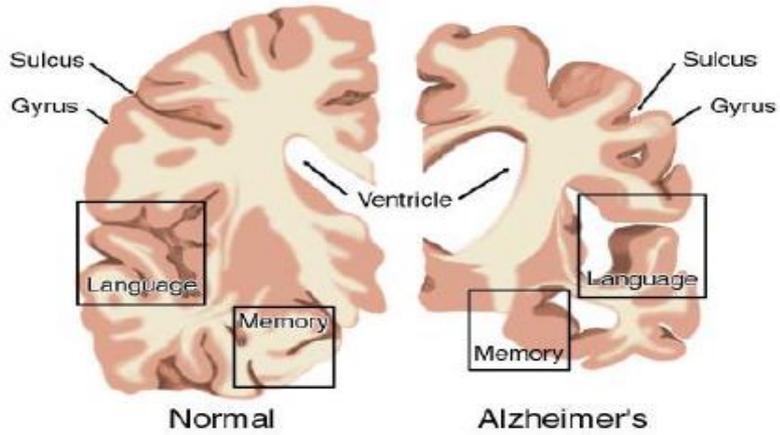


3. I frammenti di beta amiloide si uniscono a formare placche che si depositano al di fuori ed intorno ai neuroni.



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



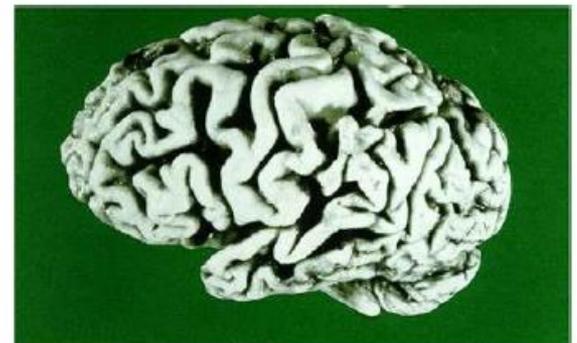
A normal human brain section



An Alzheimer's brain section



Cervello normale



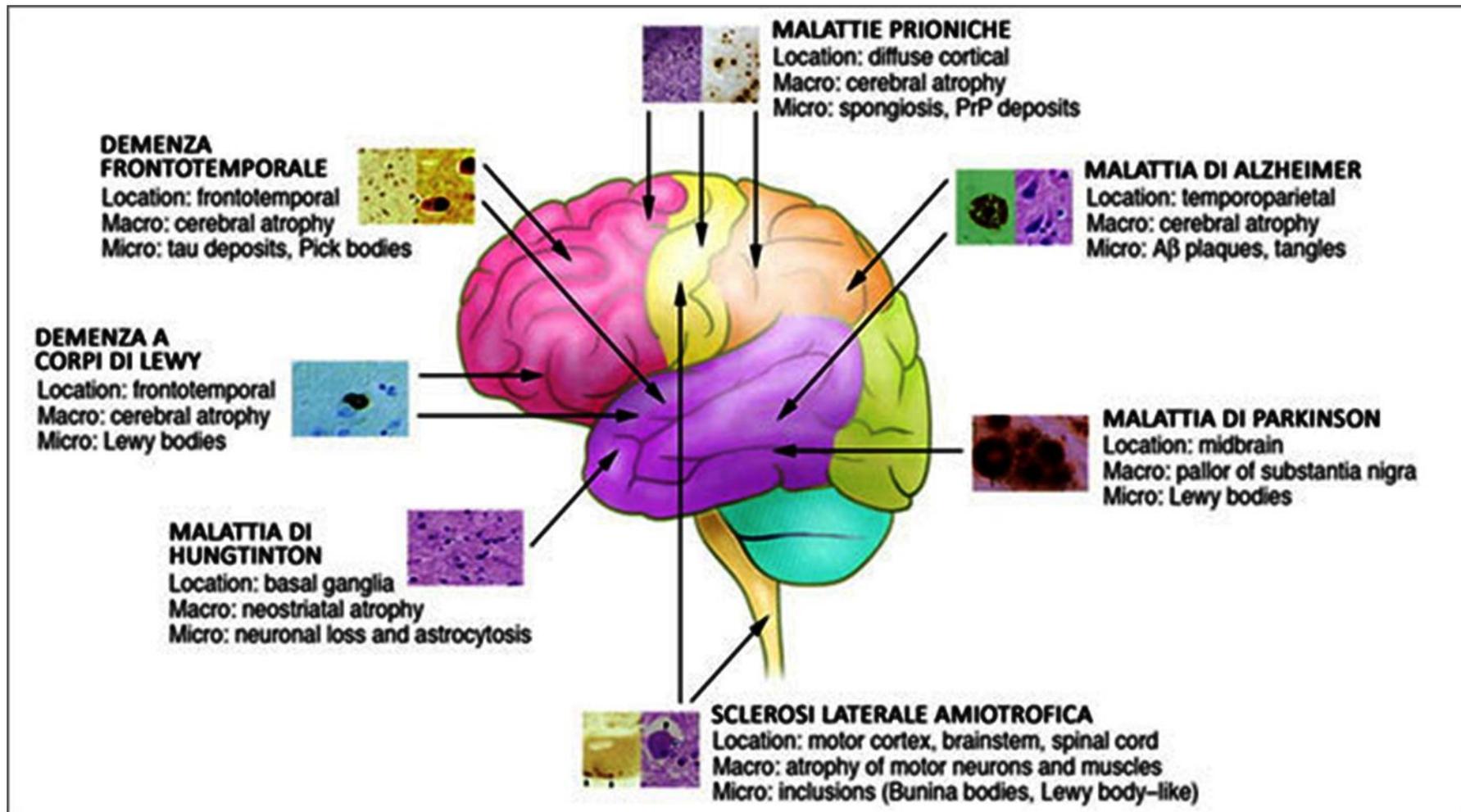
Cervello Alzheimer atrofico

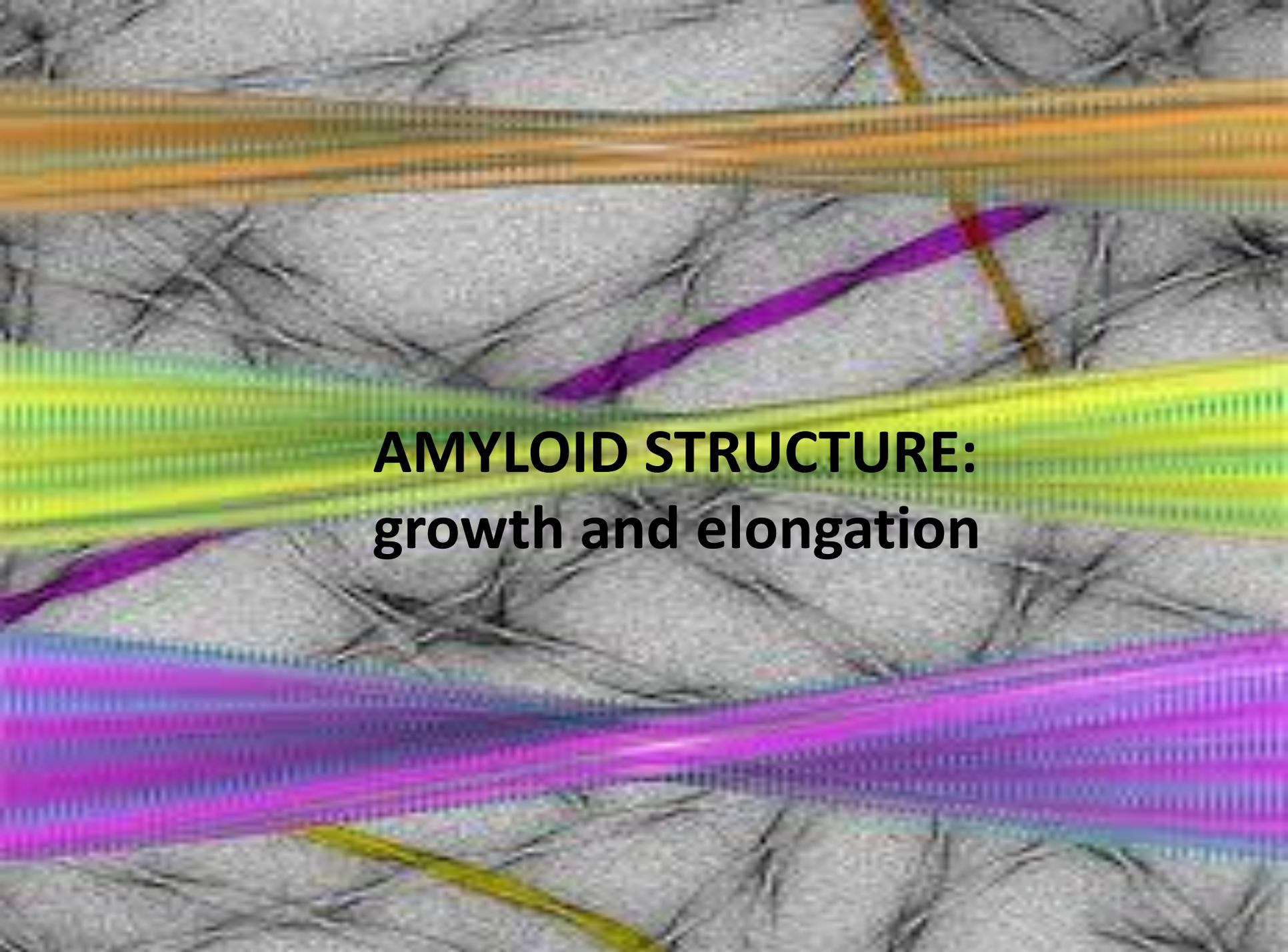
Nella malattia di Alzheimer, il peptide β -amiloide è considerato il responsabile della formazione delle placche extracellulari e le sue proprietà fibrillogeniche sembrano essere associate alla conversione strutturale da α -elica a foglietto β .

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 displays a complex network of fibers, likely representing amyloid structure. The fibers are primarily grey and form a dense, interconnected mesh. Several prominent, brightly colored fibers are visible: a thick yellow fiber at the top, a purple fiber extending diagonally from the center, a green fiber below it, and a magenta fiber at the bottom. These colored fibers appear to be growing or elongating within the grey network. The overall texture is fibrous and somewhat chaotic, with the colored fibers providing a clear contrast to the background.

**AMYLOID STRUCTURE:
growth and elongation**

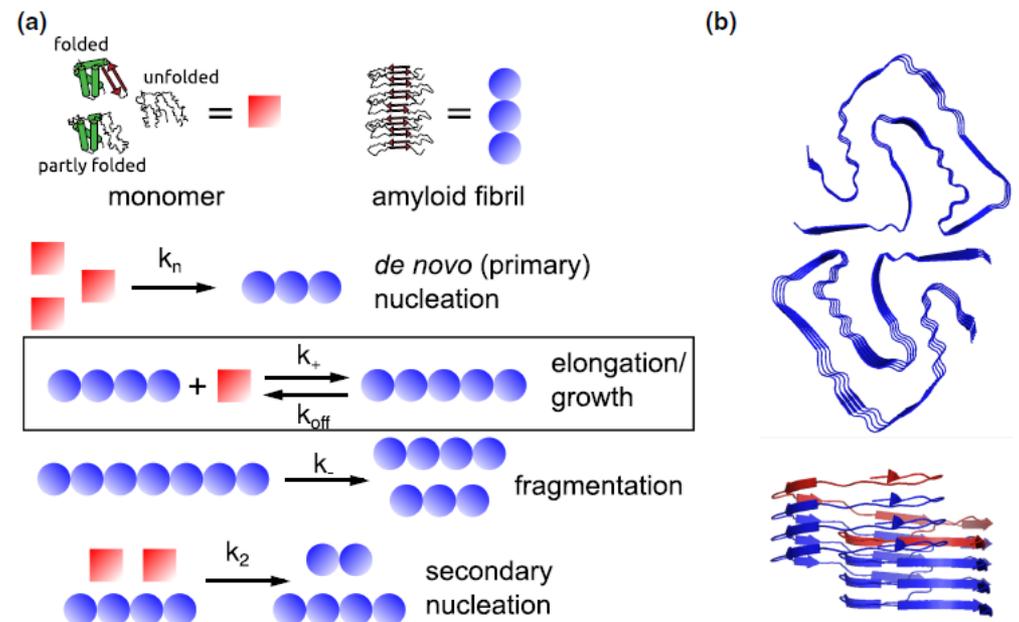
La formazione delle fibrille amiloidi è un processo a più fasi, che comprende:

1. **Nucleazione**
2. **Crescita**
3. **Proliferazione.**

È di interesse capire **come** e **perché** le prime fibrille danno nucleazione in date condizioni e come proliferano attraverso processi secondari.

La morfologia delle fibrille amiloidi con un **rapporto lunghezza/larghezza fino a 1000 e oltre**, sottolinea l'importanza dello studio della crescita delle fibrille dalla proteina monomeric a proteina fibrillare.

L'accrescimento della fibrilla amiloide, l'aggiunta di un blocco di monomero ad una fibrilla, determina il fenomeno del misfolding: la proteina monomeric all'interno della fibrilla adotta una conformazione non nativa in cui deve "ripiegarsi in modo errato (misfolding)"



STABILITA' TERMODINAMICA DELLE FORME AMILOIDI

Differenza di energia libera tra la forma monomerica e quella fibrillare di una serie di sistemi polipeptidici

- brevi peptidi (GNNQQNY, TTR₍₁₀₅₋₁₁₅₎)
- sistemi modello (il dominio PI3-SH3)
- proteine o frammenti di proteine associate a malattie umane (la β 2-sinucleina, l'insulina, il lisozima, l'amiloide A β (1-40), β 2-microglobulina)

selezionate per rappresentare una varietà di caratteristiche diverse in termini di sequenza e struttura dello stato monomero.

