

COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA
prot. 2005023002

Coordinatore Scientifico	Maurizio LEONE
Ateneo	Università degli Studi di PALERMO
Titolo della Ricerca	Ruolo dei metalli nei processi di aggregazione di proteine
Finanziamento assegnato	Euro 73.000
Durata	24 Mesi

Obiettivo della Ricerca

I processi di aggregazione delle proteine sono stati oggetto di numerosi studi in vista della loro rilevanza in molti campi della ricerca scientifica e tecnologica, dalla medicina alle scienze alimentari. Grazie alle ricerche fin qui portate a compimento, è ormai largamente diffusa l'idea che questi processi coinvolgono differenti meccanismi come ad esempio cambiamenti conformazionali e strutturali delle singole molecole proteiche, processi di nucleazione, interazioni proteina-proteina e conseguente formazione di legami intermolecolari. Tali meccanismi che avvengono su differenti scale spazio-temporali possono evolversi in più fasi ed essere interconnessi. [M.Manno et al. 2004 ;P.L. San Biagio et al 1999, V. Militello et al. 2003].

I processi di interazione proteina-proteina implicano in genere cambiamenti conformazionali dell'intera proteina o di domini specifici, dando luogo ad associazioni di molecole parzialmente "unfolded" [D. Foguel et al. 2003, V.Militello et al. 2003, Hamada et al. 2002]. Cambiamenti anche piccoli nelle configurazioni locali possono dar luogo a grandi riarrangiamenti delle macromolecole che possono portare all'esposizione al solvente di residui apolari. Da questo punto di vista, la proteina nativa e gli aggregati si possono considerare come derivanti da un insieme di molecole parzialmente "unfolded" fluttuanti tra diversi sottostati conformazionali che, a causa delle interazioni con il solvente e con le molecole vicine, seguono percorsi alternativi. Di fatto, al giorno d'oggi l'aggregazione viene considerata come un processo che agisce in competizione al normale processo di folding delle proteine e sembra essere una caratteristica generale di ogni catena polipeptidica [D.R. Booth et al. 1997, Taddei et al. 2001, Chiti et al. 2002]

E' stato osservato che le placche senili tipiche del morbo di Alzheimer contengono una gran quantità di ioni metallo come Cu+2, Fe+3 e Zn+2 (essendo quest'ultimo il più abbondante). Il loro ruolo non è ancora ben chiaro ma, ad esempio, la formazione di fibrille amiloidi da parte del peptide beta amiloide (bA), cioè il principale componente delle placche, risulta sensibilmente accelerata dalla presenza di ioni rame e zinco [Bush et al., 1994; Mantyh et al., 1993]. È quindi sufficientemente chiaro che questi ioni potrebbero avere conseguenze significative sui processi di unfolding e/o di aggregazione.

Gli ioni metallici possono anche alterare su scala macroscopica la tipologia degli aggregati ottenuti. Ad esempio, la presenza di ioni di ferro è in grado di indurre processi di gelazione "a freddo" negli aggregati di beta-lactoglobulina (BLG), uno dei maggiori costituenti del latte bovino [Remondetto et al., 2003].

Lo scopo del progetto è quello di studiare gli effetti della presenza di ioni metallici in soluzione sui processi di aggregazione di proteine. La rilevanza di questo studio è duplice: da una parte vi è un forte interesse biomedico, legato alla comprensione dei meccanismi che stanno alla base dei processi di aggregazione amiloide, che sono fortemente influenzati, sia in vivo che in vitro, dalla presenza di ioni metallici; vi è inoltre un interesse di ricerca di base, legato alla comprensione dei meccanismi di interazione proteina-proteina mediata dal solvente.

Come sopra riportato, i processi di aggregazione si possano pensare come il risultato di differenti meccanismi su differenti scale gerarchiche, strettamente interconnessi tra di loro. Rimangono tuttavia molte domande ancora aperte, poiché la totalità di questi meccanismi, la loro gerarchia e le loro interconnessioni sono ancora ben lontane dall'essere chiari.

