

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN BIOTECNOLOGIE  
INDUSTRIALI

CRIBI

CENTRO DI RICERCA INTERDIPARTIMENTALE PER LE  
BIOTECNOLOGIE INNOVATIVE

TESI DI LAUREA

AGGREGAZIONE AMILOIDE  
DI DOMINI STRUTTURALI DI LISOZIMA UMANO

RELATORE: PROF.SSA PATRIZIA POLVERINO DE LAURETO

CORRELATORE: DOTT.SSA ERICA FRARE

LAUREANDA: SARA ZAINA

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

# INDICE

ABBREVIAZIONI	3
RIASSUNTO	5
I. INTRODUZIONE	8
1. Lisozima	8
2. Malattie amiloidi	10
2.1. Struttura delle fibrille amiloidi	10
2.2. Meccanismo di aggregazione amiloide	14
3. Amiloidosi di lisozima umano	19
II. MATERIALI E METODI	25
1. Materiali	25
2. Metodi	25
2.1. Proteolisi limitata di lisozima	25
2.2. Purificazione ed identificazione dei frammenti proteolitici	26
2.2.1 RP-HPLC	26
2.2.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)	27
2.2.3 Spettrometria di massa	28
2.3. Analisi spettroscopiche	29
2.3.1 Assorbimento UV	29
2.3.2 Dicroismo circolare	30
2.3.3 Fluorescenza	33
2.3.4 Denaturazione termica	34
2.4. Saggio di attività del lisozima	35
2.5. Preparazione ed analisi di fibrille amiloidi	35
2.5.1 Saggio della Tioflavina T (ThT)	36
2.5.2 Microscopia elettronica	38
III. RISULTATI	40
1. Proteolisi limitata ed isolamento di frammenti di lisozima umano	40
2. Caratterizzazione di frammenti di lisozima umano	43
2.1 Caratterizzazione chimica	43
2.2 Caratterizzazione conformazionale	46
2.2.1 Dicroismo circolare	46
2.2.2 Fluorescenza	52
2.2.3 Denaturazione termica	53
3. Saggio di attività	57
4. Aggregazione amiloide di frammenti di lisozima	60
IV. DISCUSSIONE	68
Bibliografia	73

## ABBREVIAZIONI

---

APS	ammonio persolfato
CD	dicroismo circolare
Da	Dalton
E:S	rapporto enzima:substrato
ESI	<i>electrospray ionization</i>
FTIR	spettroscopia infrarosso in trasformata di Fourier
Gdn·HCl	guanidinio cloruro
HPLC	cromatografia liquida ad alta prestazione
LIS	lisozima umano
ME	microscopia elettronica
MRW	peso medio per residuo
MS	spettrometria di massa
NMR	risonanza magnetica nucleare
p/p	peso/peso
PAGE	elettroforesi in gel di poliacrilammide
pI	punto isoelettrico
PM	peso molecolare
RP	<i>reverse phase</i>
RT	tempo di ritenzione
SDS	sodio dodecil solfato
[ $\theta$ ]	ellitticit� media per residuo
TCEP	tris(2-carbossietil)fosfina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiammina
TFA	acido trifluoroacetico
ThT	Tioflavina T
Tris	tris(idrossimetil)amminometano
UV	ultravioletto

---

## ABBREVIAZIONI DEGLI AMMINOACIDI

---

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Acido aspartico	Asp	D
Cisteina	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Acido glutammico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Istidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

---

## RIASSUNTO

Una vasta serie di disordini clinici, tra cui la malattia di Alzheimer, le encefalopatie spongiformi, il Parkinson, il diabete di tipo II e le amiloidosi sistemiche, sono associati alla deposizione di proteine solubili allo stato nativo in tipici aggregati proteici denominati fibrille amiloidi (Kelly, 1996; Selkoe, 2003). Tra questi, un grande numero di depositi amiloidi è formato da frammenti proteici derivanti da precursori ad alto peso molecolare (Sacchettini and Kelly, 2002; Dobson, 2003). Per esempio, le fibrille dell'Alzheimer sono formate dai frammenti prodotti dalla proteolisi limitata della proteina precursore dell'amiloide (*amyloid precursor protein*, APP). Altri esempi sono i frammenti della proteina *serum amyloid A* (SAP), della gelsolina, dell'apolipoproteina A1, della prolattina, dell'amilina, della calcitonina, della  $\beta_2$ -microglobulina, della transtiretina, della medina e del fibrinogeno (Kozhukh *et al.*, 2002; Sacchettini and Kelly, 2002; Dobson, 2003). I frammenti proteici derivanti dall'idrolisi limitata delle proteine sono particolarmente instabili perché questi possono assumere solo stati parzialmente strutturati e non possono stabilire quelle interazioni ad ampio raggio che invece esistono nella proteina nativa. In particolare, una proprietà peculiare dei frammenti è che possono esporre regioni idrofobiche che hanno la tendenza ad associarsi, dando avvio al processo di aggregazione amiloide (Fink, 1998).

Il lisozima umano forma fibrille amiloidi in individui affetti da amiloidosi sistemica non-neuropatica, che sono portatori di una mutazione puntiforme nel gene della proteina (Pepys *et al.*, 1993; Booth *et al.*, 1997; Valleix *et al.*, 2002; Yazaki *et al.*, 2003; Rocken *et al.*, 2006). Gli individui affetti sono eterozigoti per queste mutazioni e manifestano depositi di placche amiloidi formate esclusivamente dalla variante del lisozima. Sfortunatamente, la deposizione di amiloide negli organi interni è spesso fatale e l'unico approccio terapeutico attualmente disponibile è il trapianto dell'organo affetto (Pepys, 2006).

I mutanti amiloidogenici di lisozima possiedono minore stabilità termica e minore cooperatività del processo di *folding* rispetto al lisozima naturale (Funahashi *et al.*, 1996; Booth *et al.*, 1997). In condizioni fisiologiche le varianti amiloidogeniche I56T e D67H assumono uno stato parzialmente strutturato, caratterizzato da uno svolgimento parziale del dominio  $\beta$  (amminoacidi 40-82) e

della adiacente elica C (amminoacidi 89-100), mentre il resto della molecola mantiene la conformazione nativa (Canet *et al.*, 2002). Nel caso della proteina wild-type, studi condotti mediante proteolisi limitata e spettroscopia infrarosso in derivata di Fourier (FTIR) hanno dimostrato che nelle fibrille amiloidi prodotte *in vitro* a pH acido solo la regione 32-108 della catena polipeptidica fa parte del core con struttura  $\beta$ , mentre il resto della catena è relativamente privo di struttura (Frare *et al.*, 2006). Inoltre, nel caso della proteina omologa di pollo è stato dimostrato che questa regione è la più propensa all'aggregazione (Frare *et al.*, 2004).

Per ottenere ulteriori informazioni sul meccanismo di aggregazione amiloide del lisozima umano, in questo lavoro di Tesi sono state analizzate le caratteristiche strutturali e di aggregazione di due domini complementari di lisozima, i frammenti 58-108 e 1-57/109-130, ottenuti mediante proteolisi con pepsina in ambiente acido e purificati mediante RP-HPLC. Il frammento 58-108 comprende due  $\beta$ -strand del dominio  $\beta$  ed i residui che nel lisozima umano nativo costituiscono l'elica C, e contiene i due ponti disolfuro intramolecolari Cys65-Cys81 e Cys77-Cys95. Il frammento 1-57/109-130, invece, è formato dai segmenti peptidici 1-57 e 109-130 legati covalentemente dai ponti disolfuro Cys6-Cys128 e Cys30-Cys116, e comprende le eliche A, B e D del lisozima nativo.

La struttura secondaria e terziaria dei due frammenti è stata caratterizzata mediante dicroismo circolare (CD), fluorescenza e misure di stabilità termica. Le misure CD e di fluorescenza indicano che, mentre il frammento 58-108 è sostanzialmente privo di struttura, il frammento 1-57/109-130 possiede un elevato contenuto di struttura ad  $\alpha$ -elica, anche se ridotta stabilità termica rispetto alla proteina nativa. Questo frammento, pur contenendo il sito attivo della proteina, non risulta funzionale, ma con l'aggiunta del frammento 58-108, forma un complesso che dimostra una parziale attività rispetto alla proteina intera. Questi risultati indicano quindi che i due frammenti contengono una informazione sufficiente per riacquisire una struttura autonoma, rappresentando quindi domini proteici.

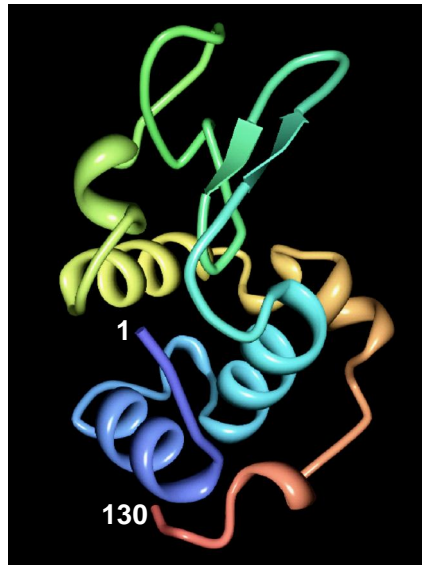
Il processo di aggregazione dei due frammenti di lisozima è stato seguito mediante saggio con il colorante specifico per l'amiloide Tioflavina T e microscopia elettronica. I risultati mostrano che il frammento 58-108 di lisozima

ha una propensione molto maggiore ad aggregare rispetto al dominio 1-57/109-130. Tuttavia, i tempi più lunghi anche il frammento 1-57/109-130 è in grado di formare fibrille, mentre il lisozima intero rimane solubile nelle stesse condizioni sperimentali.