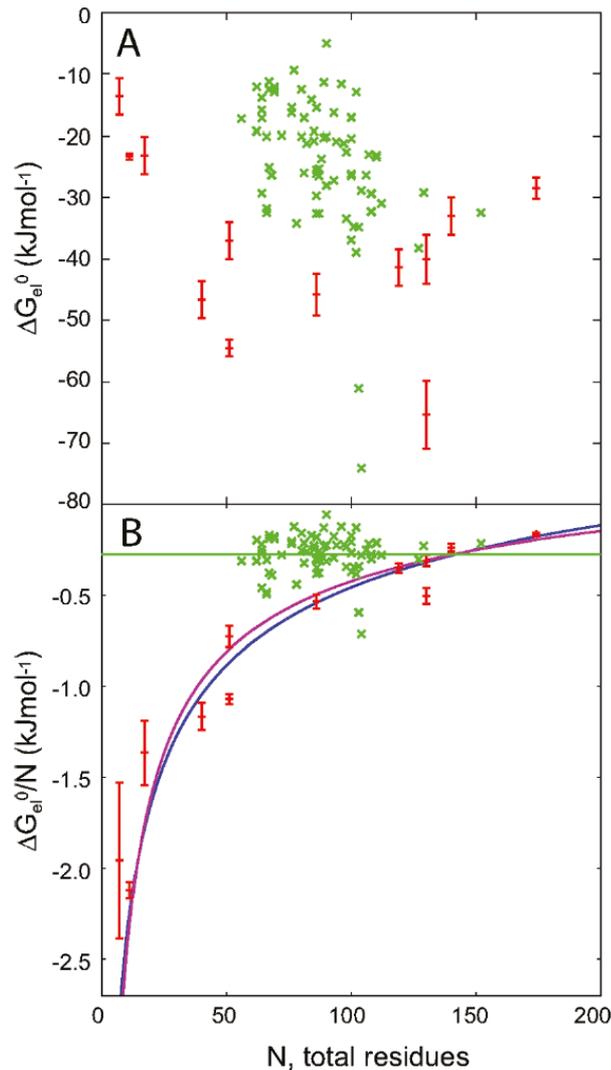
Journal of the American Chemical Society

COMMUNICATION

Table 1. Thermodynamic Stabilities of Amyloid Forms of the Peptides and Proteins Analyzed in This Work (See Supporting Information S6)^a

| system | abbreviation | no. of residues | ΔG_{el}^0 (kJ mol ⁻¹) | $\Delta G_{el}^0/N$ (kJ mol ⁻¹) | pH |
|-------------------------------|--------------|-----------------|---|---|----|
| GNNQQNY | GNN | 7 | -13.7 ± 3.0 | -2.0 | 7 |
| TTR ₍₁₀₅₋₁₁₅₎ | TTR | 11 | -23.3 ± 0.5 | -2.12 | 2 |
| TTR ₍₁₀₅₋₁₁₅₎ RGD | TTRRGD | 17 | -23.2 ± 3.0 | -1.36 | 2 |
| A β (1-40) | AB(1-40) | 40 | -46.7 ^b | -1.17 | 7 |
| A β (1-40)F20P | AB(1-40)F20P | 40 | -35.0 ^b | -0.88 | 7 |
| bovine insulin | Ins2 | 51 | -54.5 ± 1.4 | -1.1 | 2 |
| bovine insulin | Ins7 | 51 | -37.0 ± 2.0 | -0.73 | 7 |
| bovine PI3-SH3 | SH3 | 86 | -38 ± 11 | -0.44 | 2 |
| human β 2-microglobulin | B2M | 119 | -41.4 ^c | -0.34 | 7 |
| human lysozyme | Lys2 | 130 | -65.0 ± 5.5 | -0.50 | 2 |
| human lysozyme | Lys7 | 130 | -40.0 ± 2.0 | -0.31 | 7 |
| human α -synuclein | Asyn | 140 | -33.0 ± 2.0 | -0.24 | 7 |
| human α B-crystallin | ABC | 174 | -28.5 ± 2.0 | -0.16 | 7 |

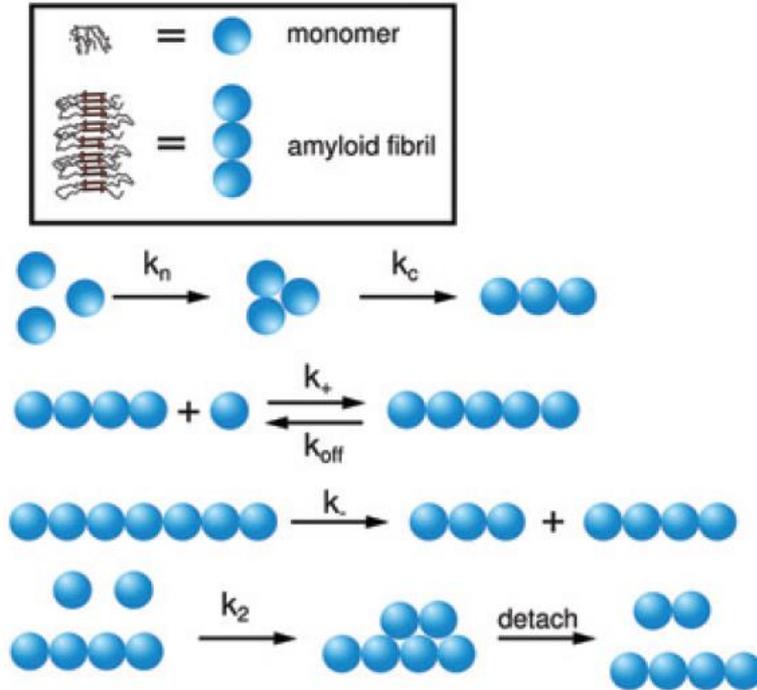
La differenza di energia libera tra lo stato solubile e quello fibrillare (in rosso) di una catena polipeptidica, nella maggior parte dei casi, supera la differenza di energia tra lo stato *unfolded* e quello nativo (in verde)



Una caratteristica interessante in Figura è che esiste una lunghezza di sequenza di circa **100 residui**, in corrispondenza della quale si osserva che le fibrille amiloidi hanno **massima stabilità** rispetto al corrispondente stato solubile.

Questi dati suggeriscono che, sebbene la lunghezza media delle proteine nel genoma umano è superiore a 400 residui, i peptidi e le proteine che sono comunemente implicati nella formazione di amiloidi **sono tutti molto più corti**, come il peptide IAPP nel diabete di tipo II (37 residui), il A β peptide nell'Alzheimer (42 residui), l' α -sinucleina nel morbo di Parkinson (140 residui).

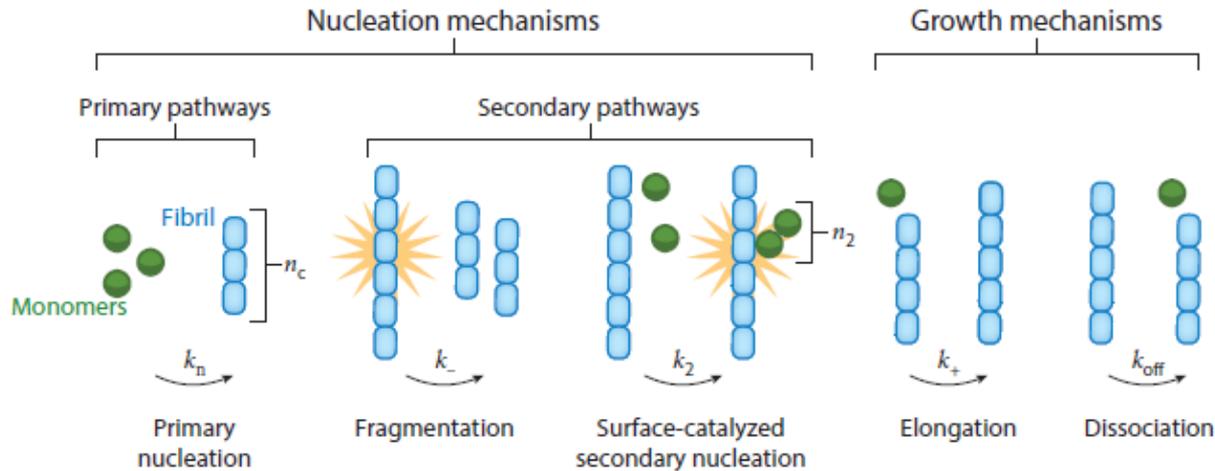
B



Una descrizione dettagliata della **cinetica della formazione dell'amiloide** non può essere descritta come una reazione con un unico meccanismo, ma consiste in un insieme di processi molecolari

I processi elementari coinvolti nella conversione di molecole proteiche solubili in fibrille amiloidi:

- **nucleazione** di un aggregato (k_n), che può essere seguita da fasi di conversione (k_c) per formare un amiloide di dimensioni minime.
- **accrescimenti** di fibrille per aggiunta di un monomero solubile (k_+) e il processo inverso, la dissociazione (k_{off}).
- **processi secondari** portano a un aumento del numero di fibrille amiloidi, la cui velocità dipende dalla concentrazione di fibrille esistenti. Esempi sono la **frammentazione** delle fibre (k_f) e la **nucleazione secondaria** monomero-dipendente (k_2), in cui il nucleo appena formato può staccarsi dal sito di nucleazione.



I diversi eventi elementari a livello molecolare che contribuiscono alla formazione complessiva degli aggregati amiloidi possono essere divisi a grandi linee in **due** categorie principali:

- 1) eventi che portano a un aumento della massa degli aggregati**
- 2) eventi che modificano il numero totale di aggregati.**

La prima categoria comprende **eventi di crescita**, come l'allungamento delle fibrille e la dissociazione dei monomeri. L'allungamento delle fibrille è tipicamente molto più veloce della dissociazione dei monomeri (con l'eccezione delle fasi finali dell'aggregazione).

La seconda categoria è responsabile della **formazione di nuovi aggregati (nuclei)**. In un sistema in cui coesistono monomeri e aggregati, esistono **tre modi** generali e fisicamente significativi di formare nuovi aggregati (nuclei).

- (a) direttamente dai monomeri in soluzione,
- (b) dalle sole fibrille,
- (c) da qualsiasi combinazione di monomeri e fibrille.

La chiave per comprendere la funzione di una proteina è la sua struttura.

Le proteine ripiegate erroneamente di solito vengono distrutte. Ma in molte malattie, fra cui quelle da prioni e quelle neurodegenerative come il morbo di Parkinson e l'Alzheimer, nei tessuti possono accumularsi placche o fibrili amiloidi - proteine errate che si aggregano in configurazioni caratteristiche.

Quando i precursori delle amiloidi e i prioni perdono la propria conformazione normale, acquisiscono la capacità di infettare i loro vicini. In questo modo, una dopo l'altra, le proteine assumono la forma sbagliata della prima.

I tentativi di sviluppare metodi per limitare questa tendenza si basano necessariamente sulla comprensione del meccanismo della propagazione.

Alla crescita e alla formazione delle fibre amiloidi è associata un'abbondanza di aggregati di piccole proteine (**oligomeri**) che costituiscono la "specie tossica" alla base delle malattie dovute alle fibre amiloidi.