Alcune evidenze sperimentali riportate in letteratura sembrano indicare che il processo guida verso l'aggregazione sia dato da cambiamenti conformazionali che, partendo dalla conformazione nativa, portano la proteina verso strutture parzialmente unfolded. Questo, ad esempio, potrebbe provocare la parziale esposizione al solvente di gruppi apolari che nella conformazione nativa sono contenuti all'interno della matrice proteica, e darebbe luogo a nuove interazioni proteina-proteina non presenti quando le singole molecole proteiche assumono la struttura nativa. Inoltre, la formazione di stati aggregati potrebbe a sua volta rafforzare questo processo, favorendo una esposizione sempre maggiore dei gruppi idrofobici per via delle modificate condizioni nell'immediato intorno delle singole molecole proteiche. Si creerebbe in tal modo un meccanismo di feedback capace di innescare un processo di self-trapping in minimi sempre più profondi dell'energia libera dell'intero sistema proteina-solvente.

In questo scenario, è necessario chiedersi perché in condizioni fisiologiche la singola proteina evolve improvvisamente verso una condizione di non-equilibrio, invece di permanere nel suo stato nativo. L'ipotesi di fluttuazioni anomale, il cui tempo di vita sia sufficiente per innescare il meccanismo di self-trapping sopra riportato, anche se non appare del tutto giustificata, va tenuta in considerazione. Sembra comunque più ragionevole il supporre che variazioni nelle condizioni ambientali possano indurre l'insorgere di cambiamenti conformazionali delle singole molecole proteiche. Diversi studi in vitro supportano questa visione, dimostrando che cambiamenti di pH, temperatura, forza ionica ecc. ecc. sono in grado di indurre cambiamenti conformazionali e di innescare processi di aggregazione.

Alternativamente, si può ipotizzare che variazioni nelle condizioni esterne perturbino l'equilibrio proteina singola vs. aggregati indipendentemente da variazioni della struttura nativa, dando così luogo alla formazione di aggregati. Le considerazioni fatte sopra sono particolarmente rilevanti nel caso dei processi di aggregazione in presenza di ioni metallici. Scopo del progetto è quello di raccogliere in maniera sistematica dati sperimentali che siano in grado di fornire ulteriori informazioni sui meccanismi sopra descritti. L'approccio sperimentale consisterà nello studio dei processi e delle cinetiche di aggregazione in presenza di ioni metallici per alcune opportune proteine: la beta-lactoglobulina (BLG), il lisozima e il peptide beta-amiloide (bA). La BLG e il lisozima sono

ottimi sistemi modello e la loro capacità subire processi di aggregazione nettamente distinti (aggregati amorfi oppure fibrille amiloidi) al variare delle condizioni esterne sarà utilizzata per studiare gli effetti degli ioni metallici sui diversi tipi di aggregazione. Il peptide bA presenta invece un notevole interesse intrinseco per via del suo coinvolgimento nel Morbo di Alzheimer e per il ruolo giocato in questo contesto dagli ioni metallici.

Le tecniche utilizzate e le expertise delle tre unità di ricerca coinvolte permetteranno di separare, anche temporalmente, i processi a livello di singole molecole (cambiamenti conformazionali e strutturali) da quelli di aggregazione sopramolecolare fino alla formazione di aggregati amorfi o fibrille. Sarà inoltre possibile, grazie alla varietà delle tecniche sperimentali utilizzate, caratterizzare separatamente gli ioni metallici e le proteine.

Uno degli scopi del progetto è quello di quantificare sistematicamente l'effetto degli ioni metallici sui processi di aggregazione. L'approccio parallelo con le diverse tecniche sperimentali può infatti consentire di appianare alcune delle contraddizioni presenti in letteratura. Si cercherà quindi di verificare se la presenza di ioni metallo agisca direttamente sui cambiamenti conformazionali delle singole proteine, innescando in tal modo i processi di aggregazione, oppure se favorisca l'insorgere di interazioni proteina-proteina, dando luogo a fluttuazioni di concentrazione che possano parallelamente innescare i cambiamenti conformazionali e rinforzare il meccanismo di aggregazione.