In conclusione, in questa Tesi è stata individuata una regione particolarmente amiloidogena del lisozima umano, che potrebbe rappresentare la regione chiave a partire dalla quale si scatena il processo di aggregazione dell'intera proteina e che entra a far parte del *core* con struttura della fibrilla matura (Frare *et al.*, 2006). Lo studio condotto è interessante perché recentemente è stato scoperto che i depositi amiloidi formati dal doppio mutante di lisozima T70N/W112R sono costituiti anche da frammenti della proteina (Röcken *et al.*, 2006) ed è stato ipotizzato che anche la variante W64R del lisozima umano possa essere soggetta a proteolisi (Trexler and Nilsson, 2007). Sembra pertanto che la proteolisi limitata possa svolgere un ruolo anche nel caso dell'amiloidosi di lisozima. L'analisi di frammenti di lisozima qui descritta potrebbe quindi avere una utilità generale per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base di vari disordini neurodegenerativi ed amiloidosi sistemiche.







```

      10          20          30          40          50
KVFERCELAR TLKRLGMDGY RGISLANWMC LAKWESGYNT RATNYNAGDR
      60          70          80          90         100
STDYGIFQIN SRYWCNDGKT PGAVNACHLS CSALLQDNIA DAVACAKRVV
      110         120         130
RDPQGIRAWV AWRNRCQNRD VRQYVQGCGV

```

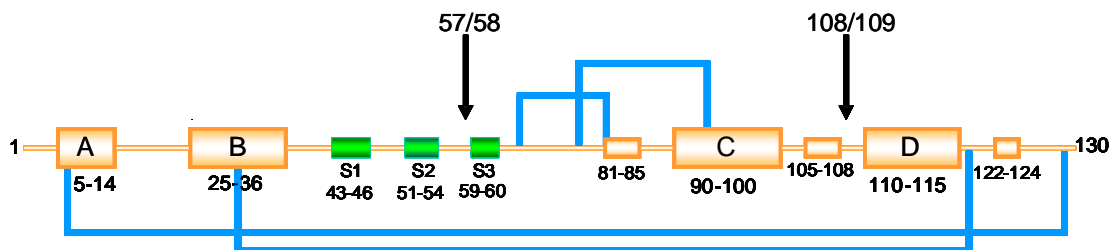


Figura 1. Struttura tridimensionale del lisozima umano (Redfield and Dobson, 1990) (in alto). Sequenza amminoacidica del lisozima umano (Canfield *et al.*, 1971) (al centro). Schema della struttura secondaria del lisozima umano con evidenziati i principali siti di idrolisi peptica a pH 2.0 in presenza di 3 M urea a 52° C (in basso) (vedi Metodi per ulteriori dettagli).

elevato numero di strati di peptidoglicano e questa struttura è generalmente resistente all'azione degli enzimi proteolitici, che non sono in grado di idrolizzare peptidi contenenti D-amminoacidi. Il lisozima provoca la lisi dei batteri *Gram +* idrolizzando i legami glicosidici  $\beta$  (1- $\rightarrow$ 4) dello scheletro polisaccaridico. I prodotti dell'idrolisi sono disaccaridi di NAG e NAM, a cui sono ancora legate le catene laterali peptidiche. In seguito all'azione del lisozima, la cellula batterica si rigonfia, la membrana si rompe e si ha la perdita di contenuto cellulare. Nella struttura tridimensionale del lisozima i gruppi polari sono disposti all'esterno della molecola e quelli idrofobici all'interno. Una profonda introflessione costituisce il sito attivo, i cui residui catalitici sono Glu35 ed Asp52, che si trovano in ambienti chimicamente differenti. Asp52 è in una parte polare, dove costituisce un accettore nella formazione del legame idrogeno con il substrato. Al contrario, Glu35 è in una regione non polare, per cui la dissociazione del suo protone è meno favorita che nel caso dell'acido aspartico. La presenza della tasca idrofobica in cui Glu35 è inserito è quindi fondamentale per lo svolgimento dell'attività biologica di lisozima, che è massima a pH 5 (Poulsen *et al.*, 1980).

## 2. Malattie amiloidi

### 2.1. Struttura delle fibrille amiloidi

Un certo numero di malattie umane, tra cui le amiloidosi sistemiche ed altri disordini neurodegenerativi, come la malattia di Alzheimer, le encefalopatie spongiformi, il Parkinson ed il diabete di tipo II, derivano dalla deposizione di aggregati proteici, ordinati e filamentosi, comunemente denominati *fibrille amiloidi*. In ognuno di questi stati patologici una proteina specifica o un frammento proteico passa dalla sua forma solubile e funzionale ad una forma *misfolded* che costituisce le placche amiloidi, che si accumulano in sede extracellulare (Kelly, 1998; Dobson, 1999; Rocket and Lansbury, 2000). Si conoscono approssimativamente 20 proteine coinvolte in malattie amiloidi, non collegate tra loro in termini di sequenza e struttura (Tabella 1). Inoltre, un certo numero di malattie coinvolge anche la formazione di depositi fibrillari intracellulari, così come la formazione di depositi non fibrillari. I polipeptidi amiloidogenici, possono avere una struttura iniziale ricca di foglietti  $\beta$ ,  $\alpha$ -eliche,  $\beta$ -eliche o

Tabella 1. Proteine amiloidogeniche e disordini clinici di tipo amiloide.

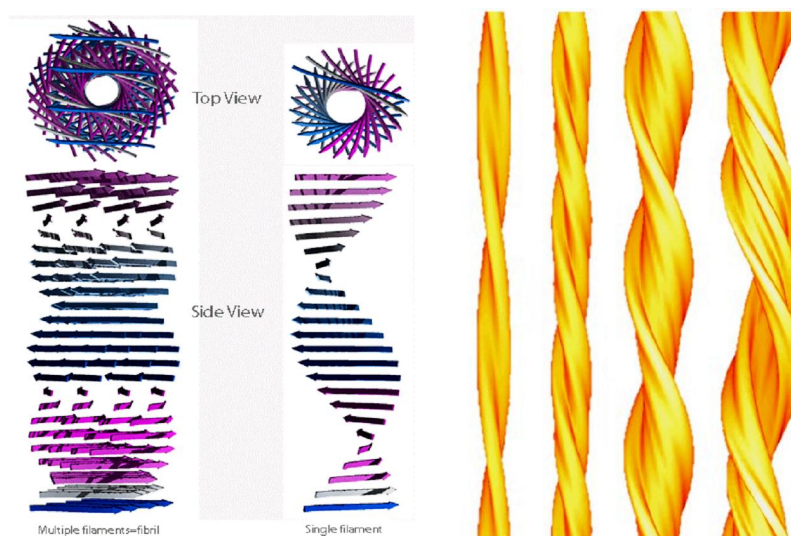
Diseases-associated amyloidogenic proteins			
Amyloidogenic protein	Type of structure	disease	Tissue distribution of protein deposits
Prion protein and its fragments	N-terminal fragment (236-121) is natively unfolded; C-terminal domain (121-6230) is $\alpha$ -helical (predominantly)	Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome (GSS) Fatal familial insomnia (FFI) Kuru Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie	Brain
Amyloid- $\beta$ and its fragments	Natively unfolded	Alzheimer's disease (AD) Dutch hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (HCHWA, also known as cerebrovascular amyloidosis) Congophilic angiopathy	Brain Brain, spinal cord
ABri Cystatin C	Natively unfolded $\alpha/\beta$	Familial British dementia Hereditary cystatin c amyloid angiopathy (HCCAA)	Brain Brain
Huntingtin	$\alpha$ -Helical (but exon 1 is unfolded and forms fibrils)	Huntington Disease	Brain
Androgen receptor protein	Ligand-binding (LBD) and DNA-binding domains (DBD) are $\alpha$ -helical; amino-terminal domain (NTD) is natively unfolded	Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)	Brain, scrotal skin, dermis, kidney, heart, and testis, spinal cord
Ataxin-1	Unknown (likely natively unfolded)	Spinocerebellar ataxia (SCA) Brain, spinal cord	Central and peripheral nervous system
DRPLA protein (atrophin-1)	Unknown (likely natively unfolded)	Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) Hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)	Brain
Serum amyloid A and its fragments	$\alpha/\beta$	AA amyloidosis (inflammation-associated reactive systemic amyloidosis)	Bladder, stomach, thyroid, kidney, liver, spleen, gastrointestinal tract
Medin (2456294 fragment of lactadherin)	$\beta$ -Sheet	Aortic medial amyloidosis	Aortic smooth muscle
Islet amyloid polypeptide (IAPP, Amylin)	Natively unfolded	Pancreatic islet amyloidosis in late-onset diabetes (type II diabetes mellitus)	Pancreas
Calcitonin	Natively unfolded	Medullary Carcinoma of the Thyroid (MCT)	Thyroid
Lysozyme	$\alpha + \beta$	Hereditary systemic amyloidosis	Several visceral organs and tissues
Gelsolin	$\alpha/\beta$	Hereditary systemic amyloidosis Finnish-type familial amyloidosis	Several visceral organs and tissues
Transthyretin	$\beta$ -Sheet (predominantly)	Senile systemic amyloidosis (SSA) (or senile cardiac amyloidosis)	Almost all organs and tissues, including heart, gland, arteries, bones, liver, digestive tract, etc. Various organs and tissues.
Apolipoprotein A1	$\alpha$ -Helical	Familial amyloid polyneuropathy (FAP) Hereditary systemic amyloidosis	Eyes
$\beta$ 2-Microglobulin	$\beta$ -Sheet	Amyloid associated with	Musculoskeletal tissues (large

Tau protein	Probably natively unfolded	hemodialysis (AH or Ah2M) (athropathy in hemodialysis) Alzheimer's disease (AD), Pick's disease	and medium-sized joints, bones, muscles), peripheral nervous system, gastrointestinal tract, tongue, heart, urogenital tract Brain
-------------	----------------------------	--	---

Table I (continued)