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

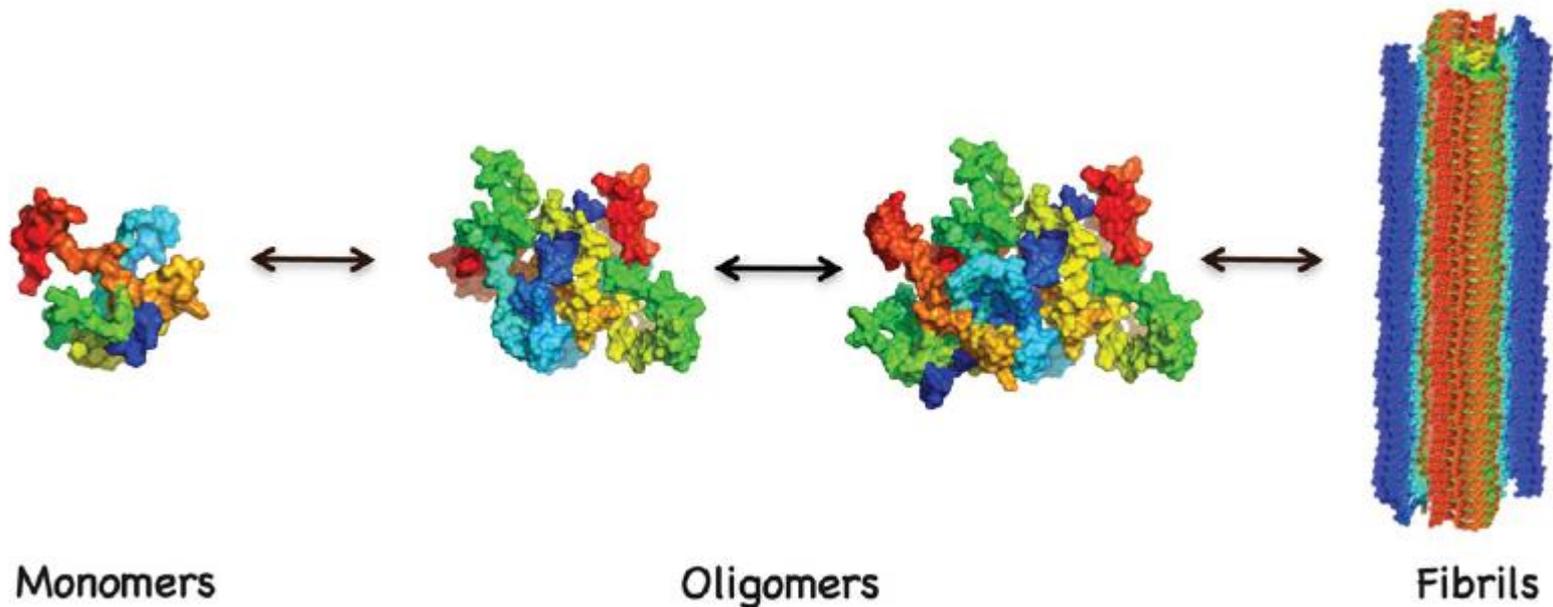
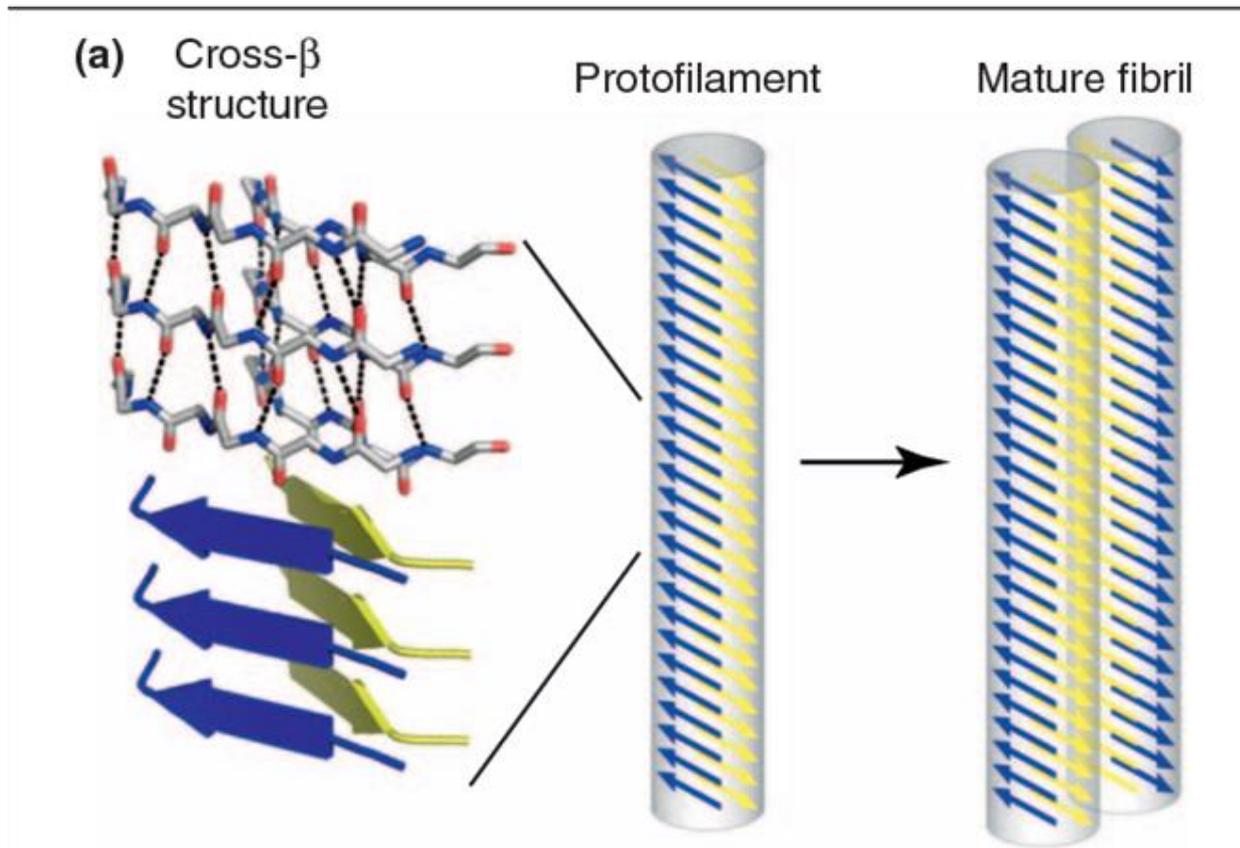


Fig. 1. Schematic representation of the process of amyloid formation. Natively folded or unfolded protein molecules, typically in monomeric form, undergo a process of misfolding and self-assembly generating initially oligomeric species and eventually amyloid fibrils. Once formed, these fibrils tend to 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.



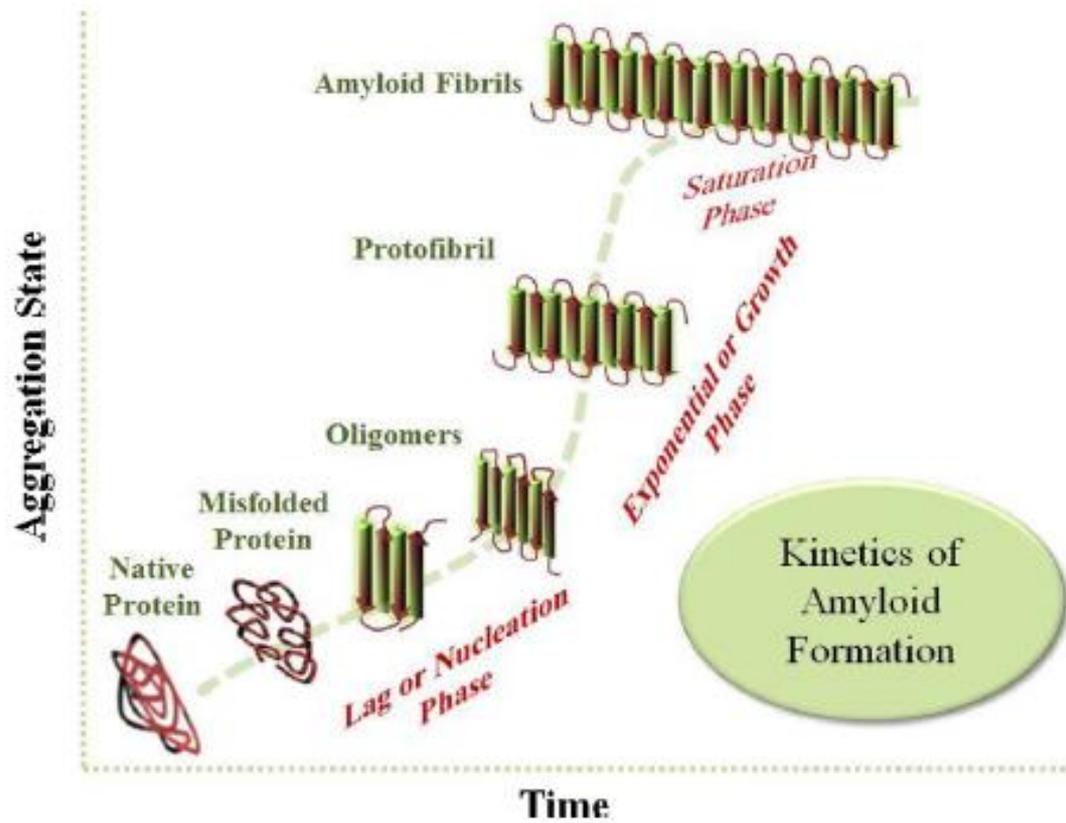
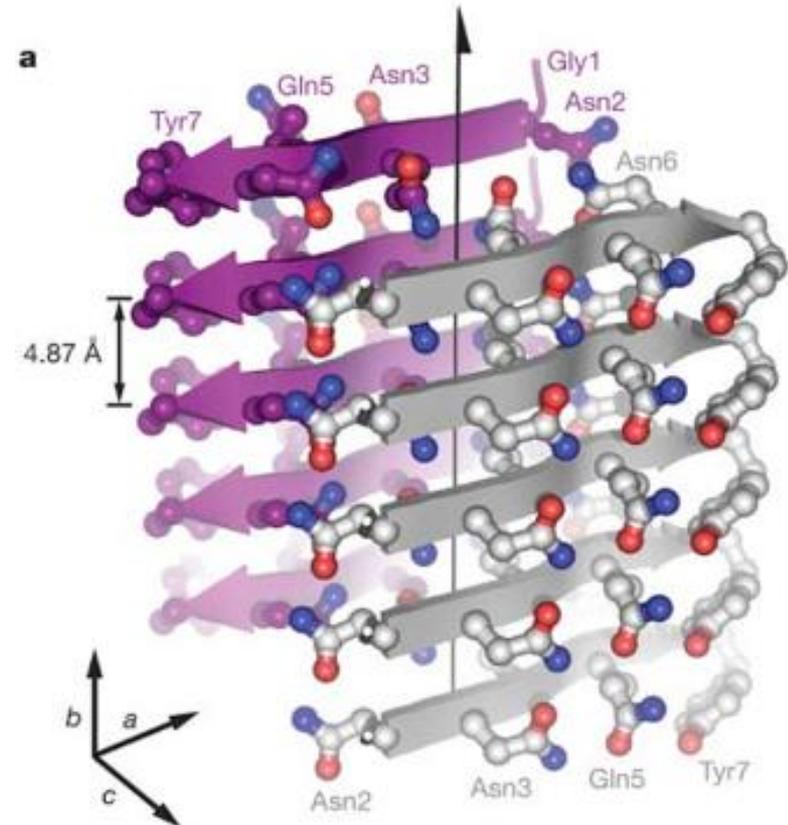


Fig. 3. Schematic representation of kinetics of amyloid formation.

monomero **GNNQQNY** (di Sup35) del lievito

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



Vista delle strutture β -sheets di lato (lungo l'asse c), che mostrano tre filamenti β con i legami idrogeno tra i filamenti.

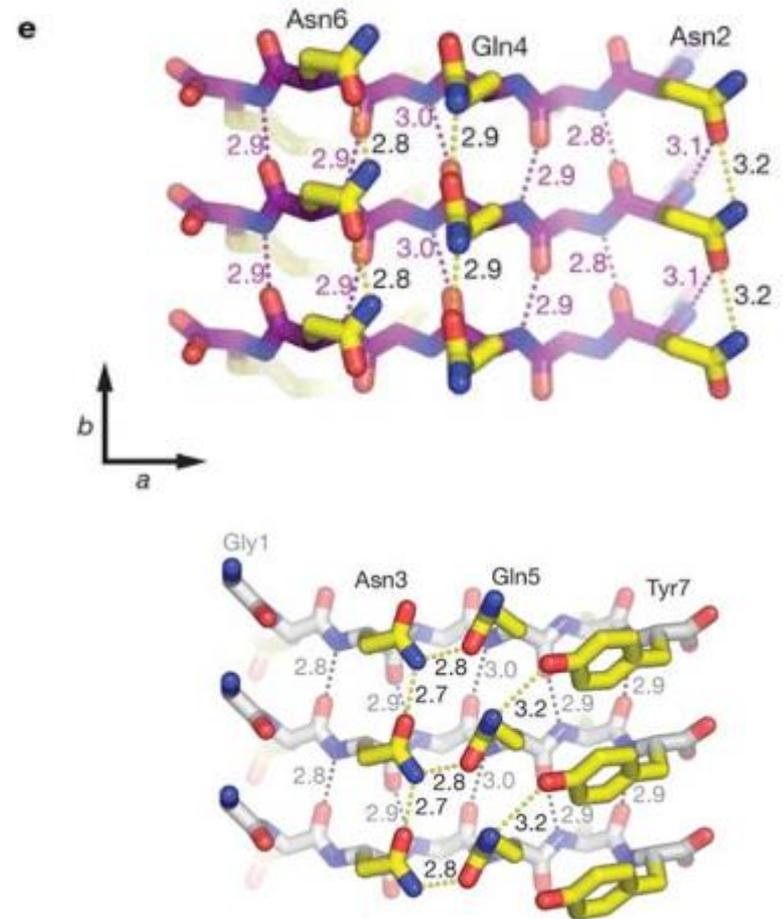
Gli atomi di carbonio della catena laterale sono in giallo.

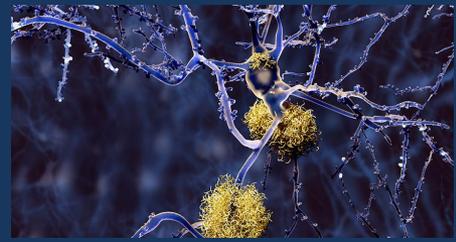
Ogni molecola GNNQQNY forma 11 legami idrogeno con le due molecole vicine nello stesso foglietto.

Cinque di questi sono legami a idrogeno CO \cdots NH quattro sono "amide stacks", cioè legami idrogeno amide-amide tra coppie di residui identici di Asn o Gln in molecole adiacenti all'interno di un foglio.

Sono questi legami a idrogeno amidici che costringono le molecole GNNQQNY e NNQQNY a impilarsi parallelamente e a registro nei rispettivi fogli.

