



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

**SINTESI, MECCANISMO D'AZIONE E APPLICAZIONI DEI VELENI
DEL RAGNO ATRAX ROBUSTUS**

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Laureando: Joseph Scapin

Nr. Matricola 1225355

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE	
1.1) Premessa.....	<i>pagina 2</i>
1.2) Tassonomia.....	<i>pagina 2</i>
1.3) Anatomia.....	<i>pagina 3</i>
1.4) Etologia.....	<i>pagina 3-4</i>
2. LA DELTA-ATRACOTOSSINA-Ar1a	
2.1) Ghiandole velenifere.....	<i>pagina 5-6</i>
2.2) Sintesi.....	<i>pagina 6-8</i>
2.3) Struttura.....	<i>pagina 8-9</i>
2.4) Meccanismo d'azione.....	<i>pagina 9-12</i>
2.5) Sintomatologia.....	<i>pagina 12-13</i>
2.6) Antidoto.....	<i>pagina 13</i>
3. IL PEPTIDE Hi1a	
3.1) Struttura.....	<i>pagina 14-15</i>
3.2) Sintesi.....	<i>pagina 15-18</i>
3.3) Meccanismo d'azione.....	<i>pagina 19-20</i>
3.4) Proprietà farmacologiche.....	<i>pagina 20</i>
4. CONCLUSIONE.....	<i>pagina 21</i>
5. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	<i>pagina 22</i>

1. INTRODUZIONE

1.1) Premessa

Fin dalle prime scoperte la natura è sempre stata, per l'intelletto umano, spunto e fonte d'ispirazione, nonostante gli studi e i progressi fatti essa rappresenta tutt'ora un rompicapo che non smette di fornire funzionali soluzioni atte al miglioramento delle nostre vite. L'analisi non superficiale di ciò che ci circonda può portare alla scoperta di macrostrutture molecolari ottenute in milioni di anni, tramite processi evolutivi in grado di risolvere le odierne problematiche.

L'assunto dell'elaborato mette in evidenza l'affascinante complessità e versatilità posseduta dai veleni animali. Superando di fatti il timore ancestrale che queste specie hanno sempre creato in noi, è possibile scoprire un mondo di enzimi e proteine estremamente complessi e specifici provenienti da molteplici famiglie di aracnidi e rettili. Strutture molecolari che hanno un notevole e intenso impatto sulla medicina e la farmacologia odierna.

In questa tesi è presente uno studio specifico del ragno *Atrax Robustus*, comunemente noto come il ragno dei cunicoli, seguito da un'analisi mirata agli effetti nocivi del veleno, e un'indagine sulla possibile efficacia in campo medico.

1.2) Tassonomia

I ragni dei cunicoli sono artropodi (phylum Arthropoda), della classe Arachnida, l'ordine Araneae (ragni) e del sottoordine Mygalomorphae (ragni della botola e della ragnatela a imbuto). Essi comprendono 35 specie in due generi, *Atrax* e *Hadronyche*, collocati all'interno della sottofamiglia *Atracinae*, famiglia *Hexathelidae*^[1].

1.3) Anatomia

Le dimensioni del ragno dei cunicoli lo situano tra i ragni medio-grossi, con una lunghezza corporea variabile da 1 a 5 cm (Fig. 1). Le differenze all'interno della specie dipendono dal sesso, le femmine solitamente più grandi sono più longeve del maschio che però presenta arti più lunghi e speroni sporgenti utilizzati durante l'accoppiamento. L'estensione degli otto arti raggiunge, per entrambi, i 6 centimetri; i cheliceri, invece, estremamente sviluppati, arrivano a 6 millimetri di lunghezza conseguendo in un morso (straziante) doloroso.^[1]



Fig 1: Ingrandimento del ragno Atrax Robustus

In entrambi i sessi la colorazione varia da nero a marrone scuro mentre l'aspetto del cefalotorace e dell'addome risulta lucido, liscio e pressoché glabro; l'addome termina caudalmente con i caratteristici seritteri (o ghiandole sericigene) prominenti e affusolati.^[2]

1.4) Etologia

Diffusi unicamente nel Sud-Est Australiano, in particolare nel Queensland, nel South West Wales e in Tasmania, sono presenti anche in una piccola porzione dell'isola di Flinders.

Vengono inoltre chiamati Ragni dalla tela a imbuto per la particolare struttura assunta dalle loro tane. Quest'ultime, costituite da due entrate, donano alla struttura finale una conformazione a T o a Y e giungono ad una profondità variabile tra i venti e i sessanta centimetri



Fig. 2: Zone di diffusione del ragno Atrax Robustus

totali. Prediligono ambienti umidi ad alte temperature, sono animali notturni, che presentano un

comportamento aggressivo mostrando gli imponenti cheliceri durante l'attacco; il suo temperamento e le sue abitudini s'inaspriscono durante il periodo più caldo dell'anno, ciò è dovuto all'organizzazione in colonie che porta i maschi, nella stagione dell'accoppiamento, a migrare tra una colonia e l'altra. Quasi esclusivamente imputato al maschio, il morso, non è quasi mai singolo ma viene ripetuto dalle tre alle cinque volte, inoltre grazie alle dimensioni e alla potenza delle zanne è in grado di oltrepassare anche tessuti spessi. La presenza del veleno, altamente tossico per l'uomo, porta alla manifestazione dei sintomi nei 15-20 minuti successivi al morso, portando alla morte dell'individuo entro i tre giorni. Dagli inizi del 1900 fino al 1981 sono stati confermati 13 casi di morti causate dall'Atrax Robustus, considerato ad oggi uno tra i ragni più pericolosi per l'essere umano. Dalla formulazione nel 1981 dell'antidoto, però, non sono più state registrate morti causate dal ragno dei cunicoli e il numero di attacchi è in costante diminuzione.^[3]



Fig. 3: Immagine di una tana di Atrax Robustus, il ragno deve il suo nome di ragno dei cunicoli alla particolare struttura e conformazione di questa.

2. LA DELTA-ATRACOTOSSINA-Ar1a

La tossina che rende questo ragno così pericoloso è la delta-atracotossina-Ar1a (δ -ACTX-Ar1a), una neurotossina che colpisce i canali di sodio voltaggio-dipendenti. Si tratta di una piccola proteina di 42 amminoacidi.

La tossicità è determinata inoltre dal sesso del ragno. Il maschio infatti risulta avere una concentrazione di atracotossina dalle cinque alle sei volte superiore a quella della femmina. Questo fenomeno è probabilmente dovuto alla necessità di potersi difendere da grandi predatori durante le migrazioni dalla tana nel periodo dell'accoppiamento. Questa teoria è rafforzata dal fatto che la femmina della specie consuma più cibo. Pertanto l'alta concentrazione di atracotossina nei maschi non sembra avere un ruolo nella cattura delle prede.^[4]

Il motivo della sua letalità così specifica nell'uomo e nei primati risulta ad oggi ancora un mistero, la neurotossina risulta infatti estremamente blanda nei confronti degli altri mammiferi portando in molti casi alla letalità solo con dosi molto superiori di quelle necessarie ad uccidere un uomo.^[5]

2.1) Ghiandole Velenifere

Le ghiandole velenifere localizzate nei cheliceri raggiungono approssimativamente 5mm di lunghezza (Fig. 4). Sono provviste di dotti veleniferi che si estendono attraverso esse e che dispongono di aperture ai loro vertici. Sono probabilmente originate come ghiandole ausiliarie a quelle per la digestione esterna. Durante l'evoluzione le ghiandole velenifere e il sistema di distribuzione si sono sviluppati fino a divenire altamente funzionali. La maggior parte dei ragni dimostra capacità nel dosare il veleno in base alla taglia, movimenti e grado di minaccia della preda. Tale comportamento risponde a strategie di ottimizzazione in quanto la produzione stessa del veleno ha un costo in termini energetici.