Diseases-associated amyloidogenic proteins			
Amyloidogenic protein	Type of structure	disease	Tissue distribution of protein deposits
$\alpha$ -Synuclein	Natively unfolded	Parkinson's disease (PD) Diffuse Lewy bodies disease (DLBD) Lewy bodies variant of Alzheimer's disease (LBVAD) Dementia with Lewy bodies (DLB) Multiple system atrophy (MSA) Hallervorden-Spatz disease	Brain
NAC (central fragment of $\alpha$ -synuclein)	Natively unfolded	Alzheimer's disease (AD)	Brain
Fibrinogen and its fragments	$\beta$ -Sheet	Hereditary renal amyloidosis	Kidney
Atrial natriuretic factor	$\beta$ -Small protein	Atrial amyloidosis	Heart
Insulin	Predominantly $\alpha$ -helical	Injection-localized amyloidosis	Skin, muscles
Non-disease-related amyloidogenic proteins and peptides			
Protein (peptide)	Type of structure	Protein (peptide)	Type of structure
Betabellins 15D and 16D	$\beta$ -Sandwich	Prothymosin a	Natively unfolded
Cytochrome c552	$\alpha$ -Helical	Myoglobin	$\alpha$ -Helical
Methionine aminopeptidase	$\alpha$ -Helical	Muscle acylphosphatase	$\alpha/\beta$
Phosphoglycerate kinase	$\alpha/\beta$	Hen egg white lysozyme	$\alpha + \beta$
Hen egg white lysozyme, $\beta$ -domain	$\beta$ -Sheet	Acidic fibroblast growth factor	$\beta$ -Barrel
PI3-SH3 domain	$\beta$ -Barrel	OspA protein, BH9610 peptide	$\beta$ -Turn
$\beta$ -Lactoglobulin	$\beta$ -Sheet (predominantly)	De novo ata peptide	$\alpha$ -Helix-turn- $\alpha$ -helix
Monellin	$\alpha/\beta$	Lung surfactant protein C	$\alpha$ -Helix
Immunoglobulin light chain	$\beta$ -Sheet	$\alpha$ -Lactalbumin	$\alpha + \beta$
LEN			
HypF, N-terminal domain	$\alpha/\beta$	VL domain of mouse antibody F11	$\beta$ -Sheet
Human complement receptor 1, 186-34 fragment	Unfolded	Apolipoprotein C-II	Natively unfolded
Human stefin B	$\alpha/\beta$	Cold shock protein A	$\beta$ -Barrel
GAGA factor	Natively unfolded	Protein G, B1 Ig-binding domain	Four-stranded $\beta$ -sheet with a flanking $\alpha$ -helix
Yeast prion Ure2p	$\alpha$ -Helical/unfolded	Cold shock protein B, 1-622 fragment	Unfolded
Herpes simplex virus glycoprotein B fragment	$\beta$ -Structural	De novo proteins from combinatorial library	$\beta$ -Structural
The fiber protein of adenovirus, 3556396 peptide from shaft	Fibrillar	Soluble homopolypeptides: poly-L-lysine poly-L-glutamic acid poly-L-threonine	Unordered

contenere sia  $\alpha$ -eliche sia foglietti  $\beta$  (Tabella 1). Possono essere anche proteine globulari con una struttura tridimensionale rigida o derivare da una classe di proteine intrinsecamente disordinate (Wright and Dyson, 1999; Uversky, 2002). Nonostante queste differenze, le fibrille associate a malattie differenti, mostrano molte proprietà in comune, tra cui la struttura *cross- $\beta$ -sheet*, determinata mediante diffrazione a raggi X, nella quale i foglietti beta si estendono parallelamente all'asse maggiore della fibrilla, mentre i  $\beta$ -strands sono perpendicolari all'asse (vedi Figura sottostante). Una tipica fibrilla è costituita da due a sei protofilamenti non ramificati, di 2-5 nm di diametro, associate lateralmente o arrotolate tra di loro per formare fibrille con un diametro di 4-13 nm (Fändrich, 2007).



Oltre al motivo  $\beta$ , la esatta struttura molecolare delle fibrille amiloidi non è ancora conosciuta. Utili informazioni sulla struttura delle fibrille amiloidi, sono state ricavate mediante risonanza magnetica nucleare (NMR) (Lansbury *et al.*, 1995; Jaroniec *et al.*, 2004; Ritter *et al.*, 2005), microscopia elettronica (Jimenez *et al.*, 1999; Chamberlain *et al.*, 2000; Jimenez *et al.*, 2002), spettroscopia infrarosso in derivata di Fourier (FTIR) (Bouchand *et al.*, 2000; Zurdo *et al.*, 2001; Frare *et al.*, 2006) e tecniche biochimiche, quali lo scambio idrogeno/deuterio (Kheterpal *et al.*, 2000; Hoshino *et al.*, 2002; Kheterpal *et al.*, 2003; Carulla *et al.*, 2005) e proteolisi limitata (Bousset *et al.*, 2004; Frare *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2007). Studi condotti mediante NMR hanno rivelato la presenza nelle fibrille di foglietti sia paralleli sia antiparalleli, indicando che non esiste una struttura universale per le fibrille: ad oggi solo quelle derivanti da

piccoli peptidi sembrano assumere una struttura a foglietto antiparallelo. Questi risultati comunque non escludono che anche i peptidi più lunghi o le proteine intere possano formare fibrille amiloidi costituite da foglietti antiparalleli. Inoltre, confrontando le fibrille derivanti da sistemi diversi, si è scoperto che presentano interazioni polari ed idrofobiche ripetitive lungo l'asse fibrillare. Nonostante la differenza di sequenza dei polipeptidi che le compongono, la maggioranza dei modelli proposti porta alla conclusione che il core della fibrille è composto da due o quattro foglietti, che interagiscono fortemente tra di loro. Entrando però più in dettaglio, si è notato che ci sono delle differenze legate all'influenza che hanno le catene laterali sulla struttura adottata dai vari sistemi. Queste includono la lunghezza delle eliche, la loro disposizione parallela o antiparallela all'interno di ogni foglietto, la lunghezza dei loop, dei  $\beta$ -turn e di altre regioni che non sono contenute nel core; inoltre il numero di residui incorporati nel core della fibrilla può variare notevolmente. In aggiunta, la presenza di ponti disolfuro può perturbare il modo con il quale i vari foglietti si impaccano tra di loro.

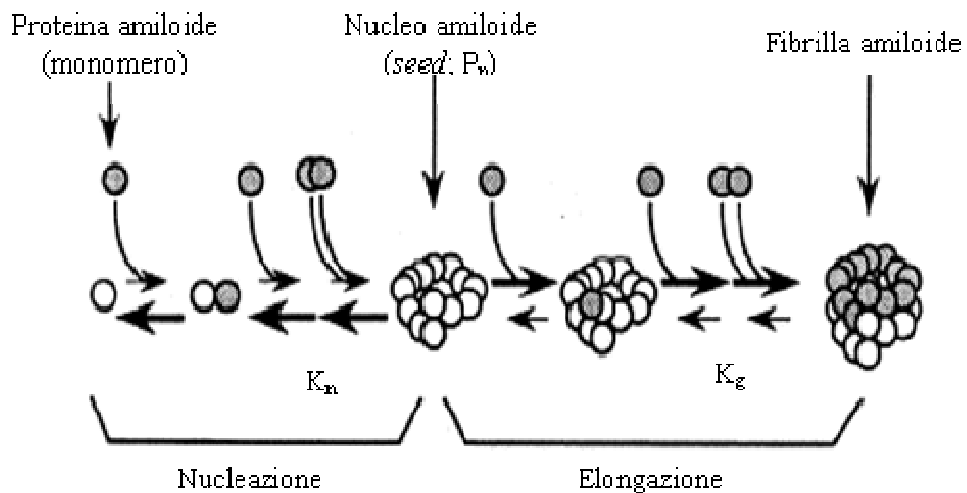
È chiaro che la comprensione delle interazioni molecolari che stabilizzano queste strutture può portare a comprendere meglio i meccanismi di formazione delle fibrille e trovare cure efficaci per le malattie amiloidi.

## 2.2. Meccanismo di aggregazione amiloide

Fino ad alcuni anni fa si riteneva che la formazione di aggregati fibrillari fosse una peculiarità delle poche proteine o peptidi che generano tali formazioni *in vivo*. Tuttavia vari gruppi di ricerca hanno dimostrato che in opportune condizioni sperimentali, anche proteine non amiloidogeniche *in vivo*, quali la mioglobina, il lisozima, il dominio SH3 della fosfatidil-inositolo 3-chinasi,  $\alpha$ -lattalbumina,  $\alpha$ -acilfosfatasi e molte altre, possono essere indotte a generare aggregati fibrillari indistinguibili dagli aggregati amiloidi. In ognuno di questi casi, l'aggregazione di proteine intere in fibrille amiloidi è possibile in condizioni che alterano parzialmente o completamente la struttura nativa, ma che non impediscono l'instaurarsi di interazioni molecolari, come per esempio legami a idrogeno. È anche stato scoperto che molti peptidi, sia frammenti di proteine naturali sia sequenze prodotte artificialmente (4-6 amminoacidi), incapaci di

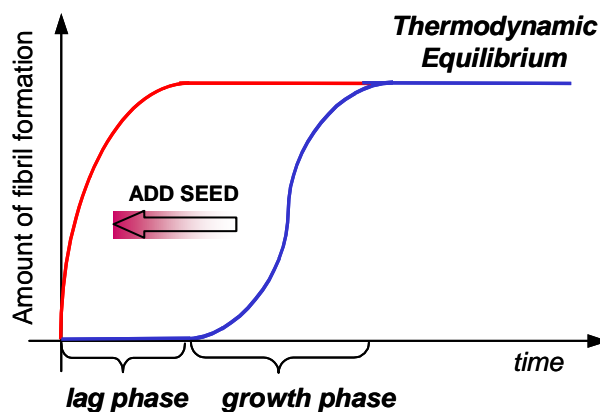
ripiegarsi in strutture globulari stabili, formano prontamente fibrille amiloidi, con tutte le caratteristiche proprie delle fibrille composte da proteine costituite da più di 100 amminoacidi (Tjernberg *et al.*, 2002). Questi risultati sostengono l'ipotesi che la capacità di formare fibrille amiloidi è una proprietà generale di peptidi e proteine, e che le strutture amiloidi sono il risultato di proprietà chimico-fisiche della catena polipeptidica piuttosto che delle sequenze amminoacidiche. Per sostenere questa ipotesi è necessario chiarire il ruolo dei due componenti di una catena polipeptidica, il *backbone* polipeptidico e le catene laterali, nella perdita di struttura nativa e nell'acquisizione di strutture amiloidi. Infatti, sequenze amminoacidiche diverse che in condizioni native danno luogo a strutture diverse, se poste in condizioni parzialmente denaturanti, evolvono in strutture macromolecolari simili. Questo processo è spiegabile solo con il fatto che queste strutture amiloidi sono formate e stabilizzate da numerosissimi legami idrogeno tra i gruppi NH e CO dello scheletro polipeptidico, che è un elemento comune a tutte le proteine. In un tale scenario, la sequenza amminoacidica giustifica la diversa facilità di proteine diverse nell'assumere uno stato parzialmente strutturato. Questi risultati, quindi, suggeriscono che è possibile indurre il processo di aggregazione amiloide ponendo una proteina in condizioni tali che ne risulti destabilizzata la struttura terziaria ma siano ancora favorite le interazioni secondarie, con l'assunzione di una struttura parzialmente destabilizzata propensa ad aggregare.