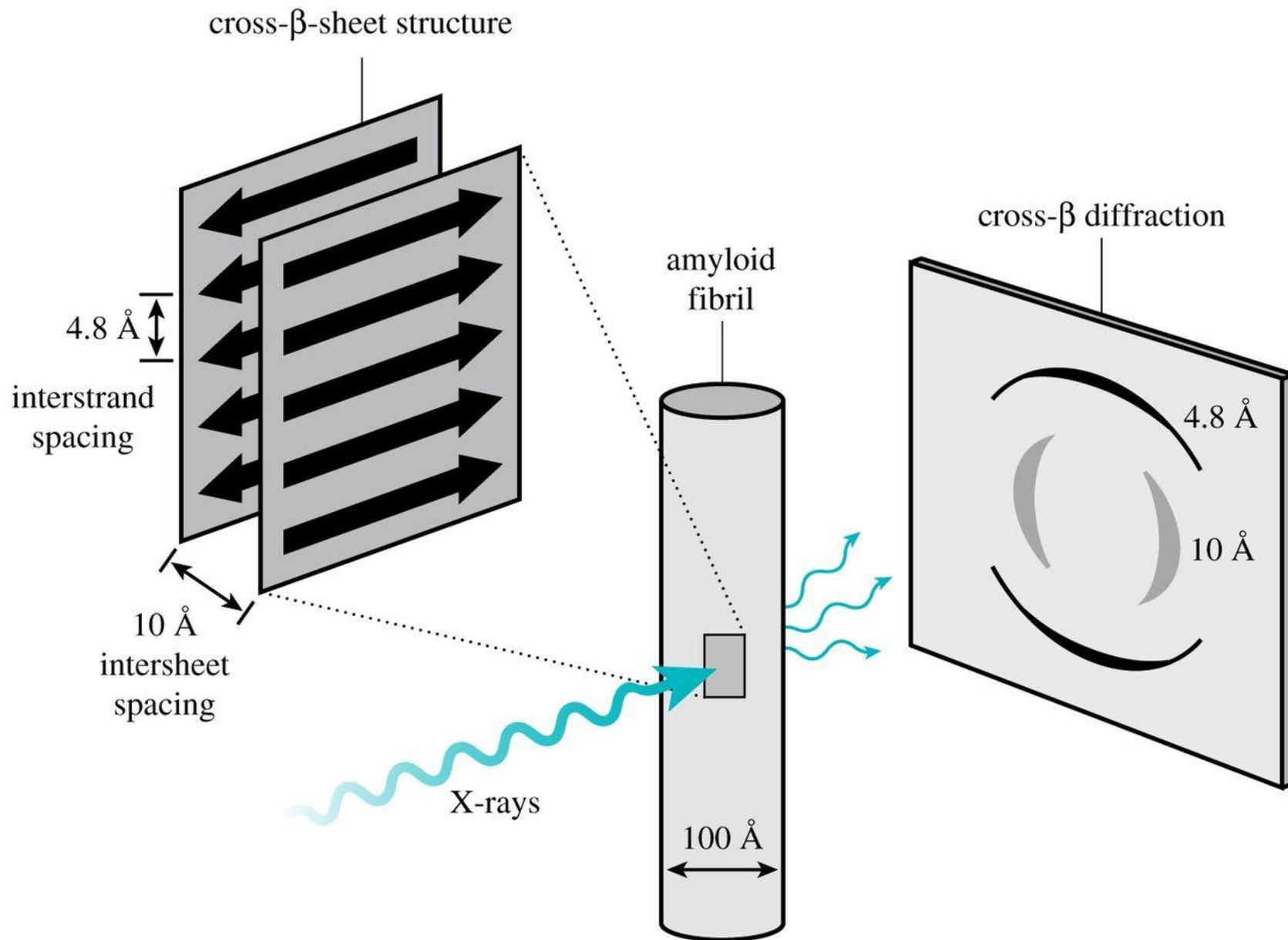
I restanti legami a idrogeno tra le molecole GNNQQNY nel foglio sono dall'azoto della catena laterale di Gln5 all'idrossile di Tyr7 e dall'Asn2 al Tyr7.

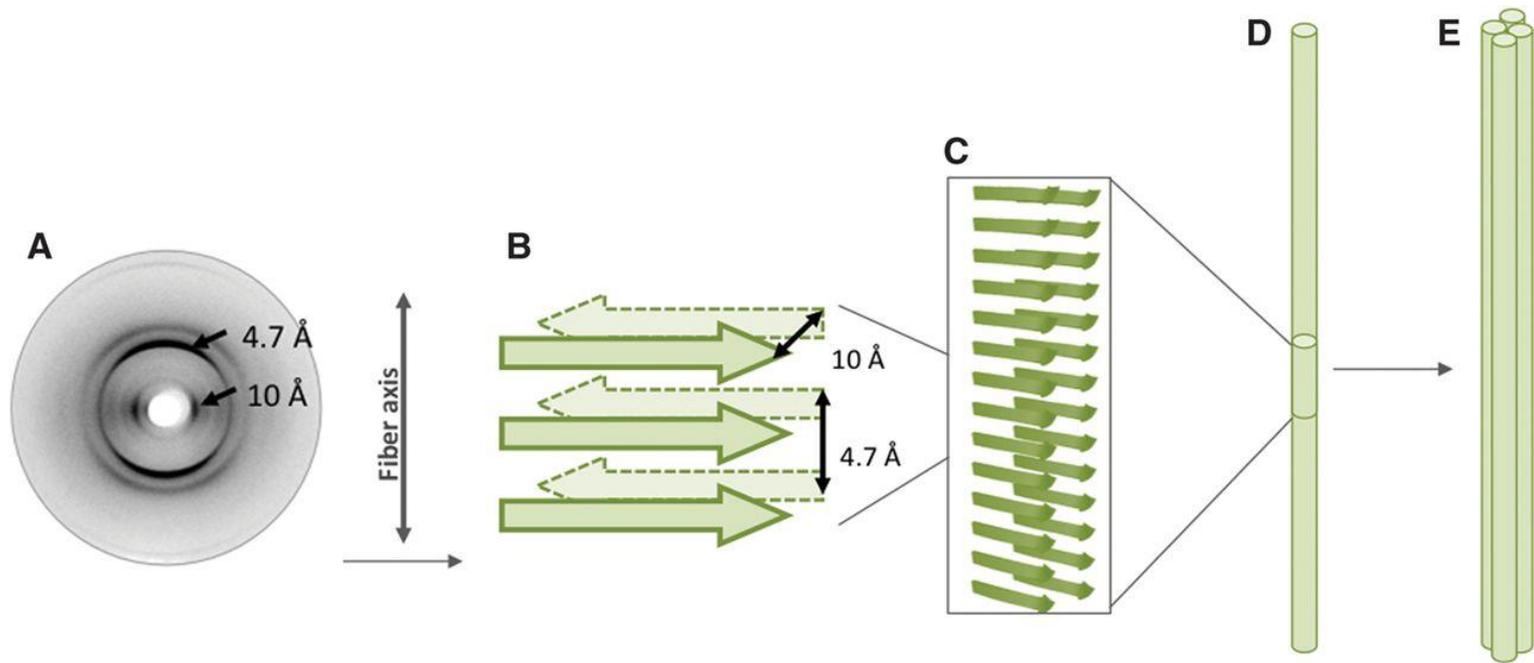




Misure sperimentali

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



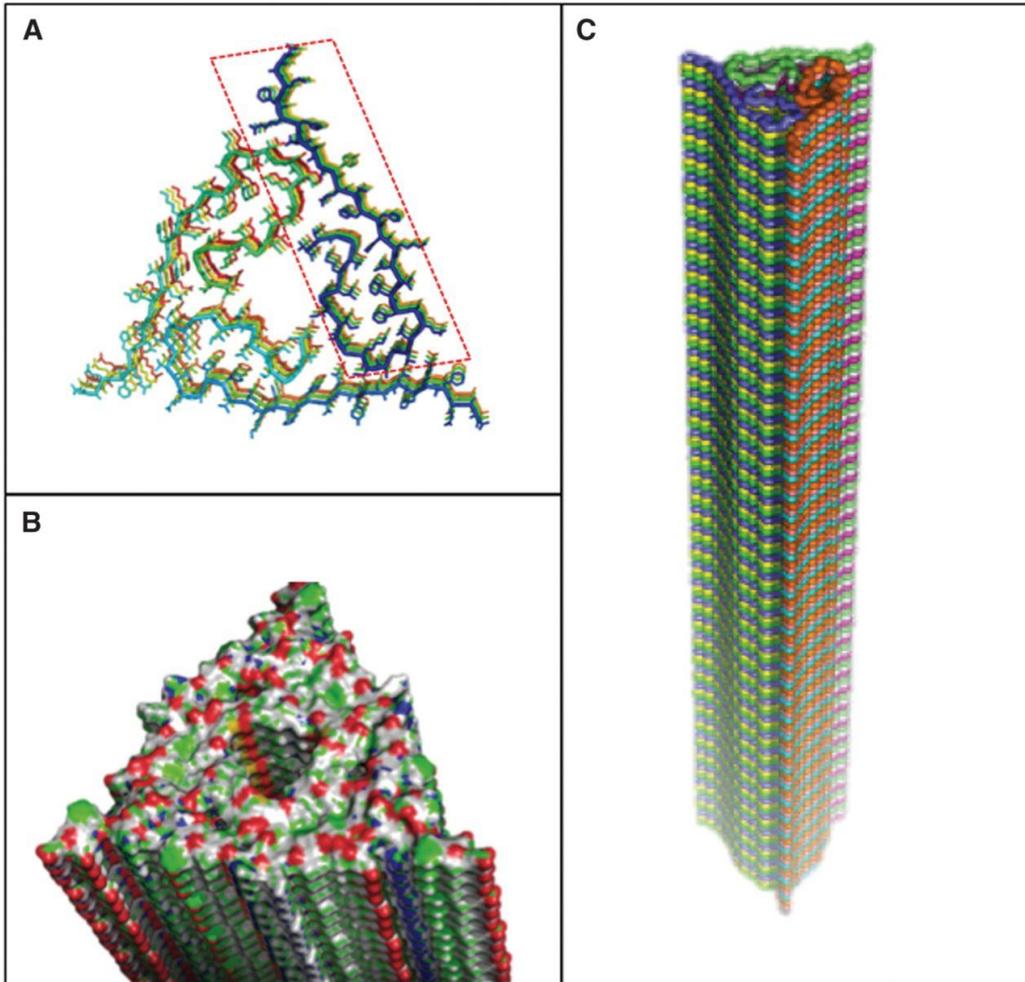


La **diffrazione a raggi X** di fibre fornisce informazioni sulla struttura ripetitiva all'interno del protofilamento amiloide **(A)**

Il modello di diffrazione cross- β ottenuto dalle fibrille amiloidi che deriva dal nucleo strutturale cross- β **(B)** del protofilamento mostrato in **(C)**.

I protofilamenti mostrati in **(D)** associano per formare la fibrilla amiloide matura **(E)**.

NMR allo stato solido



La struttura della fibrilla amiloide Aβ(1-40) elucidata mediante NMR allo stato solido

(A) Vista lungo l'asse della fibra che mostra le catene laterali. Una singola molecola di Aβ(1-40) è evidenziata e le molecole sono colorate in base all'identificatore della catena.

(B) Una rappresentazione della superficie che mostra la fibra colorata in base al tipo di atomo e rivela la natura dell'impilamento lungo l'asse della fibra.

(C) La fibra completa è generata dalla struttura PDB utilizzando PyMOL, colorata per catena e rappresentata come nastri.