Innovazione rispetto allo stato dell'arte nel campo

I meccanismi attraverso i quali gli ioni metallici influenzano i processi di aggregazione delle proteine rimangono ancora in larga parte oscuri. Scopo del progetto è quello di studiare tali meccanismi attraverso l'utilizzo di una vasta gamma di tecniche sperimentali che consentano di ottenere informazioni 1) sulle strutture locali che possono formarsi attorno agli ioni metallici durante il processo di aggregazione e 2) sui cambiamenti conformazionali delle proteine e la loro aggregazione in presenza di ioni metallici. I processi di aggregazione saranno studiati quindi "guardando" sia al metallo sia alle proteine. Si spera in tal modo di evidenziare l'effetto degli ioni metallici nelle differenti fasi del processo di aggregazione, ossia 1) sui cambiamenti conformazionali che portano la proteina in una struttura parzialmente "unfolded" e 2) sulla conseguente aggregazione.

La flessibilità di questo progetto potrà permetterci di superare le difficoltà relative all'attuale ignoranza sulla natura delle interazioni che sono probabilmente responsabili dell'instaurarsi delle patologie neuro-degenerative.

Le proteine che attualmente sembrano le più indicate per questo tipo di studio, sono la beta-lactoglobulina (BLG), il lisozima ed il peptide beta-amiloide (bA).

La BLG ed il lisozima sono "piccole" proteine globulari utilizzate spesso come sistemi modello nello studio di fenomeni complessi. Sono proteine commercialmente reperibili e ampiamente studiate, le cui caratteristiche strutturali sono ben note. Entrambe queste proteine, pur essendo strutturalmente molto stabili, sotto opportune condizioni esterne possono subire cambiamenti conformazionali al livello delle strutture terziaria e secondaria, col conseguente innestarsi di processi di aggregazione.

La BLG è uno dei maggiori costituenti del latte bovino. Il suo stato di associazione dipende dal pH, per cui ad esempio la proteina si presenta dimerica a pH neutro e monomericamente a pH acido. Il monomero è composto da 162 aminoacidi e la sua struttura secondaria è costituita per la maggior parte da strutture beta (nove beta-strands antiparalleli e due corte eliche alfa). Nella proteina sono presenti due triptofani, il primo dei quali (trp61) si trova in una zona esterna completamente esposta al solvente mentre il secondo (trp19) è al centro di una cavità idrofobica nel "core" della proteina. La BLG possiede inoltre 5 cisteine, di cui 4 impegnate nella formazione di ponti di zolfo intramolecolari, particolarmente importanti per via dell'influenza che i processi di "disulfide exchange" possono avere sulla formazione di aggregati sopramolecolari. È noto che la BLG può subire processi di aggregazione e/o gelazione, che sono stati a lungo studiati sia per l'importanza che essi assumono nelle applicazioni dell'industria agro-alimentare sia perché in particolari condizioni è stata osservata la formazione di fibrille amiloidi.

Il lisozima è un piccolo enzima (129 aminoacidi) che attacca la parete cellulare dei batteri e rompe le catene di carboidrati che essi formano distruggendone così l'integrità strutturale. La sua struttura secondaria è composta da eliche alfa (45%), beta-sheets (19%) e beta-turns (23%). Sono presenti 4 ponti S-S e nessuna cisteina libera. Nella struttura del lisozima sono presenti sei triptofani allocati in differenti zone.

La tipologia degli aggregati di BLG e di lisozima dipende fortemente dalle condizioni sperimentali. In particolare, tali proteine al variare delle condizioni esterne possono formare aggregati amorfi oppure fibrille amiloidi [D.Hamada and C.M. Dobson, 2002, D.R. Booth, 1997, Shigeki Arai 1999], e pertanto si prestano bene per lo studio degli effetti degli ioni metallici su processi di aggregazione di vario tipo. Nel caso della BLG inoltre l'influenza degli ioni metallici sul processo di aggregazione è già parzialmente documentata [K. Suzuki et al. 2001, G. E. Remondetto et al. 2003].