Il meccanismo con cui si formano le fibrille amiloidi sembra somigliare al processo con cui avviene la cristallizzazione o l'aggregazione ordinata di proteine, ovvero una *polimerizzazione nucleazione-dipendente* (Krebs *et al.*, 2000; Xing and Higuchi, 2002). Questo meccanismo è stato proposto per molte delle proteine responsabili di amiloidosi, prime tra tutte il peptide A $\beta$  dell'Alzheimer e la proteina prionica (Come *et al.*, 1993 ; Morrissey and Shakhnovich, 1999; Jarret and Lansbury, 1993). Secondo questa teoria la formazione di una fibra insolubile è un processo in due fasi, una fase iniziale di *nucleazione* e una seconda fase di *elongazione*. Durante la fase di nucleazione avvengono essenzialmente due fenomeni: la conversione nel monomero della struttura nativa in struttura  $\beta$ -sheet, e la prima formazione di un nucleo fibrillare (*seed*) dato dalla prima aggregazione ordinata dei monomeri (Vedi Schema sottostante). Durante la seconda fase,



invece, ha luogo l'elongazione della fibrilla a partire dal nucleo preformato. La formazione del nucleo richiede una serie di associazioni successive che sono termodinamicamente sfavorite ( $K_n \ll 1$ ) perché le interazioni intermolecolari risultanti non prevalgono sul costo entropico dell'associazione. Quando il nucleo ( $P_n$ ) si è formato, ulteriori addizioni di monomeri sono termodinamicamente favorite ( $K_g \gg 1$ ) perché i monomeri contattano il polimero crescente in molti punti, portando così ad una rapida crescita. Una volta che un nucleo  $\beta$ -sheet si è formato, ulteriori addizioni di proteine sono termodinamicamente favorite perché i contatti tra le proteine e gli aggregati sono stabiliti in siti multipli. Perciò ne risulta che l'energia guadagnata da questa interazione a siti multipli supera la perdita di energia ed entropia che avviene durante la crescita dell'aggregato.

Le cinetiche di aggregazione nucleazione-dipendente hanno tre caratteristiche ben precise: *lag time*, concentrazione critica e *seeding* (vedi Figura sottostante).

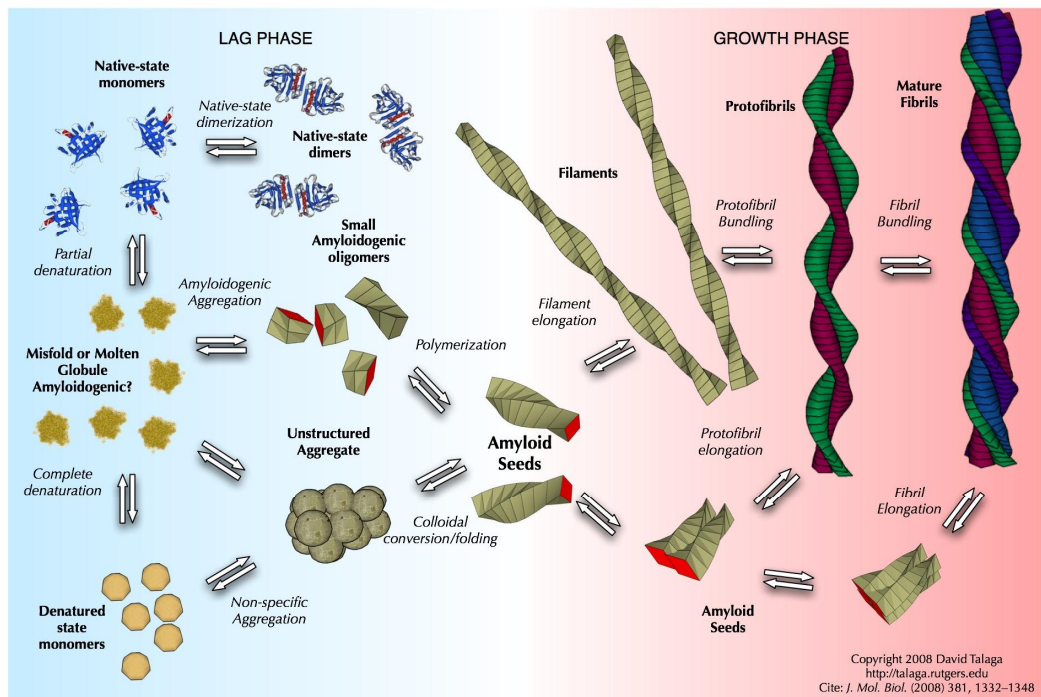




Il *lag time* è il tempo richiesto per la formazione del nucleo, durante il quale la proteina appare solubile e non sono rilevabili intermedi o aggregati. All'equilibrio, invece, quando la polimerizzazione è completa, la soluzione contiene per lo più monomeri e polimeri ad alto peso molecolare. La concentrazione del monomero in questo punto è chiamata *concentrazione critica*, e al di sotto di questa concentrazione la polimerizzazione non avviene. Quindi, solo quando gli aggregati superano una certa quantità critica, a seguito del *lag time* o dell'aggiunta di nuclei preformati, solo allora avviene l'allungamento spontaneo delle fibrille. I cosiddetti esperimenti di *seeding*, infatti, consistono proprio nell'aggiungere ad una soluzione concentrata di monomero dei nuclei fibrillari preformati (*seeds*): in questi casi si assiste alla scomparsa del *lag time*, e al rapido incremento della quantità di fibrille.

La formazione di fibrille amiloidi non è l'unica forma patogenica di deposizione amiloide. In molti disordini (così come in molti esperimenti *in vitro*), i depositi proteici sono composti da aggregati amorfi, senza ordine. In modo simile gli oligomeri solubili rappresentano un altro prodotto finale alternativo del processo di aggregazione. La scelta tra tre vie di aggregazione, quali la formazione di fibrille, di aggregati amorfi, oppure l'oligomerizzazione, dipende dalla sequenza amminoacidica e dall'ambiente nel quale si trova la proteina (Vedi Figura sottostante). Il processo di aggregazione è estremamente complesso, però può essere diviso in tre maggiori fasi. Le trasformazioni strutturali delle proteine solubili in precursori propensi all'aggregazione o in intermedi rappresenta il primo momento del processo di aggregazione. La formazione di differenti oligomeri (protofibrille o aggregati) rappresenta il secondo momento del processo di aggregazione, che viene spesso considerato come il momento della nucleazione, nel quale la formazione del nucleo è un evento sfavorito termodinamicamente, e che porta quindi ad un periodo di stasi che precede la significativa formazione di aggregati (Merlini and Bellotti, 2003). Una volta generatosi il nucleo, rapidamente si ha un aumento di dimensioni degli aggregati fibrillari. Come risultato, ogni conformazione adatta all'aggregazione viene velocemente intrappolata in fibrille, oligomeri solubili, oppure in aggregati amorfi.

Il problema dell'aggregazione amiloide è quindi molto complesso, e la ricerca condotta intensamente negli ultimi anni non ha ancora permesso di



Schema dei processi a cui può andare incontro una catena polipeptidica nell'ambiente intracellulare. L'equilibrio tra le molecole parzialmente denaturate e quelle in stato nativo è di solito in favore dello stato nativo, tranne nel caso di specifiche mutazioni, modificazioni chimiche o condizioni ambientali parzialmente denaturanti. Molecole parzialmente o del tutto denaturate sono di solito degradate dal proteasoma: quando questo meccanismo di *clearance* è danneggiato, queste specie formano aggregati disordinati o spostano l'equilibrio verso la formazione di aggregati prefibrillari che possono evolvere in fibrille mature (Giurleo *et al.*, 2008).

individuare con certezza quali siano le specie maggiormente tossiche ed il meccanismo con il quale le fibrille e gli oligomeri di tipo amiloide provocano la malattia.

### 3. Amiloidosi di lisozima umano

L'interesse per il lisozima è aumentato da quando sono state identificate mutazioni puntiformi del lisozima umano associate ad una forma di amiloidosi sistemica non neuropatica. In questa malattia rara si ha deposizione in vari organi di fibrille amiloidi formate dalle varianti puntiformi di lisozima I56T, F57I, W64R e D67H e dalle due varianti con doppia mutazione F57I/T70N e W112R/T70N (Pepys *et al.*, 1993; Booth *et al.*, 1997; Valleix *et al.*, 2002; Yazaki *et al.*, 2003; Rocken *et al.*, 2006) (Figura 2). Gli individui affetti sono eterozigoti per queste mutazioni e manifestano depositi di placche amiloidi formate esclusivamente dalla variante del lisozima (Figura 3). Sfortunatamente, la deposizione di amiloide negli organi interni è spesso fatale e l'unico approccio terapeutico attualmente disponibile è il trapianto dell'organo affetto (Pepys, 2006).

La struttura del mutante I56T è molto simile a quella della proteina naturale, ma presenta una rottura dell'interfaccia tra il dominio  $\alpha$  ed il dominio  $\beta$ , causata dall'introduzione di una catena polare nel core idrofobico (Booth *et al.* 1997). Il mutante D67H presenta una rottura della rete di legami ad H che stabilizza il dominio  $\beta$  e porta ad un suo significativo movimento. La flessibilità di questa regione potrebbe essere causa di amiloidogenicità. Nel mutante W64R un residuo di triptofano è sostituito dall'amminoacido basico arginina, con conseguente rottura di un cluster idrofobico (Trexler and Nilsson, 2007).

Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che in opportune condizioni sperimentali anche il lisozima *wild-type* è in grado di formare fibrille amiloidi, simili dal punto di vista morfologico, strutturale e tintoriale a quelle formate dalle varianti amiloidogeniche (Morozova-Roche *et al.*, 2000; Goda *et al.*, 2002; Frare *et al.*, 2006; 2009). Il lisozima umano si presta molto bene per lo studio del meccanismo di aggregazione amiloide, in quanto la sua struttura ed il meccanismo di folding sono conosciuti in grande dettaglio (Redfield and Dobson, 1990; Hooke *et al.*, 1994).

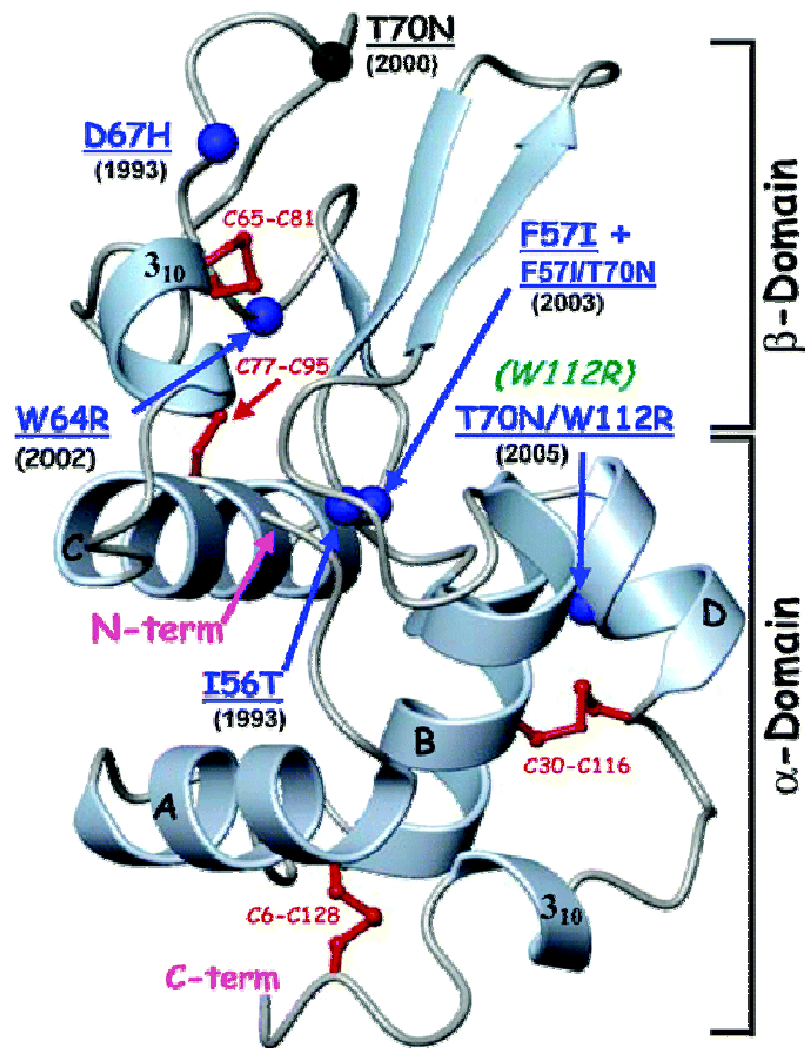


Figura 2. Rappresentazione tridimensionale della struttura del lisozima umano, che mostra la localizzazione delle mutazioni naturali conosciute, insieme all'anno della loro scoperta (Dumoulin *et al.*, 2006). Le mutazioni danno origine a sei varianti amiloidogeniche, mostrate in blu e ad una non amiloidogenica, mostrata in nero. La mutazione puntiforme singola W112R non è stata ancora scoperta. Le quattro  $\alpha$ -eliche del dominio  $\alpha$  sono denominate A-D. I quattro ponti disolfuro sono rappresentati in rosso.

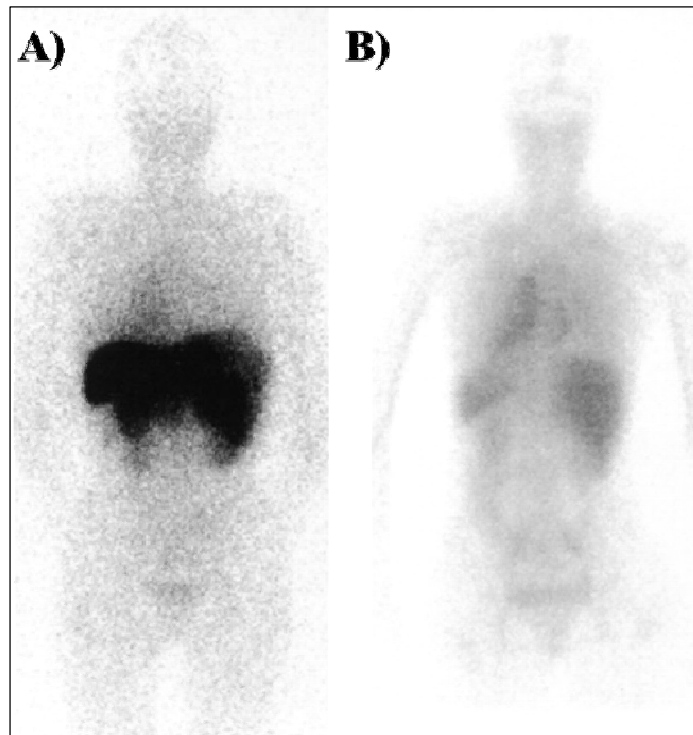


Figura 3. Scintigrafie della parte posteriore del corpo, dopo iniezione intravenosa della proteina amiloide del siero umana marcata con  $^{123}\text{I}$ , che si lega selettivamente ai depositi amiloidi. (A) Paziente malato di amiloidosi di lisozima, che mostra grossi depositi di proteina nel fegato, milza e nei reni; (B) un individuo normale, che mostra assenza di depositi proteici e distribuzione della sonda nel sistema circolatorio (Gillmore *et al.*, 1999)

La stabilità termica delle quattro varianti amiloidogeniche del lisozima umano I56T, F57I, W64R e D67H è inferiore rispetto a quella della proteina naturale, (Booth *et al.*, 1997; Dumoulin *et al.*, 2005). Queste mutazioni non solo riducono la stabilità della proteina, ma anche la cooperatività della denaturazione termica; infatti, anche in condizioni fisiologiche, la cooperatività della proteina è notevolmente minore. A pH compresi tra 5 ed 8 ed a temperatura tra i 35 e 37° C, sia la forma I56T sia la D67H popolano delle specie parzialmente denaturate in cui la regione del dominio  $\beta$  e della elica C sono entrambe denaturate, mentre le regioni che comprendono il dominio  $\alpha$  mantengono la loro struttura nativa, nonostante le due varianti presentino delle mutazioni in luoghi diversi della proteina (Dumoulin *et al.*, 2006).

Questa denaturazione parziale non avviene invece nella variante T70N, un mutante di lisozima non amiloidogenico ma piuttosto comune nella popolazione (0.05%) (Booth *et al.*, 2000), e nella proteina intera nelle stesse condizioni. I risultati fanno intuire che la mutazione T70N non porti ad una destabilizzazione della proteina tale da farla aggregare; questa conclusione spiega il motivo per cui la variante T70N non forma fibrille *in vivo* e anche il fatto che, sebbene i pazienti che soffrono di amiloidosi siano tutti eterozigoti, i depositi sono costituiti solo dalla variante amiloidogenica (Dumoulin *et al.*, 2006).

In condizioni nelle quali la maggior parte delle molecole proteiche è in stato parzialmente denaturato, cioè a pH bassi ed ad alte temperature, o presenza di denaturante, le quattro varianti sono in grado di formare fibrille *in vitro*; inoltre, a causa della loro ridotta stabilità e cooperatività, le varianti sono in grado di formare fibrille amiloidi molto più facilmente del mutante T70N e soprattutto della proteina nativa. La cinetica di aggregazione è di tipo sigmoidale, poiché presenta una fase stazionaria, seguita poi da una crescita esponenziale ed infine da una fase di plateau.

Nel complesso, i dati strutturali delle varianti suggeriscono che le mutazioni destabilizzano l'interfaccia tra il dominio  $\beta$  ed il dominio  $\alpha$ ; una perturbazione infatti di questa regione sembra provocare la riduzione della cooperatività dei due domini ed anche la stabilità del dominio  $\beta$  e dell'elica C, che sono uniti dal ponte disolfuro 77-95.

Nel caso del lisozima omologo di pollo, è stato dimostrato che un

frammento isolato mediante proteolisi limitata e contenente il dominio  $\beta$  e l'elica C della proteina, ovvero la regione parzialmente denaturata nelle varianti umane D67H e I56T, forma fibrille amiloidi rapidamente, mentre il resto del lisozima rimane solubile (Frare *et al.*, 2004). Questi risultati dimostrano che il dominio  $\beta$  e l'elica C non solo si denaturano rapidamente, ma hanno anche un'altra propensione ad aggregare rispetto ad altre regioni della proteina. È interessante notare che tutte le mutazioni amiloidogeniche sono situate al suo interno. L'unica mutazione che comprende il dominio  $\beta$ , la W112R, non causa amiloidosi singolarmente, ma solo in congiunzione con la mutazione T70N. Una doppia mutazione potrebbe quindi provocare una destabilizzazione tale da rendere patogenica anche la forma non amiloidogenica T70N. L'importanza della regione centrale del lisozima è confermata anche dal fatto che questo segmento è quello che costituisce il core cross- $\beta$  delle fibrille di lisozima umano prodotte *in vitro*, mentre il resto della molecola è sostanzialmente destrutturato (Frare *et al.*, 2006) (Figura 4).