Dicroismo circolare (CD)

La cinetica di formazione delle fibrille amiloidi può essere seguita con il dicroismo circolare. La formazione delle fibrille è accompagnata da cambiamenti nella struttura secondaria. Lo stato nativo delle proteine precursori amiloidogenici precursori delle proteine amiloidogeniche può essere molto vario, spaziando da puramente α -elica (mioglobina) allo stato β -sheet dei β -barrels

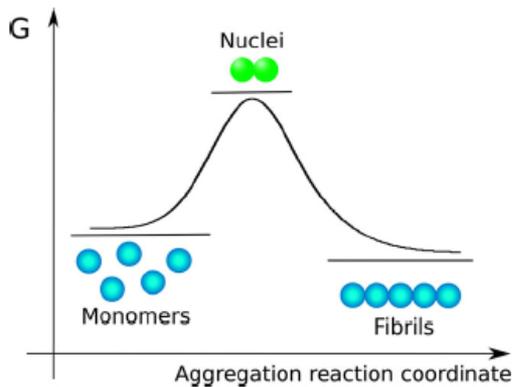


Fig. 2 Free energy diagram of amyloid fibril formation. The nucleus is the state with the highest free energy. Fibrils and monomers may have similar free energy, and the total concentration of monomer governs which state dominates at equilibrium

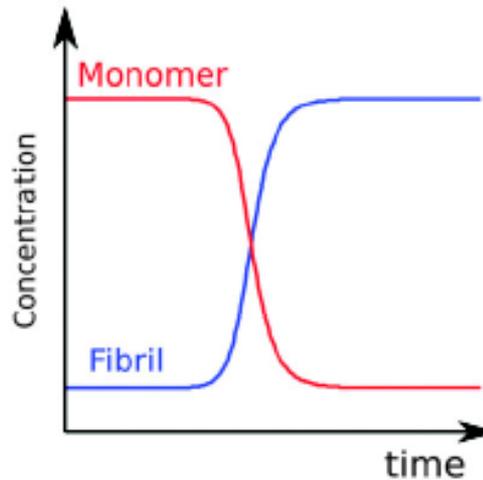
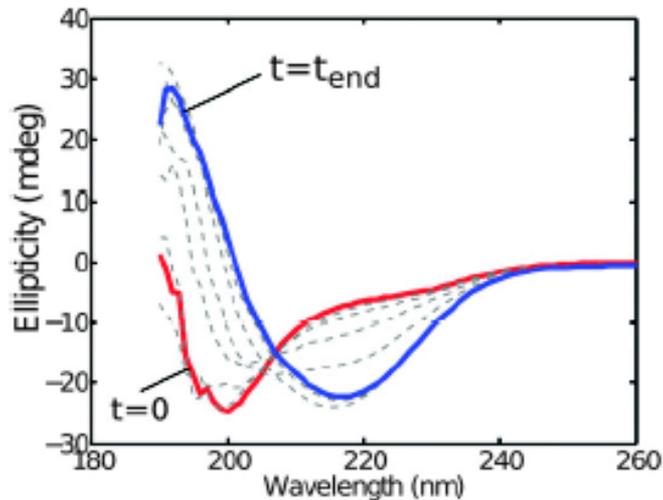


Fig. 4 CD spectra acquired during an ongoing reaction (left). The first spectrum (red) shows the unfolded monomer and the last spectrum (blue) the β -sheet fibril. The monomer and fibril concentration as a function of time (right) can be extracted by fitting superpositions of the start and end spectra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

Al momento della **formazione delle fibrille**, alcune proteine subiscono dapprima una diminuzione della struttura secondaria ordinata e un concomitante aumento delle strutture random coil, seguito da un aumento delle sequenze ricche di β -sheet, che costituiscono il backbone delle fibrille amiloidi.

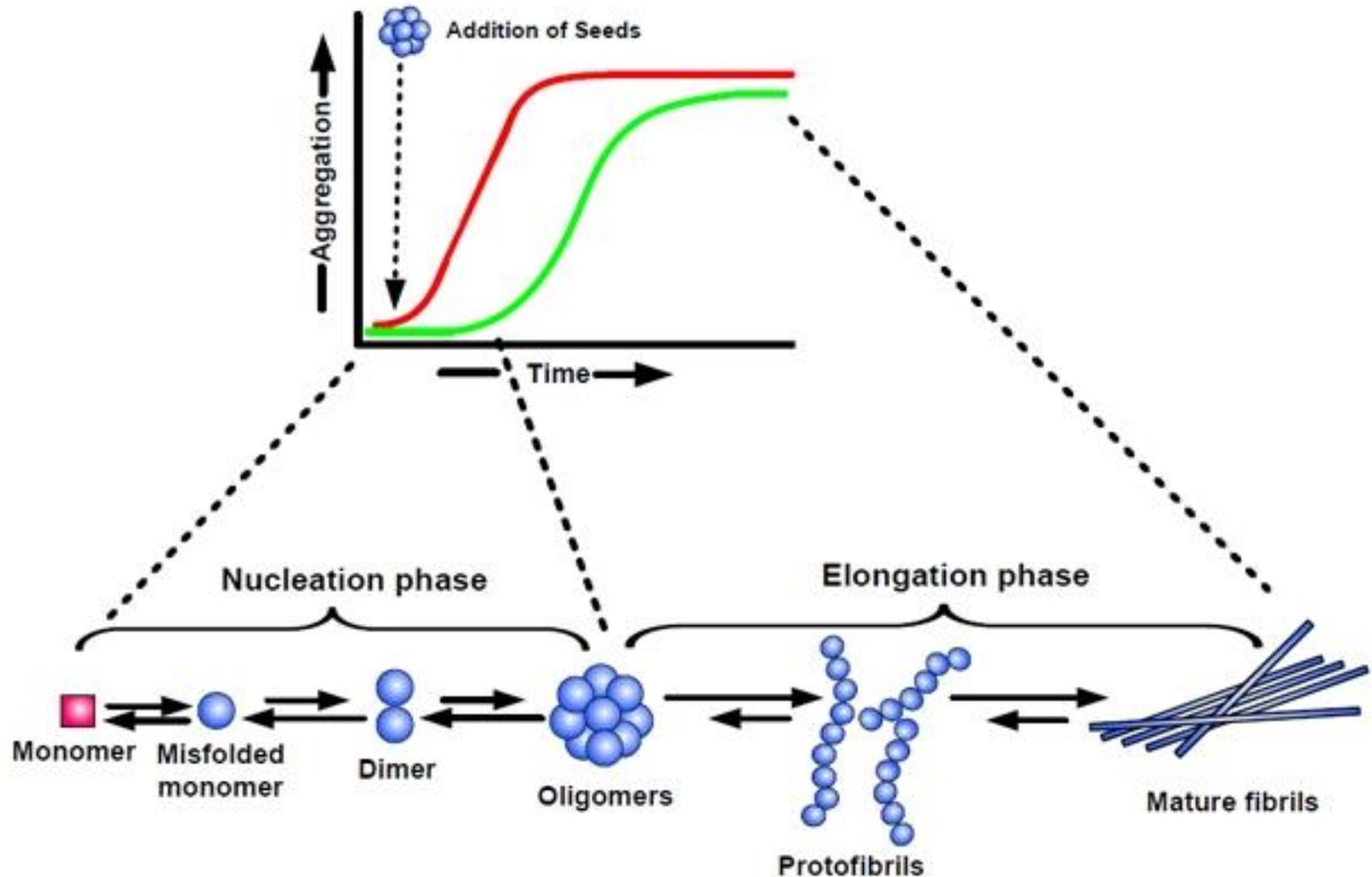
Gli spettri CD possono essere utilizzati per monitorare questo processo

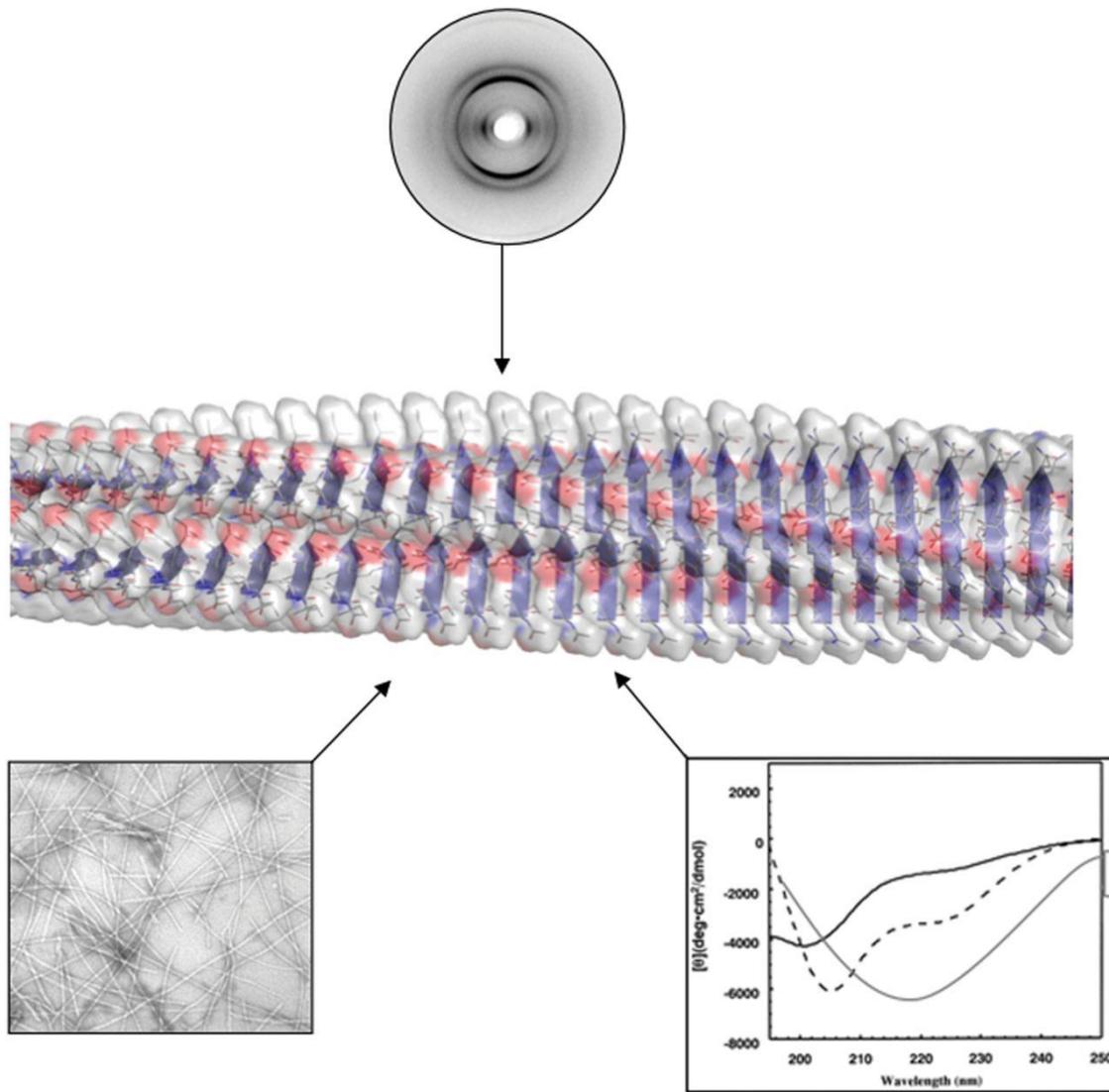
I minimi di ellitticità a 208nm e 222nm (indicativi del contenuto in α -elica) **si spostano verso lunghezze d'onda inferiori**, che è una caratteristica di un random coil (da 208nm a 200 nm) e strutture ricche di β -sheet (da 222nm a 218 nm).

È importante notare che le proteine aggregate spesso aumentano il rumore del segnale a causa della propensione alla dispersione della luce delle strutture amorfe e amiloidi, il che porta in alcuni casi a spettri inaspettati.

Per analizzare correttamente i dati CD, la concentrazione nel campione misurato deve essere nota. Tuttavia, questo non è semplice poiché un campione "fibrillato" contiene quantità sostanziali di diversa morfologia, cioè di monomero, di fibrille e di aggregati.

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

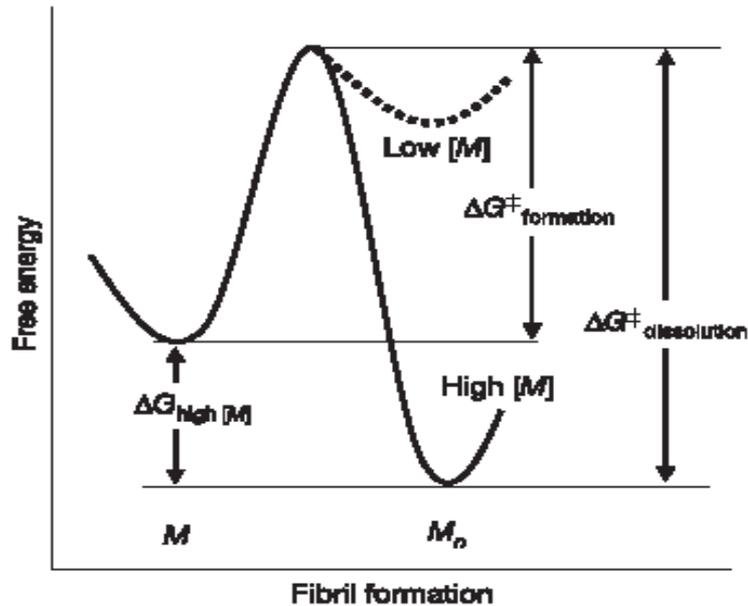


Grafico dell'energia libera, G , per la conversione del monomero **GNNQQNY** (di Sup35), M , allo stato aggregato, M_n .

La variazione standard dell'energia libera ΔG° per la conversione è piccola, per cui la variazione ΔG è controllata principalmente dalla concentrazione del monomero.

A basse concentrazioni, lo stato monomero è favorito rispetto allo stato aggregato, e lo stato aggregato è favorito ad alte concentrazioni.

Esiste una significativa barriera cinetica alla formazione dello stato aggregato ($\Delta G^{\ddagger}_{\text{form}}$).

Ad alte concentrazioni di proteine, la barriera per la ridissoluzione delle fibre, $\Delta G^{\ddagger}_{\text{diss}}$, risulta molto alta.

La struttura indica **3 livelli di organizzazione all'interno delle fibrille.**

- 1) l'allineamento delle molecole di GNNQQNY per formare un **β -sheet**.
- 2) La associazione di due fogli, che formano la struttura con un'interfaccia deidratata (**protofibrille**). Poiché l'associazione di due fogli coinvolge le forze di van der Waals piuttosto che il legame a idrogeno, i modelli di legame sono meno specifici di quelli del primo livello.
- 3) Nel terzo livello, le strutture a coppie di foglietti interagiscono per formare una **fibrilla**. Per il terzo livello, notiamo che le forze non covalenti coinvolte sono probabilmente più deboli di quelle che formano i primi due livelli.

Poiché i β -sheets si formano **rapidamente** e in modo reversibile, viene ipotizzato che questo livello si formi più rapidamente del secondo livello.