All'interno delle ghiandole velenifere vi sono cellule secretorie altamente specializzate nella produzione del veleno stesso, che verrà poi rilasciato grazie a strati muscolari che avvolgono le stesse ghiandole e che comprimendole ne controllano la distribuzione. Il veleno nel lume ghiandolare verrà secreto tramite vescicole per secrezione apocrina.^[6]

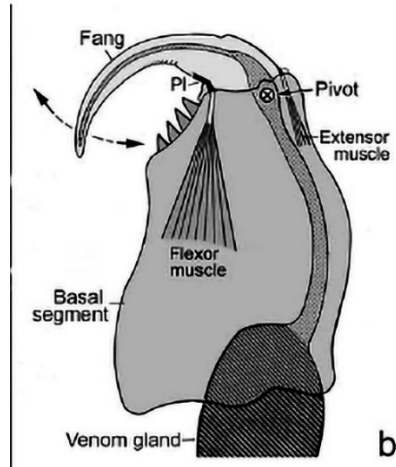


Fig. 4: Ingrandimento del chelicere del ragno con indicate le sue componenti

2.2) Sintesi

Nell’*Atrax Robustus* la sintesi peptidica avviene a livello delle ghiandole velenifere dove con l’utilizzo di appositi enzimi parte la sintesi proteica che si divide in Trascrizione e Traduzione.

Il Folding Proteico Ossidativo è stato ottenuto in laboratorio per la prima volta nel 2003 nell’Institute for Molecular Bioscience dell’Università del Queensland. La tecnica utilizzata è quella della sintesi peptidica su fase solida con gruppi protettori Boc.^[7]

L’assemblaggio della catena del peptide è eseguito su un sintetizzatore peptidico utilizzando le caratteristiche chimiche delle anidridi asimmetriche e degli esteri attivi come attivatori del gruppo carbossilico.

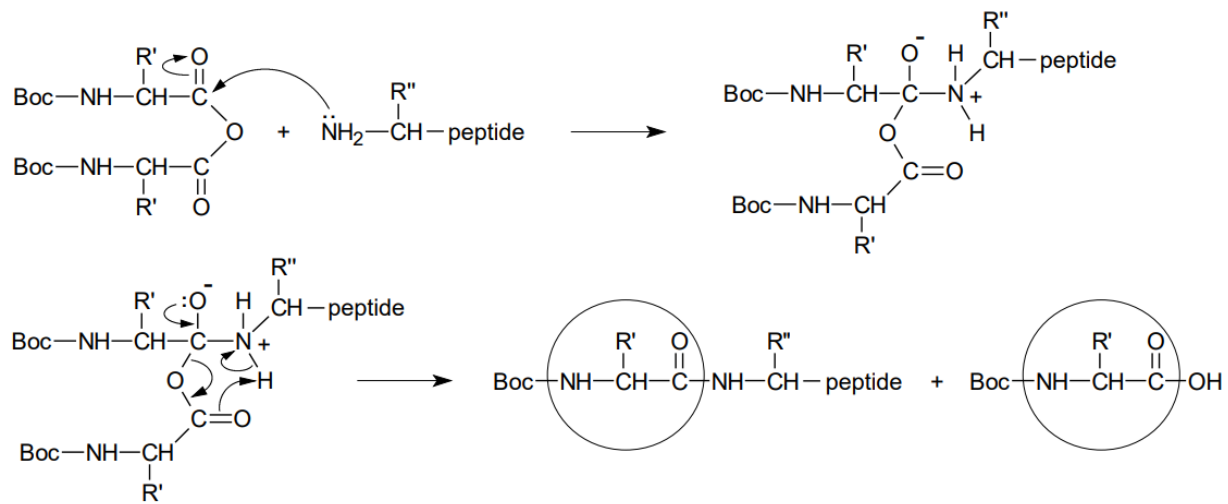


Fig. 5: Reattività chimica delle anidridi simmetriche

L'anidride simmetrica può subire amminolisi quando viene fatta reagire con il gruppo amminico del peptide per la formazione del legame ammidico (Fig. 5). . Il carbonile fornisce assistenza anchimerica alla reazione strappando l'H⁺ del gruppo amminico. Di conseguenza non l'azoto non risulta più il miglior gruppo uscente ma lo diventa il carbossile del secondo Boc-amminoacido.

L'estere attivo viene generalmente prodotto per reazione tra HOBt (idrobenzotriazolo) e un amminoacido modificato, legandosi al gruppo carbossilico (Fig. 6 A). L'estere attivo ottenuto attiva il gruppo carbossilico tramite assistenza anchimerica (Fig. 6 B)

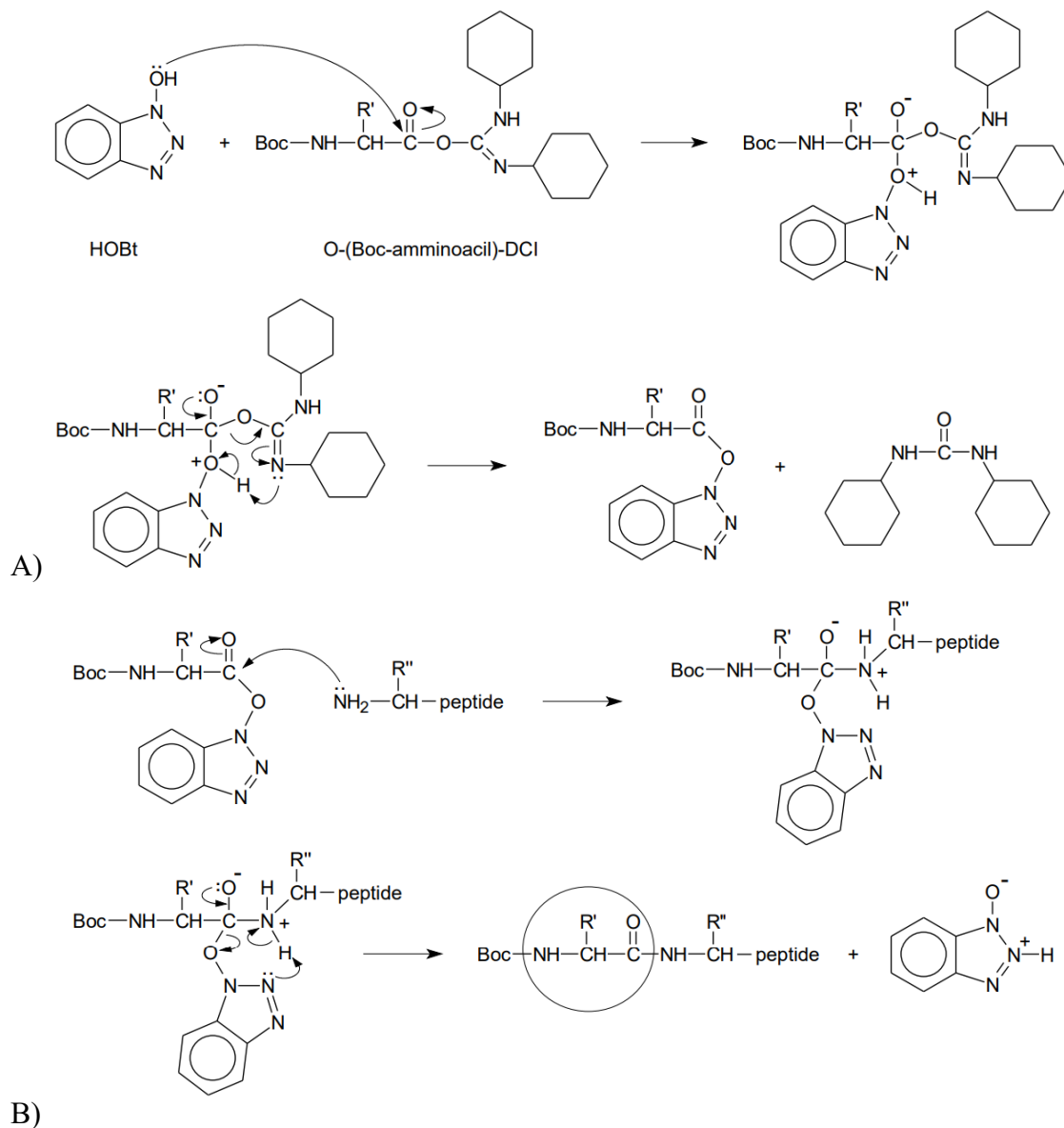


Fig. 6: A) Meccanismo di sintesi dell'estere attivo e B) meccanismo di attivazione di quest'ultimo nei confronti del gruppo carbossilico