In questa Tesi, sono stati prodotti mediante proteolisi limitata ed analizzati dal punto di vista conformazionale e della propensione all'aggregazione i due domini complementari 1-57/109-130 e 58-108 di lisozima umano. Lo scopo era di verificare se anche nel caso del lisozima umano questa è la regione responsabile dell'aggregazione della proteina. Inoltre, essendo questi due domini complementari, l'obiettivo era verificare se essi conservano una struttura stabile, in assenza del resto della catena polipeptidica. L'analisi dei frammenti di lisozima qui descritta potrebbe essere di utilità generale per la comprensione del meccanismo di *fold*ing di lisozima e del processo di formazione di aggregati associati ad amiloidosi sistemica.

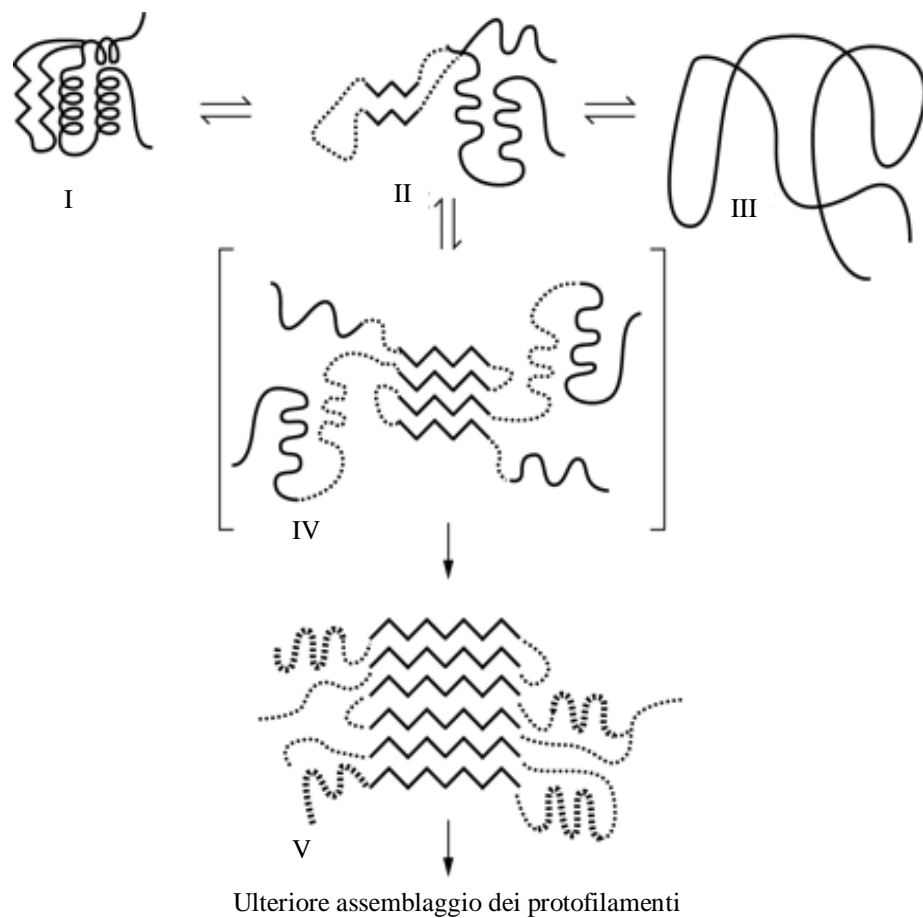


Figura 4. Meccanismo proposto per la formazione di fibrille di lisozima (Booth *et al.*, 1997). Le varianti del lisozima sono caratterizzate da uno stato parzialmente destrutturato, che mantiene tuttavia un certo grado di struttura secondaria. Questo stato parzialmente destrutturato (II), diverso dallo stato nativo (I) e dagli stati denaturati (III), si associa con stati simili attraverso il dominio  $\beta$  (IV) per iniziare la formazione di fibrille. Questa prima associazione fornisce la base per l'ulteriore deposizione di molecole e per lo sviluppo di strutture amiloidi stabili con struttura  $\beta$ -sheet .



## II. MATERIALI E METODI

### 1. Materiali

Il lisozima umano è stato espresso nel lievito *Pichia Pastoris* con una procedura precedentemente descritta (Johnson *et al.*, 2005). La pepsina da mucosa di stomaco di maiale e il colorante Tioflavina T sono stati forniti dalla Sigma (St. Louis, MO, USA). Il sale guanidinio-HCl è stato fornito da AppliChem (Darmstadt, Germany). L'acido trifluoroacetico, i sali ad alta purezza  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , il sodio citrato ed il riducente TCEP sono stati acquistati dalla Fluka (Basel, Switzerland). L'urea è della ICN (Aurora, Ohio, USA). L'acido cloridrico è stato fornito da R:P: Normapur<sup>TM</sup>-AR. L'acetonitrile usato nelle analisi cromatografiche è della Carlo Erba (Milano, Italia). Tutte le soluzioni sono state preparate con acqua Milli-Q ottenuta con un sistema Millipore.

### 2. Metodi

#### 2.1. Proteolisi limitata di lisozima

I frammenti corrispondenti ai tratti di sequenza 58-108 e 1-57/109-130 di lisozima sono stati ottenuti mediante frammentazione enzimatica di lisozima con pepsina. La pepsina è un'endoproteasi attiva a pH acido (1-4), al quale almeno uno dei due residui di acido aspartico del sito catalitico risulta ionizzato (Fruton, 1970). Essa idrolizza preferenzialmente legami peptidici in cui siano coinvolti amminoacidi quali Phe, Leu, Met e Trp, tagliando in corrispondenza del C-terminale, pur non presentando una vera e propria selettività di azione.

Il lisozima è stato sciolto in concentrazione 0.2 mg/ml in tampone 0.1 M sodio citrato, pH 5.5, contenente 3 M urea. Il pH è stato poi portato a 2.0 per aggiunta del 5% (v/v) di 6 N HCl. La reazione di proteolisi di lisozima con pepsina è stata condotta a 52°C per 8 min, con un rapporto enzima:substrato di 1:20 (p/p). La reazione è stata bloccata aggiungendo un'uguale quantità in volume di  $\text{NH}_3$  acquosa (1:100, v/v).

## 2.2. Purificazione e identificazione dei frammenti proteolitici

### 2.2.1. RP-HPLC

Il controllo del decorso delle reazioni di proteolisi e la purificazione a scopo preparativo dei frammenti 58-108 e 1-57/109-130, sono stati eseguiti mediante RP-HPLC, ovvero mediante cromatografia liquida ad alta efficienza in fase inversa. Il sistema HPLC a fase inversa (RP-HPLC) ha trovato sviluppo e applicazione grazie al suo notevole potere di risoluzione, all'elevato recupero del campione in piccoli volumi e alla velocità delle analisi. La separazione di proteine mediante supporti RP è basata sulle interazioni idrofobiche tra catene laterali degli amminoacidi delle proteine ed i gruppi funzionali delle matrici della colonna. La matrice di silice, frequentemente utilizzata come fase stazionaria, viene opportunamente funzionalizzata con gruppi organoclorosilanic (preferenzialmente butile, C<sub>4</sub>, ottile, C<sub>8</sub>, e ottadecile, C<sub>18</sub>), al fine di conferirle carattere idrofobico. Poiché nelle proteine e nei peptidi prevale in genere il carattere idrofilico, è necessario aumentarne l'idrofobicità per favorire le interazioni con la matrice. Ciò di norma si ottiene aggiungendo un acido debole, come il trifluoroacetico, all'eluente. L'anione idrofobico dell'acido, infatti, forma coppia ionica con i gruppi basici protonati della proteina, neutralizzandoli, con conseguente calo delle cariche positive e aumento del carattere idrofobico del substrato.

L'eluizione delle proteine e dei peptidi viene generalmente ottenuta creando un gradiente di polarità decrescente con una miscela di acqua e solvente organico. Il processo di separazione può essere ottimizzato modulando alcuni parametri, come la velocità di flusso, la quantità di campione iniettato, la temperatura e i vari *steps* del gradiente di eluizione. L'inconveniente principale dell'uso di questa tecnica risiede nella denaturazione delle proteine, poiché viene utilizzato un pH acido e la matrice idrofobica causa interazioni denaturanti il substrato proteico. In aggiunta, proteine particolarmente idrofobiche o ad alto peso molecolare possono interagire irreversibilmente con la fase stazionaria e non venire recuperate.

La separazione dei frammenti proteolitici ottenuti in seguito alla proteolisi di lisozima con pepsina è stata realizzata utilizzando una colonna analitica

Phenomenex C<sub>18</sub> di dimensioni 150 x 4.6 mm. L'eluizione della colonna è stata condotta con acqua e acetonitrile contenenti rispettivamente 0.1% e 0.085% di TFA, usando un gradiente di acetonitrile dal 5% al 22% in 5 minuti e dal 22% al 50% in 17 minuti con un flusso di 0.6 mL/min. Lo strumento HPLC usato è il modello HPLC Agilent 1100 Series della Hewlett Packard (Palo Alto, California USA). Il materiale proteico eluito dalla colonna è stato rilevato mediante assorbimento UV a 226 nm. Le frazioni cromatografiche relative ai picchi di interesse sono state raccolte e concentrate sotto vuoto con liofilizzatore Speed-VacConcentrator (Savant).