È probabile che il secondo livello si formi più lentamente perché le catene laterali ammidiche devono acquisire gli angoli torsionali appropriati per permettere la successiva associazione e devono venir disidratate per permettere la formazione dei legami idrogeno di stacking.

La **diminuzione dell'entropia** che accompagna questo passaggio crea la barriera alla formazione delle fibrille.

Le fibrille amiloidi sono stabilizzate dalla concentrazione delle proteine, oltre che dalla formazione dello «zipper» e dallo stacking di legami a idrogeno.

Per la conversione di n monomeri peptidici, M , in una struttura amiloide, M_n , con cooperatività infinita:



l'energia libera di transizione dallo stato in soluzione a quello aggregato è data da:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[M_n]}{[M]^n} = \Delta H^0 - T\Delta S^0 + RT \ln \frac{[M_n]}{[M]^n}$$

dove il termine a destra è governato dalla concentrazione di monomero.

Ad alte concentrazioni di monomero, questo termine è fortemente negativo, favorendo la transizione allo stato fibrillare.

Ciò suggerisce l'esistenza di un'ampia barriera entropica alla formazione di fibrille amiloidi, ma una volta che un nucleo è presente, le alte concentrazioni di proteina guidano la formazione delle fibrille e **contribuiscono a creare una barriera ancora più grande alla dissoluzione delle fibrille stesse.**

Test fluorimetrico della tioflavina T (ThT)

La **tioflavina T (ThT)** è un sale **benzotiazolico** ottenuto dalla metilazione della **deidroliuidina** con metanolo in presenza di acido cloridrico.

La tioflavina T è utilizzata come colorante per visualizzare e quantificare la **presenza** o la **fibrilizzazione** di aggregati proteici mal ripiegati, o **amiloidi**, sia in vitro che in vivo (ad esempio, placche composte da amiloide β trovate nel cervello di pazienti affetti da malattia di Alzheimer; placche di fibrille di PrP trovate nel cervello di pazienti affetti da CGD).

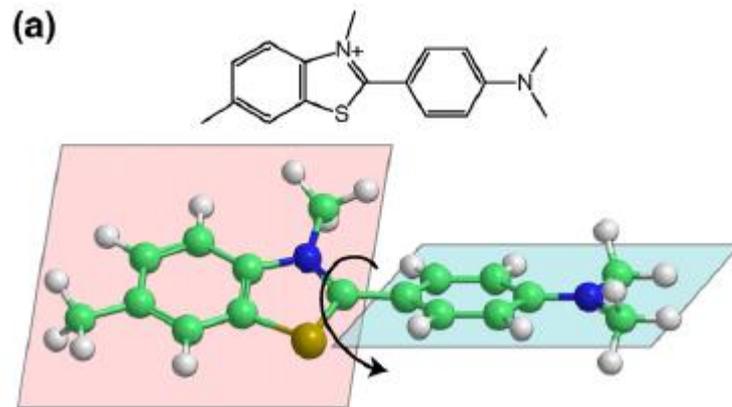
Vassar e Culling (1959) hanno dimostrato il potenziale della microscopia a fluorescenza per la diagnosi delle delle fibrille amiloidi. Sono stati i primi a descrivere l'uso della Tioflavina-T (ThT) come potente marcatore fluorescente dell'amiloide in istologia (ThT). Hanno notato che il ThT si localizzava selettivamente nei depositi di amiloide, mostrando quindi un grande aumento della fluorescenza.

Il saggio della tioflavina T (ThT) misura le variazioni dell'intensità di fluorescenza della ThT al momento del legame con le fibrille amiloidi.

L'aumento della fluorescenza può essere osservato mediante microscopia a fluorescenza o spettroscopia a fluorescenza.

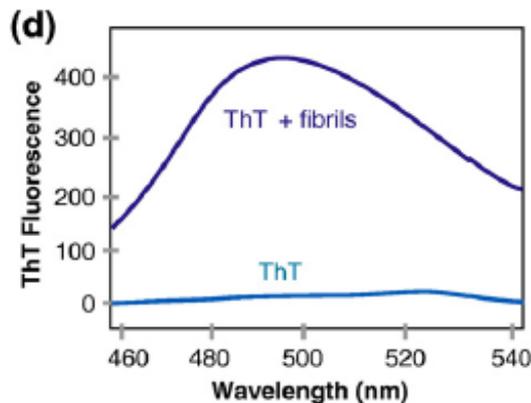
Il saggio spettroscopico è comunemente usato per monitorare la **fibrilizzazione nel tempo**.

Test fluorimetrico della tioflavina T (ThT)

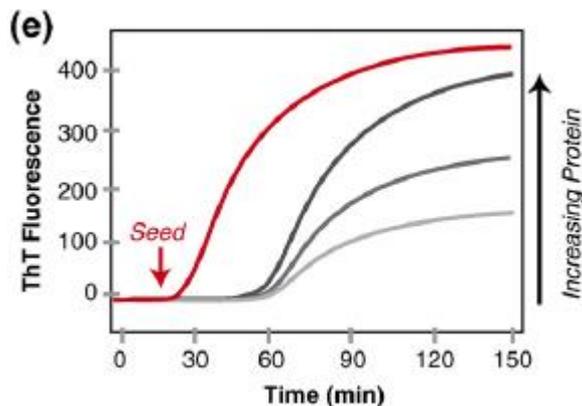


I due segmenti planari di ThT la cui rotazione reciproca definisce la sua chiralità.

La ThT si localizza in modo selettivo nei depositi di amiloide, mostrando così un grande aumento della luminosità della fluorescenza.



(d) Aumento caratteristico della fluorescenza della ThT al momento del legame con le fibrille amiloidi.



(e) Cinetica di fibrillizzazione a concentrazioni crescenti di un peptide che forma fibrille, monitorata dalla fluorescenza della ThT.

Rapida insorgenza della fibrillizzazione indotta dal «seeding».

Test fluorimetrico della tioflavina T (ThT)

La fluorescenza della tioflavina-T (ThT) è stata utilizzata per monitorare la cinetica e quantificare la quantità di fibrille di amiloide

La sua elevata solubilità in acqua e una moderata affinità per le fibrille (K_d nell'intervallo sub- μ M) rendono il ThT adatto a molti sistemi sperimentali.

È importante notare che questi studi hanno dimostrato che la ThT **si lega in modo ugualmente** efficace a molte fibrille preparate da fonti sintetiche e biologiche.

Questi risultati hanno dimostrato che le fibrille amiloidi condividono una struttura molecolare comune e hanno spinto per l'uso di tale test per lo studio della formazione di fibrille amiloidi.

La ThT e i suoi derivati hanno mostrato di riconoscere in modo specifico e di legarsi con modesta affinità all'amiloide.

L'uso intensivo della ThT come marcatore *in vitro* della formazione dell'amiloide ha dato origine a una sostanziale ricerca sul meccanismo di legame della ThT, con l'obiettivo principale di rispondere alle seguenti domande:

- 1. Quali strutture comuni riconosce la ThT e come?**
- 2. In che modo queste interazioni portano al drastico aumento della fluorescenza del ThT?**

Test fluorimetrico della tioflavina T (ThT)

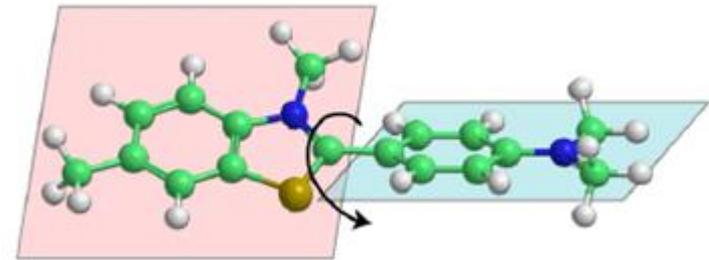
Attraverso una combinazione di analisi biofisica e biochimica, ingegneria proteica, microscopia a fluorescenza e simulazione computazionale, è emerso un meccanismo coerente per descrivere le interazioni tra ThT e fibrilla.

Si ritiene che il forte aumento della fluorescenza della ThT derivi dalla **selettiva immobilizzazione** di un insieme di conformeri di ThT.

Una grande quantità di dati sperimentali e di previsioni meccaniche quantistiche suggerisce che la ThT si comporta come un "**rotore molecolare**".

In soluzione, una barriera con bassa energia permette agli anelli benzilaminici e benzilolici del ThT di ruotare liberamente intorno al loro legame carbonio-carbonio condiviso.

Questa rotazione spegne (*quenching*) rapidamente gli stati eccitati generati dall'eccitazione dei fotoni, causando una bassa emissione di fluorescenza per il ThT libero.



Al contrario, l'immobilizzazione rotazionale della ThT **preserva lo stato eccitato**, con una conseguente **elevata resa quantica** della fluorescenza. E' probabile che le fibrille amiloidi presentino un sito di legame per la ThT che "blocca" stericamente il colorante legato, portando così a un aumento della fluorescenza del ThT.

Test fluorimetrico della tioflavina T (ThT)

Krebs et al. (2005) hanno rivelato che le molecole di ThT legate alle fibrille sono allineate **parallelamente all'asse lungo della fibra**. È importante notare che anche i filamenti incrociati delle fibre sono allineati parallelamente all'asse lungo della fibra, e quindi questi risultati hanno fornito una delle prime prove che l'orientamento regolare delle catene laterali nelle fibrille potrebbe essere il motivo di riconoscimento comune alla base della ThT per un'ampia gamma di amiloidi.

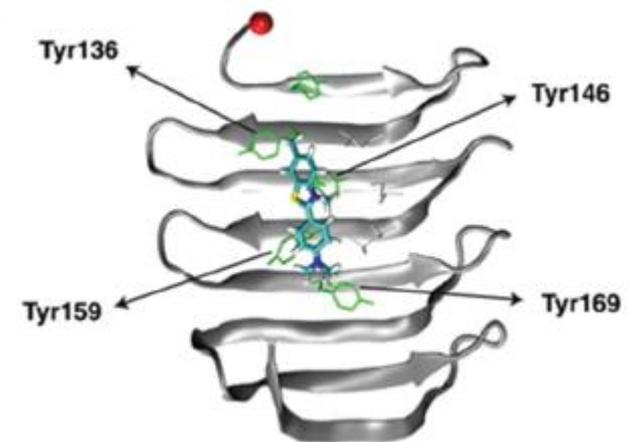
La difficoltà di avere fibrille solubili ha spinto la **modellizzazione teorica** e lo studio di sistemi più semplici.

Le simulazioni computazionali permettono di sezionare le fibrille amiloidi strutturalmente complesse, che affliggono gli studi sperimentali, in modelli minimalisti e trattabili.

Le simulazioni di Dinamica Molecolare sono state condotte a 320 K per 20 ns, le popolazioni di ThT legate risultanti hanno mostrato **siti preferenziali di interazione**.

Inoltre, è stato riscontrato che il ThT si lega e si dissocia rapidamente dalla fibrilla, in accordo con la K_d moderata.

Tra le scoperte più sorprendenti c'è l'osservazione che il ThT non legava in modo uniforme alla superficie del β -sheet, ma interagiva preferenzialmente con i canali formati da residui aromatici (per esempio, tirosina);



Test fluorimetrico della tioflavina T (ThT)

PROCEDIMENTO

Un'aliquota di ciascun campione (8 μL) viene miscelata con 20 μM (192 μL) di soluzione di ThT disciolta in 0,1 M PBS, pH 7,4, seguita da un'incubazione di 30 minuti di incubazione al buio. Successivamente, l'intensità della fluorescenza viene misurata alle lunghezze d'onda di **435 nm per l'eccitazione e 485 nm per l'emissione.**

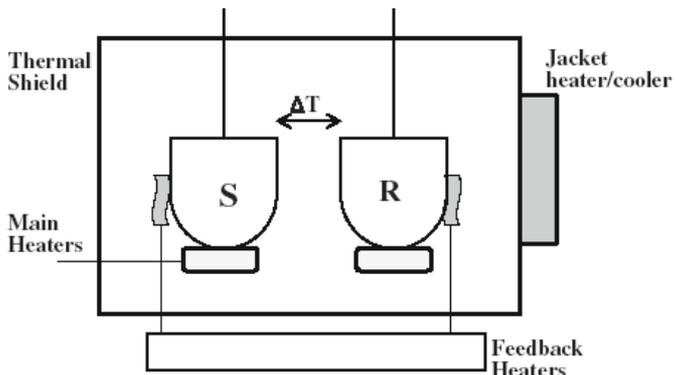
Il tempo di ritardo (**lag time**, τ) per la formazione di fibrille di amiloide è stato calcolato con la seguente equazione

$$F = F_{\min} + \left(\frac{F_{\max}}{1 + e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau}\right)}} \right)$$

F è l'intensità di fluorescenza al tempo di incubazione (**t**). **F_{min}** è l'intensità di fluorescenza iniziale, **F_{max}** è l'intensità di fluorescenza per **t** grandi, nella fase di equilibrio finale.

t è il tempo di incubazione, **t₀** è il tempo necessario per ottenere il 50 % dell'intensità di fluorescenza massima.

Il valore di τ si ottiene mediante regressione non lineare.