Il gruppo di protezione Boc viene quindi rimosso utilizzando il 100% di TFA e DMF. Tramite l'utilizzo di lavaggi sono stati poi rimossi i veri gruppi protettori e il peptide è stato fatto precipitare con etere freddo e infine sciolto con TFA in soluzione acquosa (concentrazione pari a 1-2 %).^[7]

2.3) Struttura

La delta-atracotossina-Ar1a è un peptide composto da 42 residui amminoacidici, di cui otto Cisteine, con struttura terziaria complessa. È caratterizzata dalla presenza inusuale di tre Cisteine contigue (rispettivamente in posizione 14, 15, 16) e la presenza, inoltre, di queste in posizione sia N- che C- terminale (Fig 7).^{[8][9]}

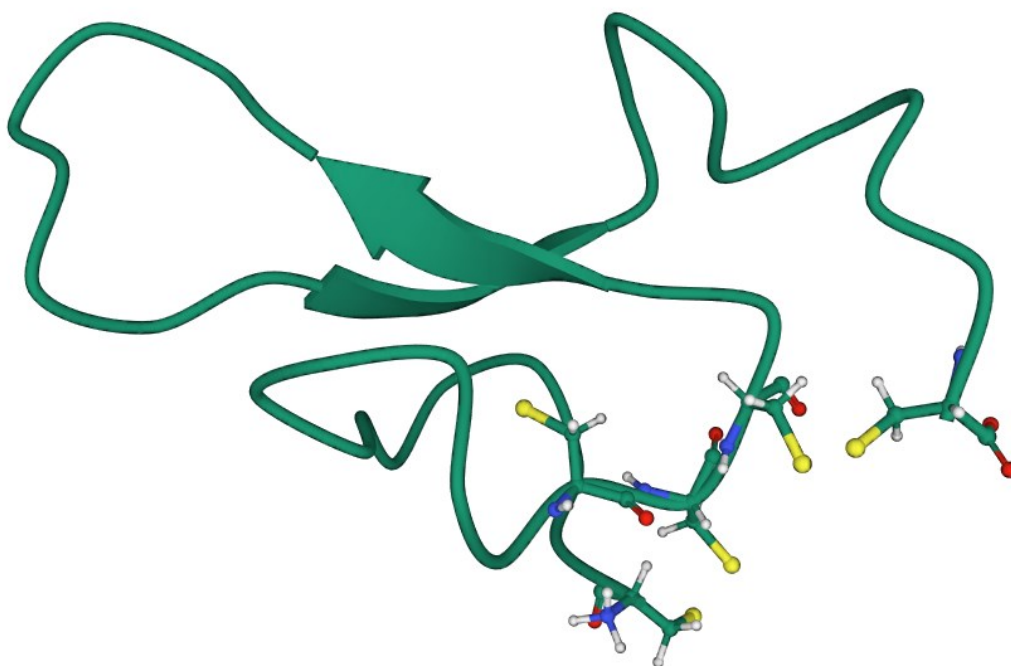


Fig. 7: Struttura tridimensionale con folding proteico specifico del polipeptide Ar1a ottenuto tramite spettroscopia NMR (PDB Protein Data Bank) con evidenziate le tre Cisteine contigue centrali e le cisteine N-terminale e C-terminale

La struttura nativa è fortemente determinata dalla presenza di queste cisteine che tramite quattro ponti disolfuro modella la struttura tridimensionale. La sequenza di legami disolfuro segue un pattern standard 1-4, 2-6, 3-7, 5-8 (Fig.8) già individuato nelle proteine di veleni provenienti da

serpenti (echistatina) e scorpioni (clorotossina). Le tre Cisteine vicinali determinano un motivo ICK (Inhibitor Cystein Knot), due disolfuri formano un anello attraverso il quale passa il terzo legame disolfuro (che collega la 3a e la 6a cisteina nella sequenza), formando un nodo . Ciononostante, nessuna delle citate proteine presenta legami tra cisteine così distanziate, i ponti disolfuro si instaurano tra i residui 1-15, 8-20, 14-31, 16-42.^[7]

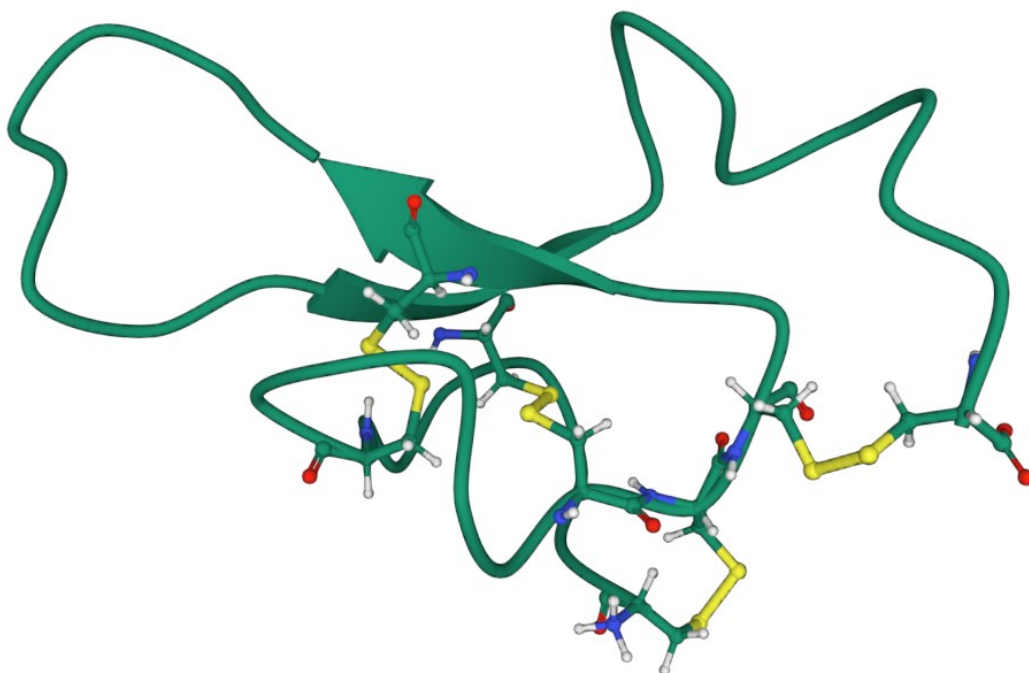


Fig. 8: Struttura tridimensionale con folding proteico specifico del polipeptide Ar1a ottenuto tramite spettroscopia NMR (PDB Protein Data Bank) con evidenziati i quattro ponti disolfuro e il dominio ICK

2.4) Meccanismo d'azione

I veleni dei ragni agiscono in base al principio d'azione che seguono. In particolare vengono distinti in due classi precise: neurotossici o necrotici, ovvero se inibiscono o alterano le funzioni del sistema nervoso o se provocano la necrosi interna o dei tessuti circoscritti alla lesione.