### 2.2.2. Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

L'elettroforesi è stata realizzata con il sistema elettroforetico Mini-Protean II della Bio-Rad (Richmond, IL, USA), utilizzando lastre di dimensione 10.2 x 8.2 cm e spaziatori da 0.75 mm di spessore. La separazione delle proteine è stata condotta con un gel al 16.5% T e 3% C, dove T e C definiscono rispettivamente la percentuale totale di acrilammide e bis-acrilammide e la percentuale di bis-acrilammide rispetto alla concentrazione totale (Schägger and von Jagow, 1987). Per la preparazione del gel di separazione (*running gel*) sono state usate delle soluzioni di acrilammide e bis-acrilammide della AppliChem (Darmstadt, Germany) contenenti 48% di acrilammide e 1.5% di bis-acrilammide. Il tampone del gel è costituito da una soluzione di 3 M Tris·HCl, pH 8.45, contenente 0.3% SDS. La polimerizzazione del gel è stata ottenuta per aggiunta di TEMED e di una soluzione di APS al 10%. Il gel di concentrazione (*stacking gel*) è stato ottenuto utilizzando la stessa soluzione stock usata per il running gel ma in modo da avere una concentrazione finale di acrilammide pari al 4% T. L'elettroforesi è stata condotta utilizzando come tampone di corsa catodico una soluzione di 0.1 M Tris·HCl, 0.2 M tricina, 0.1% SDS, pH 8.25 e come tampone di corsa anodico una soluzione 0.2 M Tris·HCl, pH 8.9. I campioni proteici sono stati denaturati mediante riscaldamento all'ebollizione per 5 minuti in un tampone 60 mM Tris·HCl, pH 6.8, contenente 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 10% glicerolo e tracce di blu di bromofenolo (impiegato come tracciante della corsa elettroforetica). L'elettroforesi è stata condotta a temperatura ambiente utilizzando

una corrente di 12 mA fino all'uscita del blu di bromofenolo dal gel. La colorazione delle bande proteiche è stata ottenuta per immersione del gel in una soluzione di 25% Coomassie Brilliant Blue R-250 in metanolo:acido acetico:acqua (455:90:450) per 15-30 minuti. La decolorazione è stata quindi ottenuta per successivi lavaggi in una soluzione di metanolo:acido acetico:acqua (70:880:50). In ogni pozzetto sono stati caricati 5 µg di proteina o peptide. È stata inoltre caricata come standard una miscela di proteine venduta dalla Sigma (5 µg).

### 2.2.3. Spettrometria di massa

L'identificazione dei frammenti proteolitici è stata effettuata mediante la determinazione di massa (MS). Lo strumento usato è un Q-Tof micro della Micromass (Manchester, UK) dotato di una sorgente *electrospray* (ESI).

Nella spettrometria di massa ESI-MS, la ionizzazione del campione è prodotta mediante l'applicazione di un forte campo elettrostatico (4 kV) tra un capillare di acciaio e un contro-elettrodo. Nel capillare scorre la fase mobile contenente l'analita. Si libera così uno *spray* di goccioline cariche che, per evaporazione, rilasciano le molecole ionizzate del soluto. In questo modo si producono ioni molecolari gassosi a carica multipla: ogni ione rappresenta la proteina intatta con un dato numero di protoni legati, che dipende dal numero di gruppi ionizzabili presenti nella sequenza proteica.

Gli ioni vengono separati tramite l'analizzatore a quadrupolo (Q) e successivamente analizzati dal rilevatore TOF (*Time-of-Flight*) secondo il loro tempo di volo; quest'ultimo parametro viene convertito nel rapporto massa/carica ( $m/z$ ).

Si ottiene, infine, uno spettro che rappresenta una distribuzione di ioni a carica multipla, in cui ogni picco corrisponde ad un preciso rapporto massa/carica. Conoscendo il valore di due picchi in cui lo stesso campione ha carica diversa, si può risalire al valore di massa dell'analita grazie all'equazione:

$$(M + nH^+) / n = m / z$$

dove M è la massa dell'analita e n è il numero di cariche acquisite.

Le soluzioni da analizzare mediante ESI MS sono state preparate

sciogliendo un'aliquota di campione liofilizzato in concentrazione 0.1 mg/ml, in una miscela 1:1 di acetonitrile e acqua contenente 1% di acido formico ed iniettando 10  $\mu$ l di questa soluzione.

## 2.3. Analisi spettroscopiche

### 2.3.1. Assorbimento UV

La concentrazione delle soluzioni proteiche è stata determinata mediante la misura dell'assorbimento di radiazione ultravioletta a 280 nm secondo la legge di Lambert Beer,  $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ , dove  $\epsilon$  è il coefficiente di estinzione di una soluzione a concentrazione 1.0 mg/mL,  $l$  è il cammino ottico espresso in cm e  $c$  è la concentrazione proteica in mg/ml. In base al contenuto in moli di Tyr e Trp è possibile calcolare il coefficiente di estinzione relativo ad una soluzione allo 0.1 % (w/w) per ogni peptide, secondo l'equazione:

$$A_{280} = (\epsilon_{280,Trp} \cdot n_{Trp} + \epsilon_{280,Tyr} \cdot n_{Tyr} + \epsilon_{280,S-S} \cdot n_{S-S}) / MW$$

dove  $\epsilon_{280,Trp}$ , pari a 5690 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> e  $\epsilon_{280,Tyr}$ , pari a 1280 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, sono i coefficienti di estinzione molare rispettivamente del triptofano e della tirosina;  $n_{Trp}$  e  $n_{Tyr}$  sono il numero di residui presenti nella sequenza amminoacidica del peptide (Gill and von Hippel, 1989). Il coefficiente dei ponti disolfuro  $\epsilon_{280,S-S}$  è 2404 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>,  $n_{S-S}$  indica il loro numero e  $MW$  è il peso molecolare della proteina. Questa equazione si basa sul principio di additività delle assorbanze secondo cui l'assorbanza totale ad una data lunghezza d'onda è uguale alla somma delle assorbanze relative ai singoli cromofori sensibili alla stessa lunghezza d'onda.

Le misure di assorbimento sono state eseguite con uno spettrofotometro a doppio raggio Lambda-25 della Perkin Elmer (Forster City, CA, USA), utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm. I coefficienti di estinzione molare a 280 nm ( $\epsilon_{280}$  allo 0.1%) per il lisozima umano ed i suoi frammenti 58-108 e 1-57/109-130 sono stati ricavati dal programma ProtParam del sito ExPASy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) (Gill and von Hippel, 1989) e corrispondono rispettivamente a 2.5, 1.3 e 3.2 ml mg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 2.3.2. Dicroismo circolare

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica che permette di determinare la presenza ed il tipo di struttura secondaria di proteine e peptidi. Il metodo si basa sul fenomeno di assorbimento differenziale della luce polarizzata da parte di molecole intrinsecamente chirali, o achirali, ma immerse in un rigido intorno asimmetrico. Quando una radiazione polarizzata linearmente, risultante dalla somma vettoriale di due onde polarizzate circolarmente a destra e a sinistra con stessa intensità e in fase tra loro, attraversa un mezzo asimmetrico, la diversa interazione delle due componenti polarizzate a destra e a sinistra con la struttura asimmetrica risulta in un fenomeno di assorbimento quantitativamente diverso. L'onda risultante è polarizzata ellitticamente e il parametro monitorato che la caratterizza è l'ellitticità, definita come l'arcotangente del rapporto tra l'asse minore e l'asse maggiore dell'ellisse di polarizzazione. Il valore di  $[\theta]$ , espresso in gradi, è direttamente proporzionale all'assorbimento differenziale, secondo l'equazione:

$$[\theta] = 33 (A_L - A_R)$$

In uno spettro CD è riportata la variazione di  $[\theta]$  in mdeg in funzione della lunghezza d'onda. Una volta acquisito lo spettro si preferisce normalizzare la misura per renderla indipendente dalla concentrazione e dal cammino ottico della cella esprimendo l'ellitticità come l'ellitticità molare media per residuo,  $[\theta]_{MRW}$ , calcolata dividendo l'ellitticità per la concentrazione molare (usando come peso molecolare quello medio per residuo della proteina) e per la lunghezza della cella in cm:

$$[\theta]_{MRW} = \theta_{MRW} / 10 \cdot c \cdot d$$

ove  $\theta$  è espressa in gradi,  $c$  in mg/mL,  $d$  (cammino ottico) in cm e  $MRW$  è il peso molecolare medio per residuo, ottenuto dividendo il peso molecolare della proteina o peptide considerato per il numero di amminoacidi che li compongono. Il valore  $[\theta]$  è espresso in  $\text{gradi} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Ogni cromoforo chirale o appartenente ad una molecola chirale presenta un assorbimento caratteristico a determinate lunghezze d'onda. Per quanto riguarda le proteine, informazioni interessanti si possono trarre dall'esame della zona

compresa tra 250 e 190 nm (lontano UV) (Figura 5). In questa zona il cromoforo responsabile del segnale dicroico è il gruppo ammidico che presenta un profilo di ellitticità diverso a seconda della conformazione degli angoli di legame dei gruppi adiacenti, ovvero a seconda del tipo di struttura secondaria in cui è inserito ( *-elica*, *-sheet* o *random coil* ).

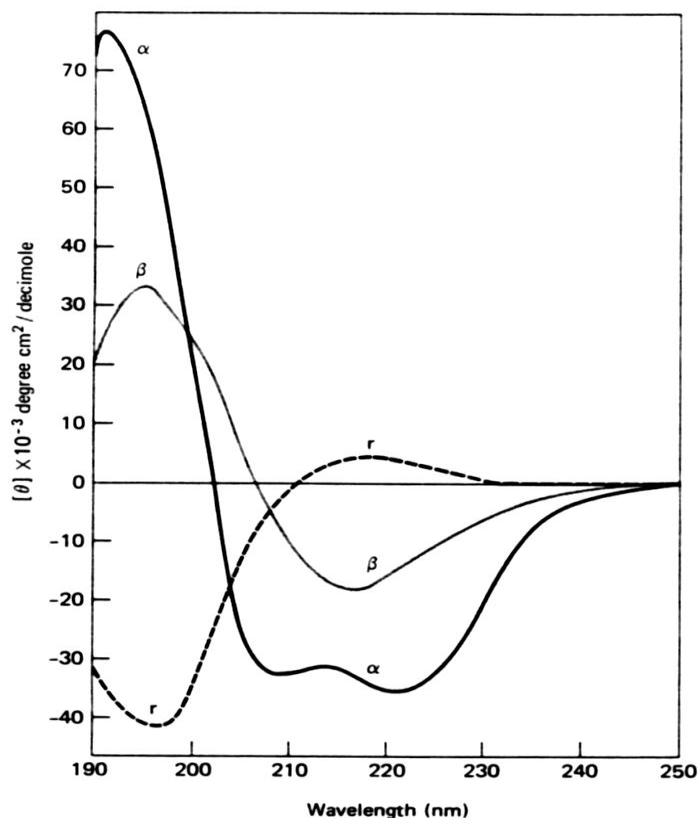


Figura 5. Spettri di dicroismo circolare caratteristici delle differenti strutture secondarie: *-elica* ( ), struttura *-antiparallela* ( ) e *random coil* (r).