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:

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

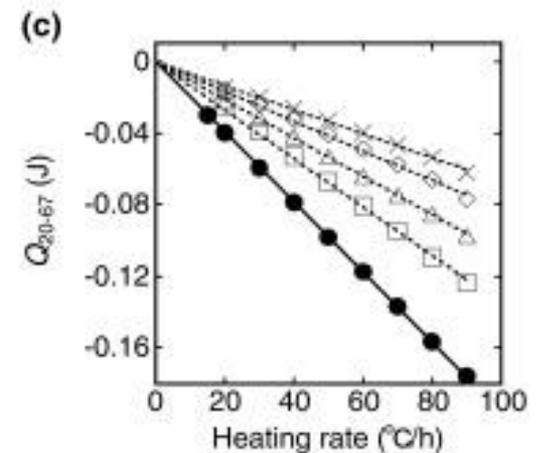
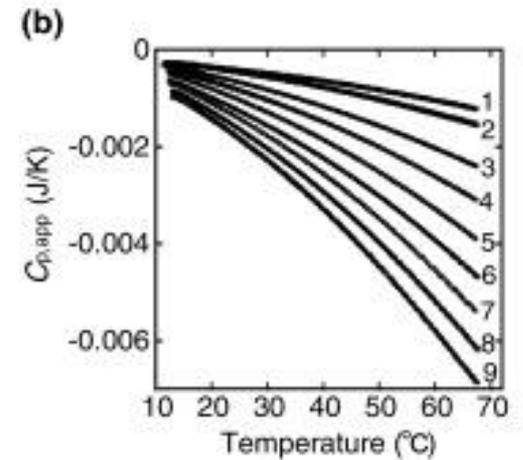
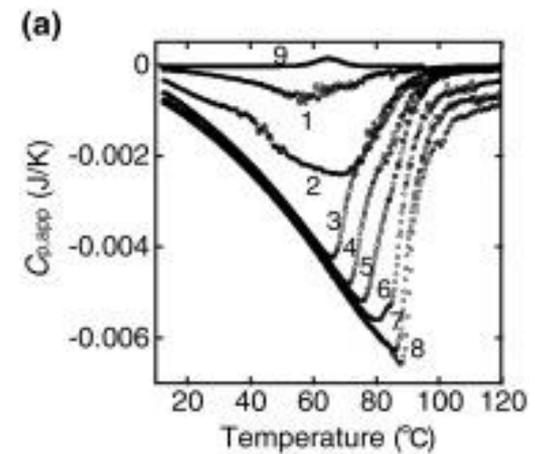
In the calculation of Q_{1-2} , T_1 and T_2 are set at 20°C (293.15 K) and 67°C (340.15 K), respectively. The $C_{p,\text{app}}$ values extrapolated to the zero heating rate at 67°C were used as $C_{p,0}$, which corresponds to that of the monomeric state within the heat scale used. With a non-linear 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)

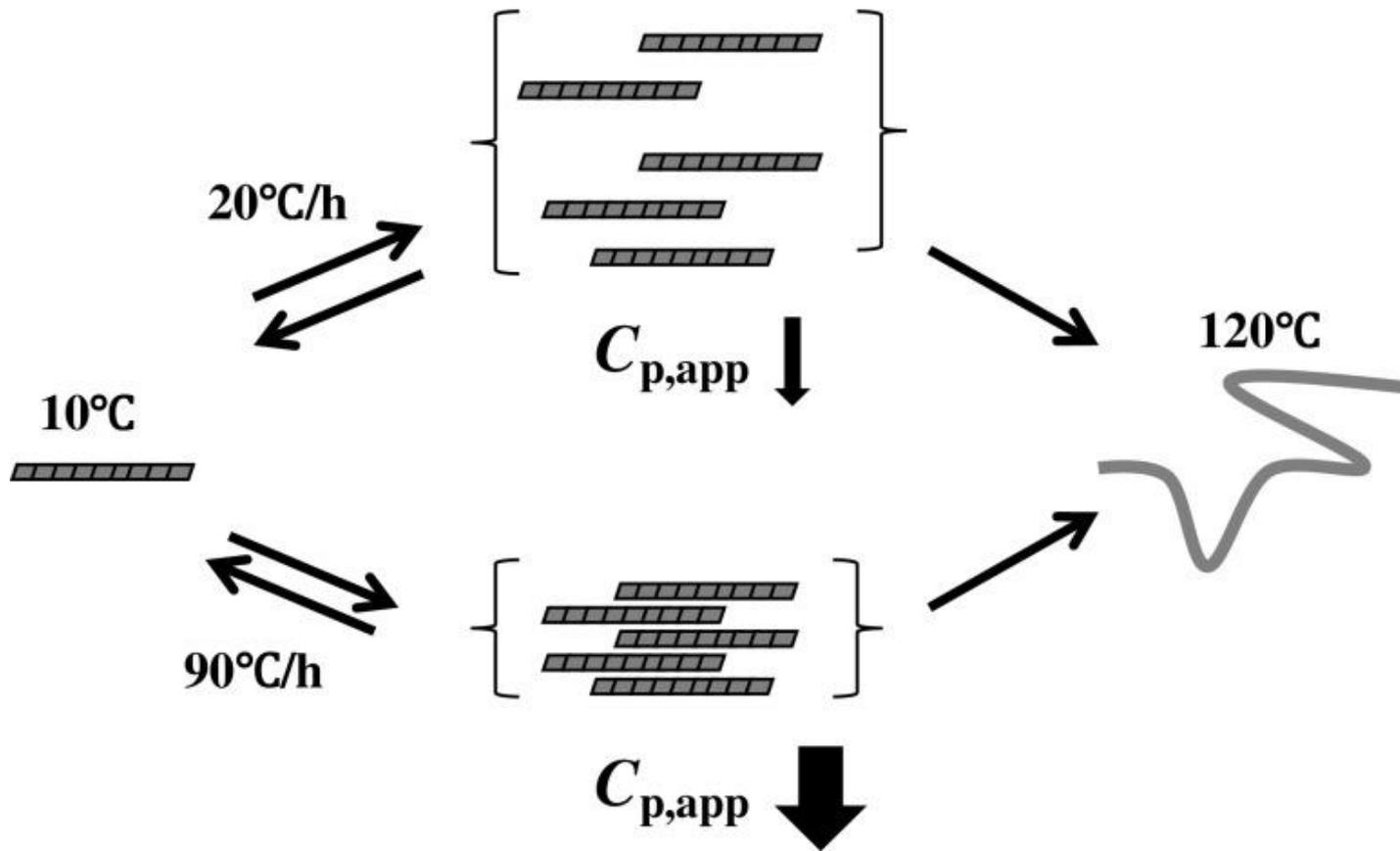
Thermal response of β_2 -m amyloid fibrils measured by differential scanning calorimetry (DSC) at pH 2.5.

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*).

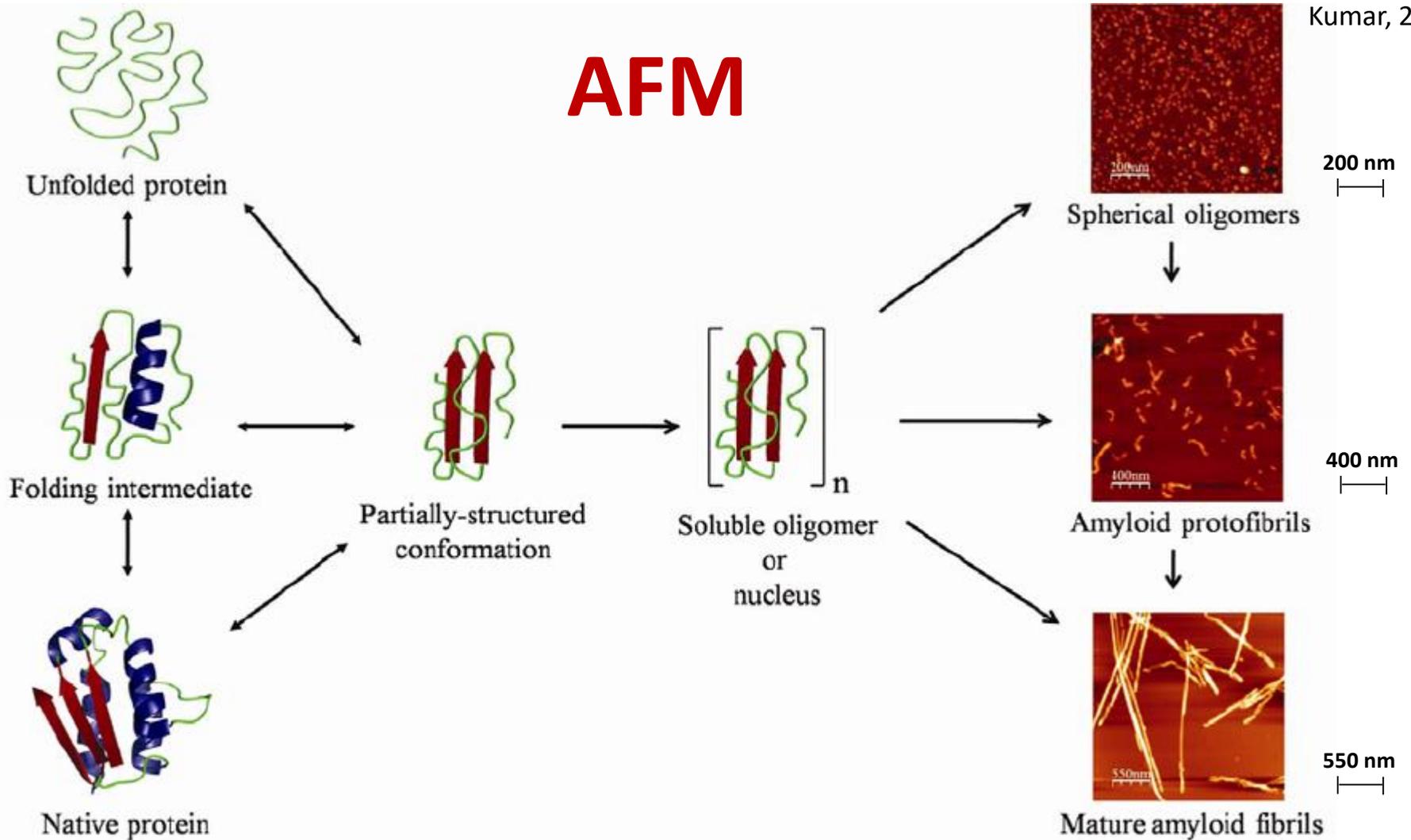
b DSC thermograms of the fibrils (0.1 mg/mL) recorded at various heating rates from 10 to 68 °C. The heating rate is varied in repeated consecutive scans from 90 to 15 °C/h: 90 (*line 9*) → 80 (*8*) → 70 (*7*) → 60 (*6*) → 50 (*5*) → 40 (*4*) → 30 (*3*) → 20 (*2*) → 15 °C/h (*1*). Furthermore, heating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

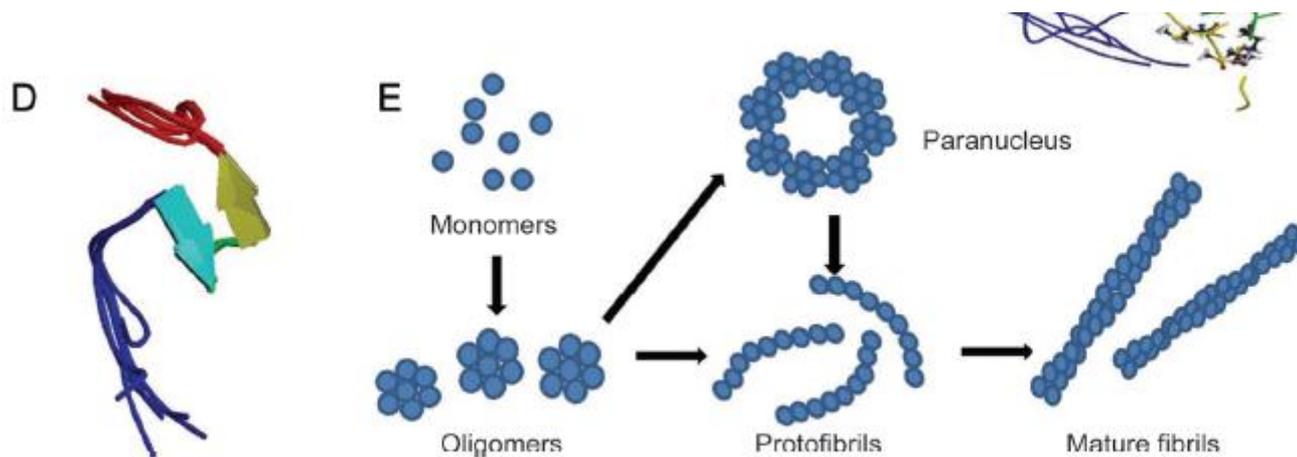




A model representing the transient inter-fibrillar association during heating. The association, which is reversibly **heating rate-dependent**, results in a decrease in the surface area of the fibrils accessible to the solvent water and, concomitantly, the decrease in $C_{p,app}$. Amyloid fibrils thermally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



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.