In particolare, il veleno dell'*Atrax Robustus* possiede caratteristiche neurotossiche, dovute alla presenza della delta-atracotossina-Ar1a responsabile per gli effetti neurotossici e letali nell'uomo e nei primati; non sono stati registrati effetti sul sistema nervoso di altri mammiferi.

La delta-Atracotossina colpisce i canali sodio voltaggio-dipendenti (Fig. 9). Le proprietà essenziali dei canali del sodio sono l'attivazione, l'inattivazione e il trasporto/selettività ionica e la loro attività è regolata dal potenziale di membrana.

Sono state identificate neurotossine che interferiscono selettivamente con ciascuna di queste funzioni essenziali. I siti funzionali appartenenti ai canali presentano forte selettività nei confronti di specifici tipi di interazione, sia rispetto a legami diretti che a livello allosterico. Pertanto, il sito 1 lega le tossine che interferiscono con il trasporto ionico occludendo fisicamente il poro. Le tossine che legano il sito 2 sono caratterizzate dagli alcaloidi idrofobici, si legano alle regioni citoplasmatiche e intramembranose del canale e ne provocano l'attivazione persistente. I siti 3 e 4 legano le tossine polipeptidiche di scorpioni, anemoni di mare e ragni, come nel caso da noi studiato, e sono indicati come modificatori del gating. L'occupazione del sito 3 da parte di tali tossine provoca la destabilizzazione dello stato inattivato del canale in modo tale da provocare l'interruzione della normale transizione di inattivazione rapida determinando un marcato prolungamento dei potenziali d'azione dei tessuti eccitabili compresi quelli del muscolo cardiaco e scheletrico e del nervo.^[9]

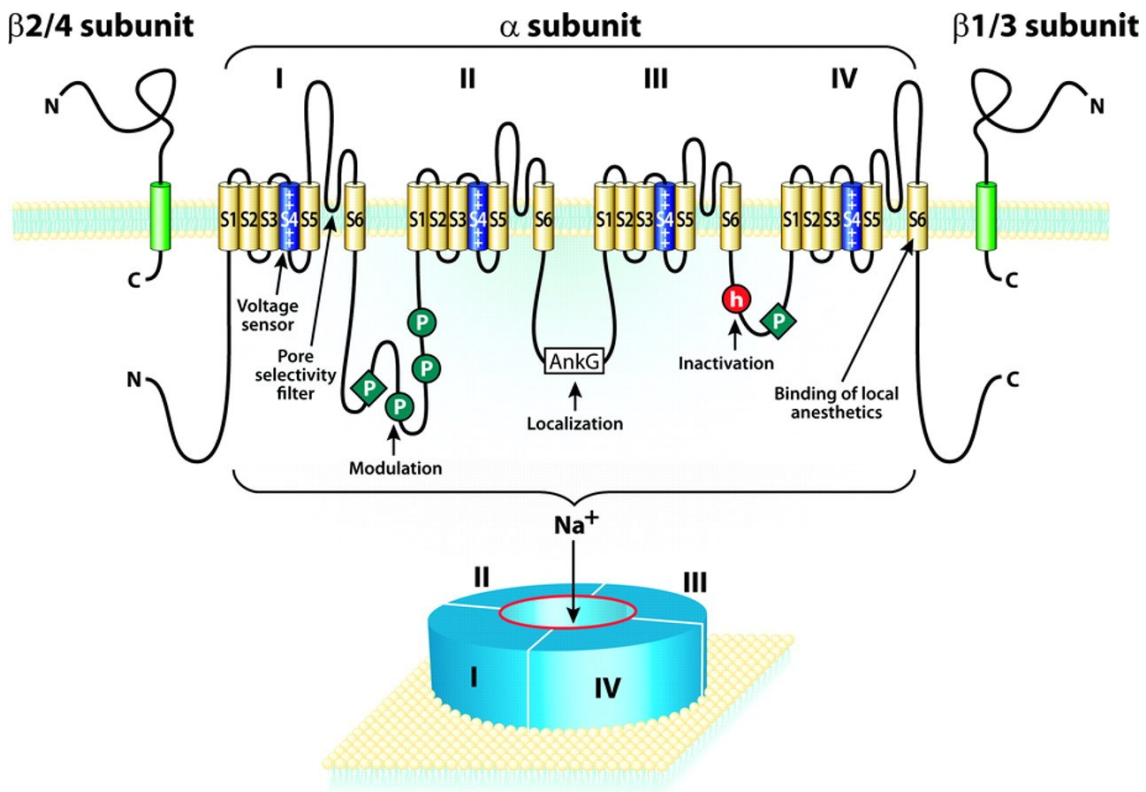


Fig. 9: Struttura schematica de canale del sodio voltaggio-dipendente con evidenziate i vari domini (I, II, III e IV) e le varie sottostrutture.

I canali sodio potassio presentano una struttura tridimensionale complessa che se attaccata provoca una modifica allosterica con conseguente modifica nel funzionamento.

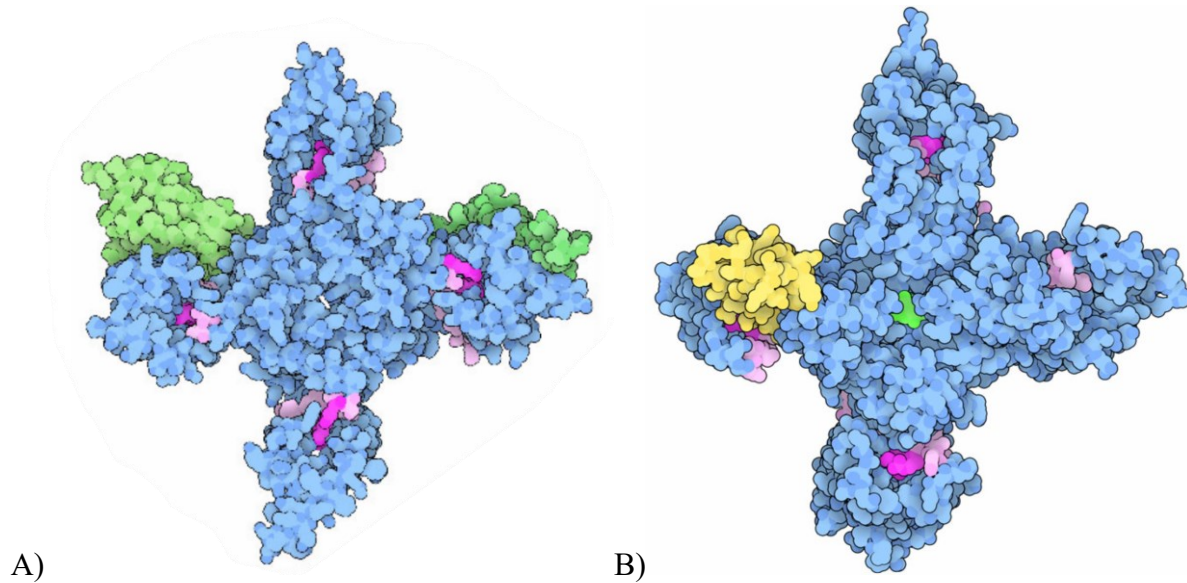


Fig. 10: Struttura tridimensionale con folding proteico specifico del A)canale sodio voltaggio-dipendente ottenuto tramite spettroscopia NMR (PDB Protein Data Bank) e B)della variazione conformazionale dovuta all'attacco della tossina di ragno evidenziata in giallo

Oltre al fattore tridimensionale la tossicità della tossina è stata imputata in particolare a tre residui amminoacidici: Arg-5, Lys-3 e Asp-13.