Il peptide bA è un polipeptide composto da 39 43 residui, derivante dalla proteolisi della "Amyloid Precursor Protein" (APP). In forma solubile è un normale prodotto metabolico ed è presente nel fluido cerebrospinale e nel siero. Sembra ormai accertato che la formazione di fibrille amiloidi derivanti da questo peptide abbia un ruolo cruciale nel morbo di Alzheimer. In vitro, il processo di fibrillazione sembra essere fortemente influenzato dalla presenza di ioni metallici [Bush et al., 1994]. Inoltre, grandi concentrazioni di ioni metallici sono state riscontrate nelle placche senili tipiche del morbo di Alzheimer. In questo contesto, lo studio dei processi di aggregazione del peptide bA in presenza di ioni metallici presenta un notevole interesse intrinseco.

Per quanto riguarda la strategia generale del progetto, poichè in letteratura vengono riportati risultati contraddittori per sistemi metallo-peptide simili, sarà posta la massima attenzione nel protocollo di preparazione dei campioni e le misure sperimentali saranno portate avanti in stretta sinergia tra le tre Unità di Ricerca coinvolte. A questo scopo sarà necessaria una efficiente coordinazione con le tre unità partecipanti al progetto per lavorare su "campioni paralleli" in modo che gli stessi campioni siano sottoposti a misure diverse.

In particolare:

- Verranno raccolti dati sperimentali con differenti tecniche sperimentali (vedi quanto sotto riportato) su campioni preparati con lo stesso protocollo sperimentale o che differiscano solo per fattori di diluizione.

- Sfruttando la recentemente acquisita capacità di sintesi di peptidi in situ (Trento), piccole porzioni dei peptidi amiloidi e loro varianti potranno essere sintetizzate. In questo modo potremo studiare peptidi differenti in presenza di metalli differenti (per esempio peptidi amiloidi in presenza di Zn(II) o Cu(II) e PrP in presenza di Mn (II) o Cu(II) o altri metalli).

Criteri di verificabilità

Il progetto prevede uno studio condotto su proteine modello che si inquadra nella complessa problematica della formazione di aggregati proteici. L'integrazione dei risultati ottenuti dalle tre unità partecipanti al progetto, che utilizzano metodi d'indagine sperimentali complementari, potrà fornire utili informazioni per la comprensione dei meccanismi di formazione degli stati aggregati di proteine coinvolti in numerose patologie degenerative. La buona riuscita del progetto consisterà nella comprensione, il più dettagliata ed esaustiva possibile, dei vari processi coinvolti nell'aggregazione proteica.

In particolare, l'obiettivo minimale è portare a termine:

- 1) misure sperimentali sulle cinetiche di crescita degli aggregati e i relativi cambiamenti conformazionali delle singole proteine, mediante l'uso della spettroscopia di assorbimento e fluorescenza nell'Uv-Vis, della spettroscopia di assorbimento infrarossa (FTIR), della tecnica del Light Scattering e del Dicroismo Circolare;*
- 2) misure sperimentali sulle modificazioni nell'intorno degli ioni metallo durante l'evoluzione del processo di aggregazione, tramite la spettroscopia di assorbimento dei raggi-X (XAS) e la spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica (EPR);*
- 3) misure sperimentali sulla tipologia degli aggregati ottenuti, tramite la tecnica della Microscopia a forza atomica (AFM).*
- 4) misure sperimentali sugli effetti dello ione rame sia sulla cinetica di formazione che sulle proprietà strutturali, dinamiche e termodinamiche degli stati aggregati.*

La verificabilità del progetto si baserà sulla pubblicazione dei risultati ottenuti su riviste scientifiche del settore e sulla presentazione a Congressi Nazionali ed Internazionali. Sono previste, inoltre, sin dalla fase iniziale del progetto una serie di riunioni scientifiche mirate allo scambio di informazioni sulle attività svolte dalle tre unità coinvolte e al coordinamento delle attività da svolgere.

Elenco delle Unità di Ricerca

Sede dell'Unità	Università degli Studi di PALERMO
Responsabile Scientifico	Maurizio LEONE
Finanziamento assegnato	Euro 24.000

Compito dell'Unità

Sede dell'Unità	Università degli Studi di ROMA "Tor Vergata"
Responsabile Scientifico	Silvia MORANTE
Finanziamento assegnato	Euro 24.000

Compito dell'Unità

Sede dell'Unità Università della CALABRIA
Responsabile Scientifico Luigi SPORTELLI
Finanziamento assegnato Euro 25.000

Compito dell'Unità