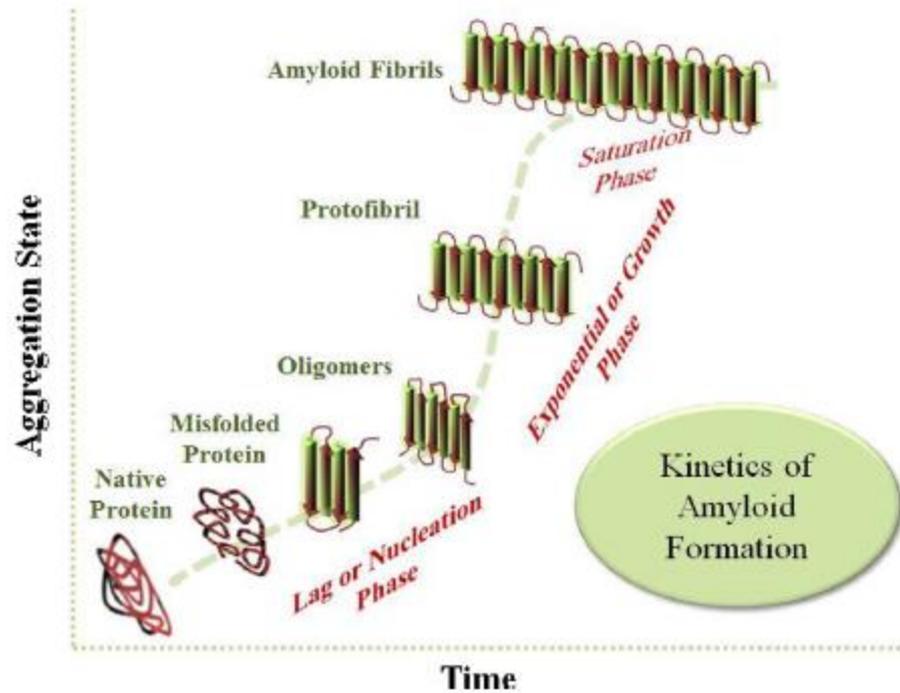


Fig. 3. Schematic representation of kinetics of amyloid formation.

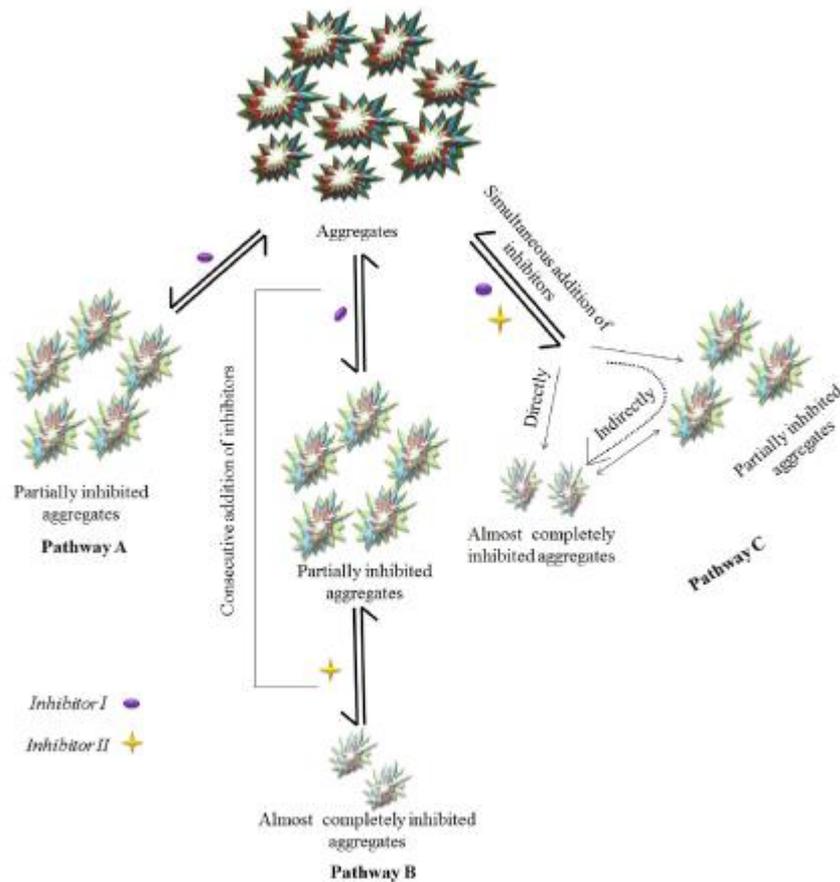


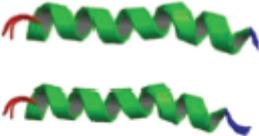
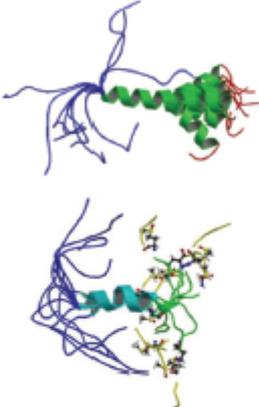
Fig. 6. Hypothesized mechanisms for inhibition of aggregates: A qualitative and quantitative impact of two inhibitors on distinct Pathways; Pathway A which indicates partial inhibition of aggregates in the presence of single inhibitor i.e. inhibitor I; Pathway B (two or more step process) indicates almost complete inhibition of aggregates by the consecutive addition of inhibitor I and II in step I and II respectively; Pathway C indicates almost complete or partial inhibition of aggregates either directly or indirectly by the addition of inhibitor I and II simultaneously in a single step process.

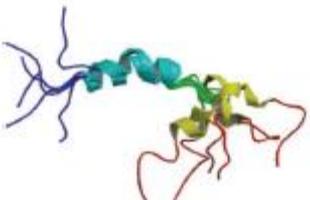
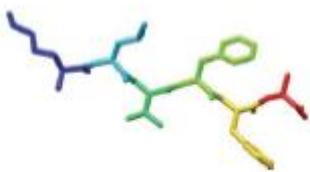
...in «Introduzione» al corso avevamo parlato di :

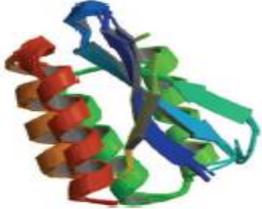
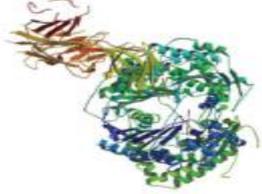
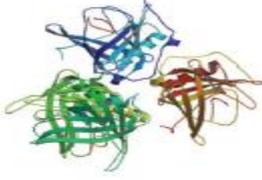
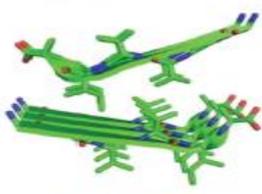
Strategie di base nello studio dei biopolimeri

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

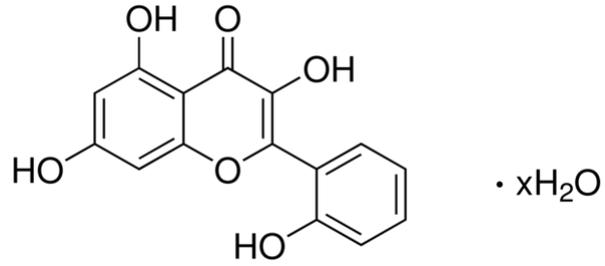
Table 1. Summary of A β structural studies.

| 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, protofibers, 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 |

Morin hydrate
2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavone



Channuwong 2022

2.6. *Molecular docking*

Molecular docking was carried out to investigate the binding modes and sites between native insulin monomers and anthocyanins according to a published method with modification [22]. The crystal structure of monomeric human insulin in pH 1.9 solution (PDB ID: 2MVC) was obtained from the Protein Data Bank [23]. Three-dimensional structures of cyanidin, C3G, C3R, malvidin, and M3G (ligands) were obtained from PubChem and the Human Metabolome Database. The structure of protein was prepared by removing water molecules, adding hydrogen atoms, and assigning Gasteiger charges. The protein and ligand input files were prepared and converted to PDBQT format using the AutoDock Tools (ADT) of the package MGLTools 1.5.6 for further docking analysis. The fibril-prone segments of insulin were identified according to published studies [11,24,25]. The docking was carried out through a grid box size of $30 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$, and the center of the grid box was set at $x = -4.81 \text{ \AA}$, $y = 3.32 \text{ \AA}$, $z = -10.72 \text{ \AA}$ for the insulin A-chain segment, and at $x = 0.01 \text{ \AA}$, $y = 11.17 \text{ \AA}$, $z = -15.99 \text{ \AA}$ for the insulin B-chain segment. The docking of anthocyanins with monomeric insulin was performed using the AutoDock Vina software. The best docking results based on binding energy and interactions were visualized and identified by the BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020. Molecular docking between preformed insulin fibrils and anthocyanins is described in Supplementary Methods S1.

Chandel 2018

Mechanisms for inhibition of protein aggregates The knowledge about the formation of protein aggregates is important to study in order to understand the mechanism of inhibition of protein aggregates. As we know that the protein aggregates are responsible for the conformational diseases [1] so to get rid of these diseases, the aggregates have to be inhibited. We generally use to take single inhibitor in our inhibition study [57,99] but the use of more than one inhibitor can do miracle in the diseased world. In some cases of protein-ligand interaction studies we have seen that the interaction of a protein with more than one ligand may show both type of quenching mechanisms i.e. dynamic as well as static quenching rather than single type of quenching mechanism, that result can be entirely different by the result of binding study utilising single ligand. So, likewise it is hypothesized that if the aggregates are inhibited by using more than one inhibitor may give more fruitful results rather than application of single inhibitor in inhibition and disaggregation of the preformed aggregates [99]. Henceforth, we have hypothesized mechanisms for the inhibition of protein aggregates (Fig. 6), which illustrate different pathways for the inhibition of aggregates. This mechanism shows both quantitative and qualitative impact of the inhibitors. The quantitative and qualitative impact of inhibitors refers to the reduction in number of aggregates and reduced hydrodynamic radii of the aggregates respectively. The inhibition mechanism comprises of three pathways. Pathway A is a single step process which shows the inhibition of the aggregates in the presence of single inhibitor. Pathway B elucidates the inhibition of aggregates in two or more steps by consecutive addition of two or more inhibitors. However, pathway C illustrates the inhibition of aggregates in single step by the addition of two or more inhibitors simultaneously. The proposed outcome of the mechanism may be partial inhibition of aggregates may occur in presence of single inhibitor in pathway A. In pathway B, the first step of the mechanism may show partial inhibition of aggregates in the presence of first inhibitor, as in pathway A, but in the second step the addition of the second inhibitor may show more fruitful result both quantitatively and qualitatively. Furthermore, in pathway C, the simultaneous addition of the inhibitors may show either partial or almost complete inhibition of aggregates either directly or indirectly. Thus, these mechanisms of inhibition of protein aggregates may act as a source of light that may enlighten a new path of research in the field of inhibition of aggregates in vivo and may assist in curing the neurodegenerative diseases.

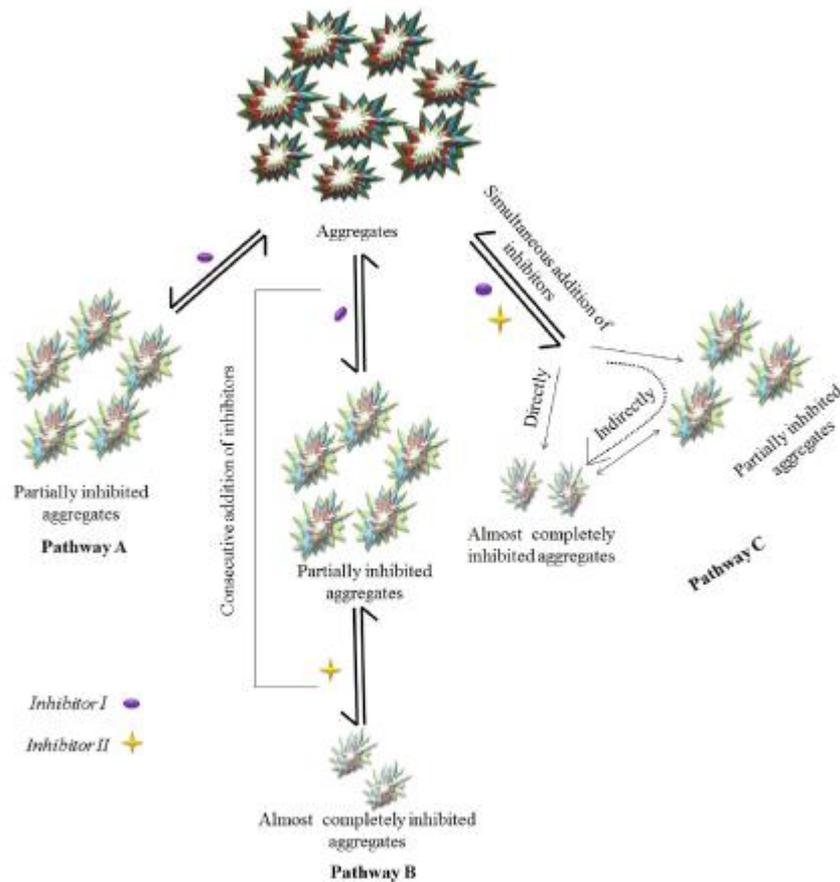


Fig. 6. Hypothesized mechanisms for inhibition of aggregates: A qualitative and quantitative impact of two inhibitors on distinct Pathways; Pathway A which indicates partial inhibition of aggregates in the presence of single inhibitor i.e. inhibitor I; Pathway B (two or more step process) indicates almost complete inhibition of aggregates by the consecutive addition of inhibitor I and II in step I and II respectively; Pathway C indicates almost complete or partial inhibition of aggregates either directly or indirectly by the addition of inhibitor I and II simultaneously in a single step process.