Tramite uno studio è stato appurato che una modifica della delta-Atracotossina con sostituzione di questi amminoacidi provoca una diretta interruzione nel suo funzionamento. Oltre a ciò, risulta di vitale importanza nella tossicità la rigidità conformazionale data dai quattro ponti disolfuro.^[9]

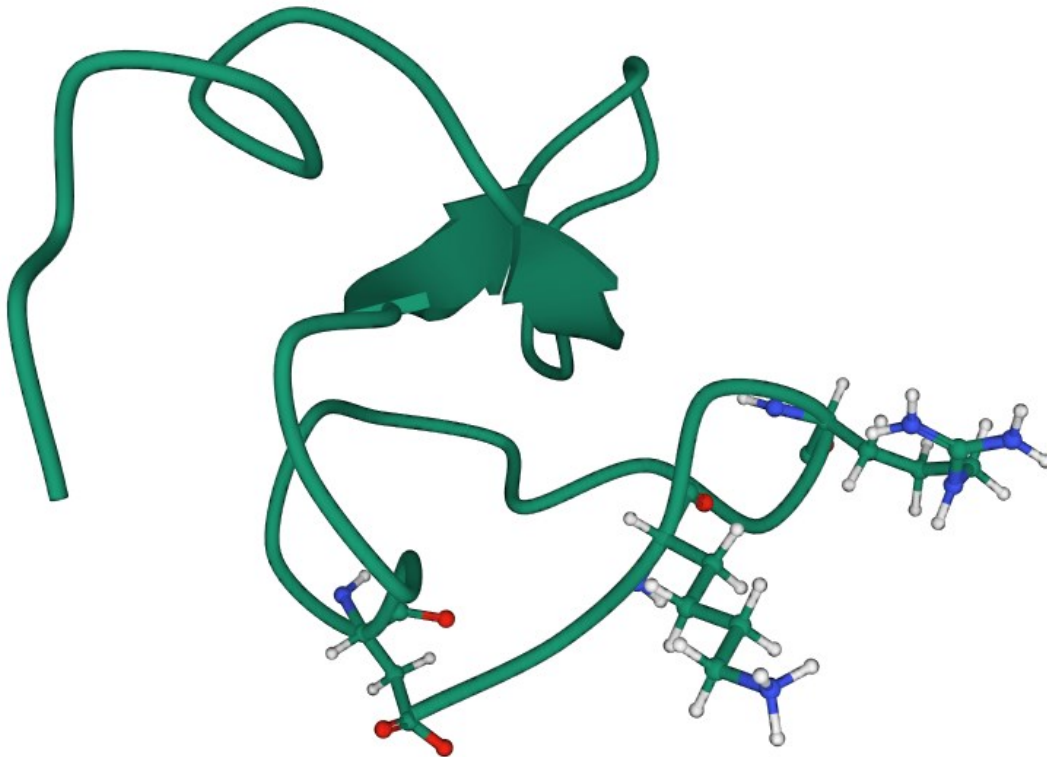


Fig. 11: Struttura tridimensionale con folding proteico specifico del polipeptide Ar1a ottenuto tramite spettroscopia NMR (PDB Protein Data Bank) con evidenziati da sinistra a destra Asp-13, Lys-3, Arg-5

2.5) Sintomatologia

Il dolore a seguito di un morso del ragno dei cunicoli è inizialmente dovuto ai cheliceri in grado di lasciare chiari segni a pochi millimetri di distanza. A livello topico può, inoltre, svilupparsi un eritema, piuttosto che infezioni cutanee, in caso i cheliceri siano infetti. Casi di necrosi dei tessuti non sono stati registrati.

Una volta avvenuto l'avvelenamento, invece, i maggiori rischi sono: disturbi cardiovascolari, edema polmonare, alterazioni acido-base, poiché questo causa un complesso di malattie sistemiche che coinvolgono il sistema cardiovascolare, polmoni, sistema nervoso centrale e periferico.

La dose di veleno letale per l'uomo è ancora sconosciuta, ma un esperimento effettuato su macachi, ha rilevato a seguito di somministrazione endovenosa di 5-30 microgrammi/ kg di veleno in 5 minuti disturbi respiratori dispnea e apnea, aumento pressione sanguigna e frequenza cardiaca

seguita da una grave ipotensione (pressione sanguigna sotto i 50 mmHg) o morte dovuta a un collasso respiratorio e circolatorio entro 196 minuti. Altri segni clinici, rilevati sono aumento lacrimazione, copiosa salivazione, fascicolazione generalizzata dei muscoli scheletrici, spasmi muscolari e in parallelo aumento della temperatura corporea, aumento dell'attività dei nervi autonomici e motoneuroni, disorientamento e confusione che porta a uno stato d' incoscienza. Si tratta quindi della principale tossina delta-atracotossina che interferisce con la trasmissione neuronale di gran parte del sistema nervoso. Nei bambini gli effetti dell'avvelenamento sono più rapidi, per cui è necessario un tempestivo primo soccorso.^[2]

2.6) Antidoto

L'antidoto è stato preparato epurificato e isolato da conigli, immunizzati dal veleno di un maschio di *Atrax Robustus*. Questo preparato ha mostrato, in vitro, capacità di neutralizzare il veleno del maschio, in rapporto 97 microgrammi di IgG su 1 microgrammo di veleno. Altri veleni di ragni appartenenti al genus *Atrax* sono stati neutralizzati in vitro grazie allo stesso antidoto. Il siero raccolto in 55 mL di sangue da un coniglio immunizzato rende in totale 1.1869 g di IgG. Questa quantità è un antidoto sufficiente per neutralizzare in vitro una media di 67 ragni. Questi risultati suggeriscono che la preparazione di un antidoto per umani è ora attuabile. L'antidoto ha mostrato efficacia anche nel neutralizzare veleno nelle scimmie anche quando era pre-mischiato con il veleno prima dell'iniezione, o se somministrato 10 minuti dopo l'iniezione di veleno. Questa è la prima volta che neutralizzazione in-vitro e in-vivo di questo veleno è stata utilizzata nelle scimmie.^[10]

3. IL PEPTIDE Hi1a

Il peptide Hi1a, che appartiene al veleno del ragno dei cunicoli australiano, possiede una complessa struttura terziaria. Dispone di proprietà cardio e neuro protettive dovute alla potente inibizione di canali ionici acido-sensibili 1a (ASIC1a).^[11]

Ogni anno circa sei milioni di persone muoiono a causa di ictus, mentre cinque milioni di sopravvissuti restano con disabilità permanenti. Non ci sono infatti farmaci disponibili per proteggere il cervello dal danno neuronale causato dalla privazione di ossigeno che si verifica nel corso di un ictus ischemico. I danni neuronali, inoltre, spesso innescano un progressivo declino delle funzioni cognitive e duplicano il rischio di demenza nei sopravvissuti. L' improvvisa diminuzione del pH cerebrale, conseguente all' ictus, attiva i canali ionici 1a acido-sensibili; studi dimostrano come l' inibizione di questi canali promulgata dal peptide HI1a attenuerebbero massicciamente i danni cerebrali, successivi all'ictus migliorando le conseguenze anche se la somministrazione avvenisse entro le 8 ore dall'ictus.^[12]

3.1) Struttura

Il peptide Hi1a è composto da 76 residui amminoacidici con una struttura terziaria complessa con sei ponti disolfuro che conferiscono la forma allotropica e che definiscono due ICK (inhibitor cystein knot) (Fig.12). Sono presenti, inoltre, due coppie di foglietti β antiparalleli.

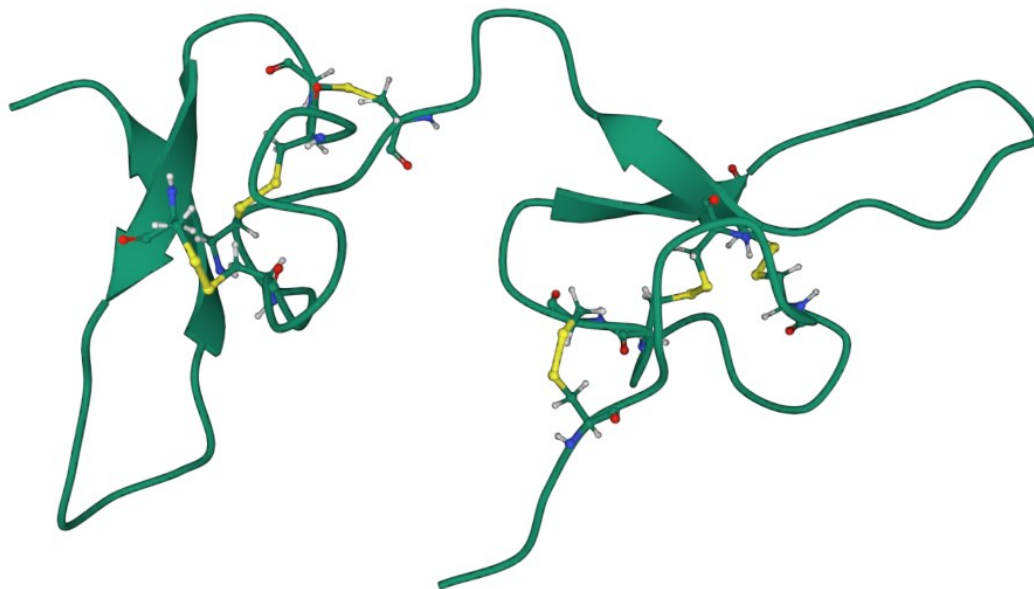


Fig. 12: Struttura tridimensionale con folding proteico specifico del polipeptide Hi1a ottenuto tramite spettroscopia NMR (PDB Protein Data Bank) con evidenziati i sei ponti disolfuro che determinano i due domini ICK

È interessante inoltre evidenziare la presenza di un loop posto tra le due macrostrutture principali, che permette una flessibilità strutturale elevata.

Come molte proteine i gruppi apolari vengono ripiegati nella parte più interna mentre quelli polari vengono rivolti verso l'esterno. Ne è un esempio il residuo di fenilalanina presente nel β loop che sta nascosto all'interno della struttura, lontano dall'ambiente acquoso polare (Fig. 13).



Fig. 13: Struttura tridimensionale con folding proteico specifico del polipeptide Hi1a ottenuto tramite spettroscopia NMR (PDB Protein Data Bank) con evidenziato il linker loop con gli amminoacidi da sinistra a destra :Phe-40, Gly-39 e Pro-38

3.2) Sintesi

Uno studio pubblicato nell'ottobre del 2021^[11] dimostra la possibilità e l'efficacia della sintesi in laboratorio del peptide Hi1a.

Inizialmente è stato tentato un approccio diretto per la sintesi dell'intera catena amminoacidica con metodo SPPS che ha però portato a diversi troncamenti nella catena.

È stata quindi indagata la composizione al fine di individuare potenziali siti in cui il peptide potesse essere assemblato con la tecnica dell'assemblaggio peptidico convergente. La zona del β loop,

vicino al centro del peptide, è sembrata favorevole come sito di disconnessione per l'assemblaggio il residuo di Cisteina-41.

Questo troncamento porta ad ottenere due frammenti peptidici utili per un assemblaggio: un frammento di Hi1a (41-76) con un residuo Cys-N-terminale e un frammento di Hi1a (1-40) con un residuo Phe-C-terminale (Fig. 14).

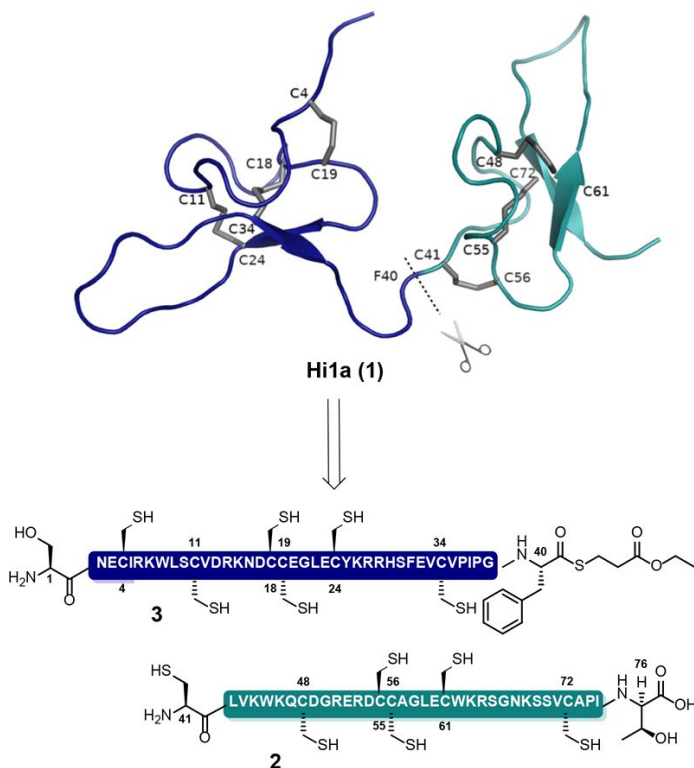


Fig. 14: Retrosintesi di Hi1a 1 con sito di legatura chimica tra Phe40 e Cys41, Si evidenzia l'unione tra il frammento C-terminale di Hi1a(41-76) 2 recante un residuo di cisteina N-terminale e il frammento N-terminale Hi1a(1-40) 3 contenente un tioestere C-terminale

I frammenti 2 e 3 sono stati sintetizzati tramite Fmoc-strategy SPPS(Fmoc = fluorenil metilossicarbonile, un gruppo protettore che viene utilizzato con le ammine). Un esempio di preparazione di Fmoc-amminoacidi è riportato in Figura 15.

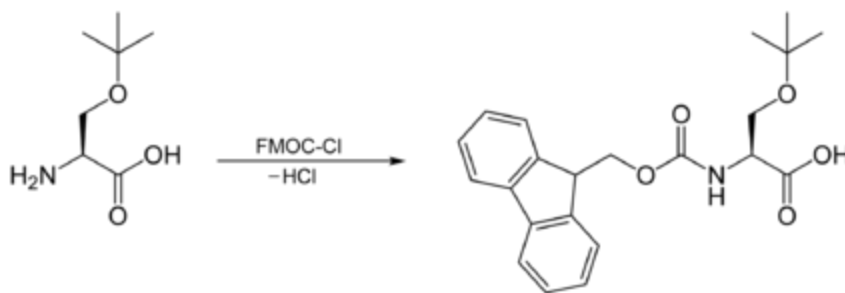


Fig. 15: Esempio di reattività del gruppo protettore fmoc con sintesi Fmoc-L-Ser(OtBu)-OH

Il peptide 2 è stato sintetizzato con aspartato (Asp)-49 e glicina (Gly)-50 incorporati come dipeptide per limitare la formazione di aspartimmide. Dopo la scissione e la purificazione mediante HPLC a fase inversa, il frammento 2 è stato ottenuto con una resa del 16%.

Il peptide 3 è stato sintetizzato alla stessa maniera. Il residuo di Phe-C-terminale è stato tioesterificato per ottenere l'estremità reattiva all'assemblaggio peptidico desiderato. Dopo la purificazione è stato ottenuto il tioestere peptidico con una resa del 10% (Fig. 16).

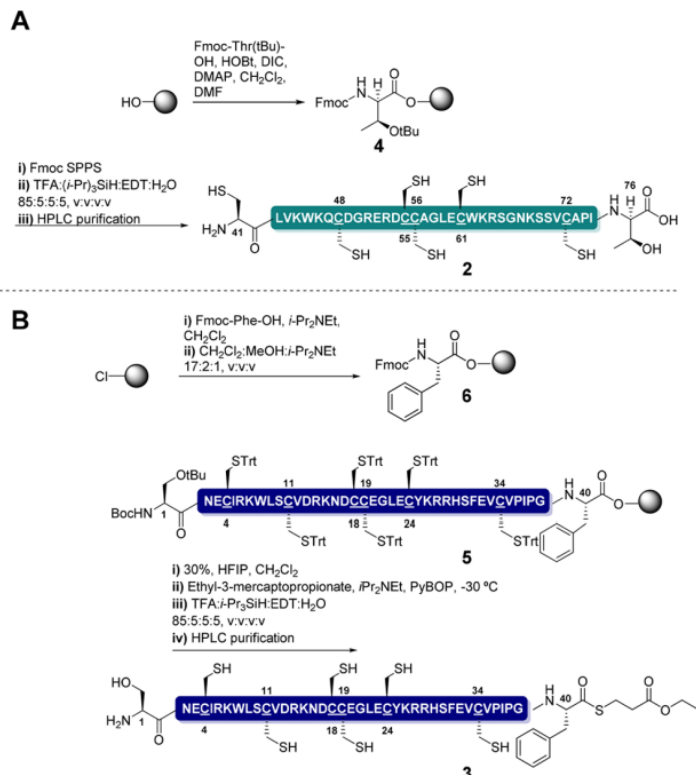


Fig. 16: A) Sintesi del frammento di Hi1a (41-76) tramite SPPS e B) sintesi del frammento tioesterificato di Hi1a (1-40) tramite SPPS

Una volta ottenuti i frammenti peptidici ci si è quindi concentrati sull'assemblaggio peptidico tramite NCL (Native Chemical Ligation) (Fig 17). A tal fine, la reazione è stata inizialmente eseguita dissolvendo i frammenti 2 e 3 in un tampone di natura denaturante. Dopo la purificazione HPLC l'intera lunghezza del polipeptide Hi1a è stata ottenuta con una resa del 55%.

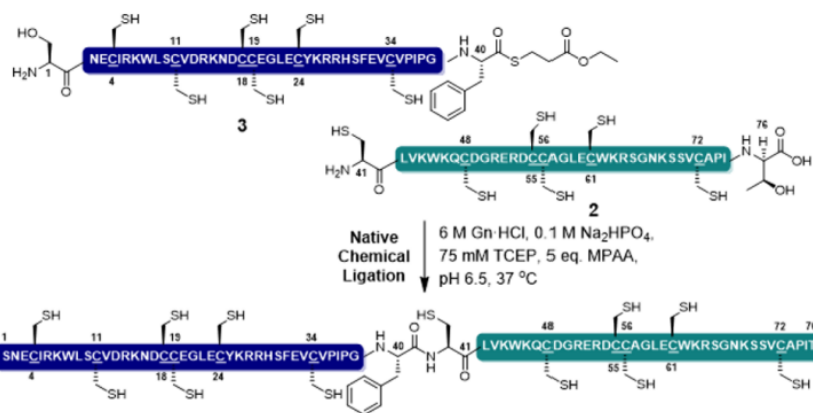


Fig. 17: Procedura di assemblaggio peptidico tramite NCL (Native Chemical Ligation)

Una volta ottenuta la corretta sequenza peptidica si è lavorato per ottenere il giusto folding proteico tramite la procedura di folding ossidativo e lavorando sotto precise condizioni a causa della grande variabilità conformazionale che il folding dei sei ponti disolfuro poteva seguire (Fig. 18).

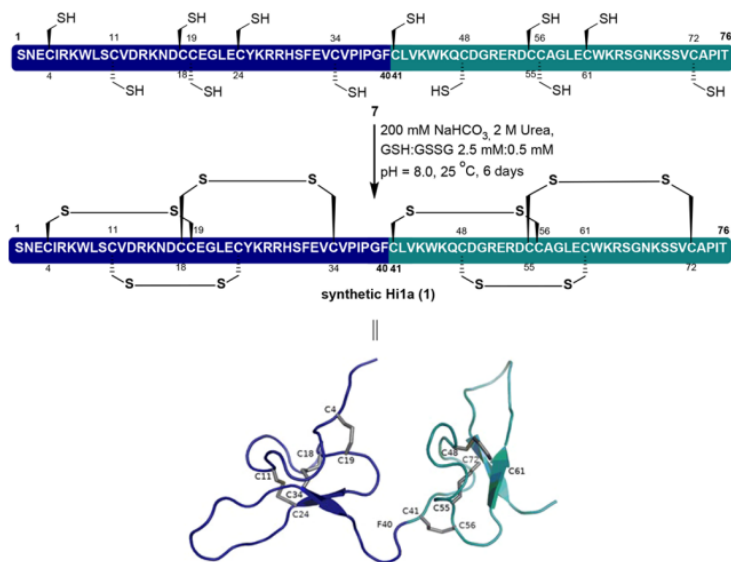


Fig. 18: Procedura di Folding proteico ossidativo

Dopo sei giorni all'interno della soluzione per il folding la corretta conformazione ottenuta è stata dimostrata dal confronto con la proteina isolata dal veleno tramite analisi di spettrometria di massa e HPLC^[11].

3.3) Meccanismo d'azione

I recettori ASIC sono canali di sodio insensibili al potenziale neuronale, attivati da protoni extracellulari permeabili al sodio, le proteine ASIC sono una sottofamiglia della super famiglia dei canali ionici. Nei mammiferi i recettori ASIC sono codificati da 5 geni che producono subunità proteiche ASIC: ASIC1, ASIC2, ASIC3, ASIC4, and ASIC5; i recettori ASIC più comuni sono i ASIC1a, e i principali presenti nel cervello dei mammiferi, mediatori chiave nel danno neuronale indotto da acidosi a seguito di un'ischemia neuronale.^[13]

Studi effettuati sul meccanismo d'azione del polipeptide hanno messo in luce la sua efficacia e la grande affinità nei confronti del recettore ASIC1a che tramite simulazioni virtuali sembrerebbe superare di gran lunga le funzionalità del peptide attualmente in uso: PcTx1.

Ciò avviene nonostante la grande similarità strutturale tra i due polipeptidi, in particolare nel dominio simile a PcTx1 N-terminale, che contiene molti dei principali residui farmacofori di PcTx1 (Fig)

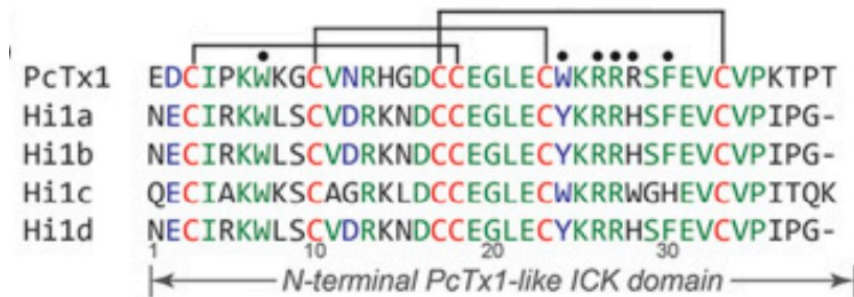


Fig. 19: Vengono evidenziate le similitudini nella sequenza amminoacidica di PcTx1 e Hi1a

In opposizione a queste somiglianze si pone l'attività dei due polipeptidi che agiscono in maniera differente. Mentre infatti PcTx1 si lega direttamente alla tasca acida del recettore con un'inibizione completamente dipendente dal pH, Hi1a presenta una inibizione non competitiva e indipendente dal pH. Inoltre è stato dimostrato che Hi1a induce un ritardo nell'attivazione di ASIC1a, suggerendo che si lega e stabilizza lo stato chiuso del canale. Questa è una modalità d'azione sorprendentemente diversa da quella di PcTx1, che stabilizza lo stato desensibilizzato di ASIC1a. Da questi dati si può dedurre che Hi1a rallenta i riarrangiamenti conformazionali di ASIC1a che stanno alla base del suo passaggio dallo stato di riposo a uno stato di conduzione.^[13]

A causa degli studi ancora in atto non è stato ancora individuato il preciso meccanismo d'azione di Hi1a anche se si è scoperto che questo è direttamente legato non solo ai due domini ICK ma anche al fatto che questi siano connessi tra loro da legami covalenti.

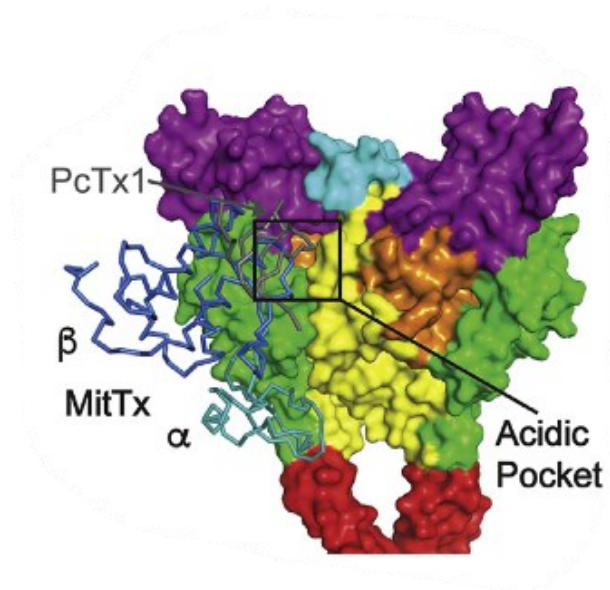


Fig. 20: Struttura terziaria del recettore Asic con attacco nel "acidic pocket" da parte di PcTx1

3.4) Proprietà farmacologiche

È stato dimostrato^[12] come la rimozione genetica e l'inibizione farmacologica selettiva di ASIC1a riduca la necrosi neuronale dovuta all'ictus ischemico nei roditori.

La somministrazione intracerebroventricolare a ratti di una singola piccola dose di Hi1a (2ng/kg) entro le 8 ore dall' induzione dell'ictus (tramite l'occlusione dell'arteria cerebrale centrale) ha ridotto l'entità dell'ictus lasciando ampio margine di intervento, correlato anche con un aumento delle funzioni neurologiche e motorie e alla conservazione della struttura neuronale.

Perciò, Hi1a è un potente strumento farmacologico per provare il ruolo di ASIC1a in danni neuronali mediati in ambiente acido e vari disordini neurologici; e porta alla promessa dello sviluppo di terapie per proteggere il cervello da lesioni ischemiche.

L'obbiettivo degli scienziati, ora, è quello di proseguire le ricerche e arrivare presto a delle sperimentazioni cliniche su pazienti. Il traguardo è ovviamente quello di arrivare finalmente a disporre di un farmaco efficace contro l'ictus.^[12]

4. CONCLUSIONI

Con questo elaborato si è cercato di mettere in luce la complessità e il fascino del veleno dell'*Atrax Robustus*, un ragno che nonostante il basso numero di esemplari e la ridotta zona geografica in cui vive è riuscito ad avvicinare il genere umano un po' di più verso la conoscenza del funzionamento delle neuroproteine. Partendo dallo studio anatomico dell'esemplare è stato messo in luce come, all'interno delle ghiandole velenifere, avvenga la sintesi peptidica della tossina delta-atracotossina-Ar1a e come questa sia stata poi riprodotta in laboratorio. Un approfondimento sulla struttura e come questa agisca letalmente nei primati e nell'essere umano, indirizza a una breve considerazione riguardante la purificazione dell'antidoto. Sono stati condotti anche sul peptide Hi1a, ricavato anch'esso dal veleno, che possiede, proprietà neuroprotettive. Indagini odierne ne hanno testato l'efficacia su primati e sono tutt'ora in corso ricerche per una possibile formulazione terapeutica in grado di ridurre i danni a seguito di un ictus ischemico.

5. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- [1] Bhoyain, A. M. *International Journal of Zoology and Animal Biology* **2020**, 3, issue 6
- [2] [https://inchem.org/documents/pims/animal/atrax.htm#PartTitle:14.%20%20AUTHOR\(S\),%20REVIEWER\(S\),%20DATE\(S\),%20COMPLETE%20ADDRESS\(ES\)](https://inchem.org/documents/pims/animal/atrax.htm#PartTitle:14.%20%20AUTHOR(S),%20REVIEWER(S),%20DATE(S),%20COMPLETE%20ADDRESS(ES))
- [3] <https://australian.museum/learn/animals/spiders/sydney-funnel-web-spider/>
- [4] Herziga, V.; Sunagarc, K.; Wilson, D. T. R.; Pineda, S. S.; Israel, M. R.; Dutertref, S.; McFarland, B. S.; Undheim, E. A. B.; Hodgson, W. C.; Alewood, P. F.; Lewis, R. J.; Bosmans, F.; Vetter, I.; King, G. F.; Frym, B. G. *PNAS* **2020**, 17, 24920-24928
- [5] Nicholson, G. M.; Little, M. J.; Birinyi-Strachan, L. C. *Toxicon* **2004**, 43, 587-599
- [6] Langenegger, N.; Nentwig, W.; Kuhn-Nentwig, L. *Toxins* **2019**, 11, 611
- [7] Alewood, D.; Birinyi-Strachan, L. C.; Pallaghy, P. K.; Norton, R. S.; Nicholson, G. M.; Alewood, P. F. *Byochemistry* **2003**, 42, 12933-12940
- [8] Mylecharane, E. J.; Spence, I.; Sheumack, D. D.; Claassens, R.; Howden, M. E. *Toxicon* **1989**, 27, 481-492
- [9] Blumenthal, K. M.; Seibert, A. L. *Cell Biochemistry and Biophysics* **2003**, 38, 215-237
- [10] Sutherland, S. K. *Med J Aust.* **1980**, 2, 437-441
- [11] Duggan, N. M.; Saez, N. J.; Clayton, D.; Budusan, E.; Watson, E. E.; Tucker, I. J.; Rash, L. D.; King, G. F.; Payne, R. J. *Org. Lett.* **2021**, 23, 8375-8379
- [12] <https://www.uq.edu.au/news/article/2021/07/repairing-hearts-deadly-spider-venom>
- [13] Chassagnon, I. R.; McCarthy, C. A.; Chin, Y. K. Y.; Pineda, S. S.; Keramidas, A.; Mobli, M.; Pham, V.; De Silva, T. M.; Lynch, J. W.; Widdop, R. E.; Rash, L. D.; King, G. F. *PNAS* **2017**, 114, 3750-3755