Queste strutture hanno spettri CD nel lontano UV con massimi e minimi caratteristici: l'α-elica è caratterizzata da due bande negative intense a 222 nm e 208 nm e da una banda positiva a 192 nm; la struttura a foglietti ripiegati (*-sheet*) presenta una banda negativa a 216-218 nm ed una banda positiva a 198 nm; la struttura *-turn* presenta una banda negativa a 225 nm ed una positiva a 208 nm; la struttura *random coil* presenta una banda positiva debole a 218 nm ed una negativa intensa a 198 nm.

Nella zona compresa tra 350 e 260 nm (vicino UV) il segnale

dicroico viene generato dai ponti disolfuro (intrinsecamente chirali), dai gruppi aromatici delle catene laterali degli amminoacidi Trp, Tyr e Phe che si trovano in un intorno chimico asimmetrico e generalmente rigido, come ad esempio nei tratti a struttura secondaria, e dagli eventuali gruppi prostetici. Lo spettro CD in questa zona permette di ottenere informazioni relative alla struttura terziaria di una proteina. La forma dello spettro non è però prevedibile: essa è caratteristica di ogni proteina e viene definita come impronta digitale (*fingerprinting*) della topologia dei cromofori aromatici e dei ponti disolfuro all'interno di una struttura proteica. Inoltre la forma dello spettro può venire influenzata da vari fattori quali la rigidità della proteina, le interazioni con l'ambiente circostante, il numero di residui aromatici, la polarità del solvente e la temperatura. In particolare se le catene laterali sono mobili, l'intensità della banda CD diminuisce. Tuttavia ogni cromoforo presenta bande caratteristiche, utili per l'identificazione: i residui di Phe presentano una banda intensa tra 260-270 nm, seguita da bande meno intense a lunghezze d'onda minori, i residui di Tyr, invece, presentano un picco tra 272 e 282 nm, mentre i residui di Trp sono responsabili di una banda tra 288 e i 293 nm (Striskland, 1974). I ponti disolfuro, infine, presentano un massimo attorno a 250 nm: il segnale dicroico di un ponte disolfuro è determinato dalla sua conformazione, perché il conformero destrogiro dà una banda positiva, e quello levogiro una banda negativa.

In questa Tesi sono state eseguite misure di dicroismo circolare nel vicino UV (250-320 nm) per osservare la posizione dei cromofori aromatici e dei ponti S-S di lisozima e dei suoi frammenti 58-108 e 1-57/109-130 a diversi valori di pH e nel lontano UV (190-250 nm) per osservare la struttura di lisozima e dei due frammenti a diversi valori di pH e seguire la loro cinetica di aggregazione. Le misurazioni sono state effettuate a temperatura ambiente in tampone 10 mM sodio fosfato, pH 7.0 e in 10 mM HCl, pH 2.0, con soluzioni ad una concentrazione compresa tra 0.4-0.6



mg/ml per il vicino UV e 0.1 mg/ml per il lontano UV, utilizzando una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 5 mm per il vicino UV e da 1 mm per il lontano UV. Gli esperimenti di dicroismo circolare sono stati realizzati con un dicrografo Jasco J-700 (Tokyo, Japan) ed il segnale dicroico è stato elaborato mediante un *software* fornito da Jasco ed installato su personal computer. Gli spettri sono stati registrati con costante di tempo di 16 sec, effettuando 2 accumuli, a una velocità di scansione di 20 nm/min.

### 2.3.3. *Fluorescenza*

Con il termine fluorescenza si indica il processo di emissione di un fotone in seguito alla transizione da uno stato elettronico eccitato di singoletto ad uno stato fondamentale, ancora di singoletto. La transizione è permessa e avviene rapidamente, con tempi di circa  $10^{-8}$  secondi. Le misure di fluorescenza sono molto utili per l'analisi conformazionale di proteine che contengono fluorofori, ovvero residui amminoacidici aromatici (Trp, Tyr e Phe) che assorbono la radiazione UV ad una specifica lunghezza d'onda, passano ad uno stato energetico superiore (stato eccitato) e ritornano allo stato fondamentale emettendo un quanto di luce ( $h\nu$ ) (Burstein *et al.*, 1973). I fluorofori delle proteine hanno una lunghezza d'onda di emissione caratteristica: Trp ha un massimo di assorbimento a 280 nm ed emette a circa 350 nm, Tyr assorbe a 275 ed emette a circa 300 nm, Phe assorbe a 270 nm ed emette a 282 nm. La resa quantica di fluorescenza è diversa per i tre amminoacidi e decresce nell'ordine: Trp, Tyr, Phe, ma i contributi di ciascun residuo si sommano, quindi si ottiene un unico spettro di fluorescenza della proteina con un massimo di emissione spostato verso i 300 nm o verso i 350 nm a seconda delle diverse proporzioni degli amminoacidi. In genere il triptofano è responsabile per più del 90 % dell'emissione delle proteine. L'emissione dovuta alla tirosina si può osservare nelle proteine che non contengono triptofani o che hanno una forte prevalenza di residui di Tyr rispetto al Trp. L'emissione della tirosina è rilevante in soluzione o nella proteina denaturata, ma viene generalmente diminuita nella proteina nativa, per effetto dei legami idrogeno in cui è impegnato il gruppo ossidrilico e per trasferimento di energia ai triptofani

presenti (*energy transfer*). La lunghezza d'onda a cui si ha il massimo di fluorescenza della proteina dipende dall'intorno in cui si trova il fluoroforo: se i residui di triptofano sono localizzati all'interno di una proteina globulare, e quindi in un intorno idrofobico, l'emissione avviene a 320-340 nm, mentre se i residui si trovano sulla superficie della proteina e quindi sono esposti ad un intorno acquoso e polare, l'emissione avviene a 350 nm. Gli spettri di fluorescenza di proteine globulari sono dunque utili per capire se i gruppi fluorofori sono localizzati sulla superficie o nel *core* idrofobico della proteina. Seguendo lo spostamento del massimo di emissione è inoltre possibile evidenziare le transizioni conformazionali della proteina al variare delle condizioni sperimentali, quali temperatura, pH ed esposizione ad agenti denaturanti. La denaturazione della proteina comporta uno spostamento della lunghezza d'onda di massima emissione a valori maggiori ed una diminuzione della resa quantica di fluorescenza, in quanto l'energia viene dissipata maggiormente attraverso interazioni con il solvente.

Le misure di fluorescenza sono state effettuate a 25°C con un fluorimetro Perkin-Elmer LS 50 (Norwalk, CT, USA) utilizzando una cuvetta con un cammino ottico di 1 cm in direzione di eccitazione e di 1 cm in direzione di emissione, in tampone 10 mM sodio fosfato, pH 7.0, in 10 mM HCl, pH 2.0 ed in 6 M Gdn·HCl.

#### 2.3.4. Denaturazione termica

La denaturazione termica del lisozima umano e del frammento 1-57/109-130 di lisozima umano, è stata seguita registrando la diminuzione del segnale dicroico a 222 nm in funzione della temperatura. Gli esperimenti di denaturazione sono stati eseguiti ad una concentrazione di proteina di 0.07 mg/ml per il lisozima umano e di 0.05 mg/ml per il frammento 1-57/109-130, sciolti in un tampone 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0, contenente 50 mM NaCl, utilizzando una cuvetta con cammino ottico di 1 cm, dotata di microaggitatore magnetico. La denaturazione termica dei peptidi è stata seguita aumentando la temperatura, a partire da 8°C, fino ad arrivare a 90°C, ad una velocità di 50 °C/h. Il segnale dicroico e la temperatura sono stati registrati simultaneamente da un programma

computerizzato fornito dalla Jasco. La reversibilità del processo di *unfolding* è stata determinata controllando la riacquisizione della struttura secondaria dopo raffreddamento alla temperatura iniziale (8°C). La frazione apparente di proteina denaturata ( $f_{app}$ ) è stata calcolata dai valori di ellitticità a 222 nm in funzione della temperatura usando l'equazione:

$$f_{app} = ([\theta]_U - [\theta]) / ([\theta]_U - [\theta]_N)$$

dove  $[\theta]_N$  indica il valore di ellitticità molare della proteina nativa calcolato a 8°C, mentre  $[\theta]_U$  indica l'ellitticità molare della proteina denaturata, calcolata a 90°C.

#### 2.4. Saggio di attività del lisozima

L'attività biologica di lisozima è stata misurata seguendo la lisi di cellule di *Micrococcus lysodeikticus*, osservando la diminuzione di assorbimento a 450 nm della sospensione cellulare per 20 minuti (Shugar, 1952). Sono state usate soluzioni proteiche con concentrazione 0.05 mg/ml in acqua, determinata mediante misura di assorbimento UV. In particolare, a 2.8 ml di una sospensione di *M. lysodeikticus* in tampone 0.07 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.25 (concentrazione 0.14 mg/ml), sono stati aggiunti sotto agitazione 6  $\mu\text{g}$  (120  $\mu\text{l}$ ) oppure 5  $\mu\text{g}$  (100  $\mu\text{l}$ ) di soluzione di lisozima intero o di frammento 1-57/109-130, rispettivamente. In un altro esperimento sono stati aggiunti contemporaneamente 2.5  $\mu\text{g}$  (50  $\mu\text{l}$ ) di frammento 58-108 più 4.2  $\mu\text{g}$  (84  $\mu\text{l}$ ) di frammento 1-57/109-130,. In tutti i casi la quantità di proteina o frammento in cuvetta corrispondeva a 46 mmoli.

L'attività del lisozima e dei due frammenti 1-57/109-130 e 58-108 è stata calcolata dividendo la variazione di assorbimento a 450 nm dopo 1 o 2 minuti per la quantità in mg di proteina utilizzata per il saggio e moltiplicando il risultato ottenuto per 1000.

$$U/\text{mg} = (\Delta_{450\text{ nm}}/\text{mg proteina}) \times 1000$$

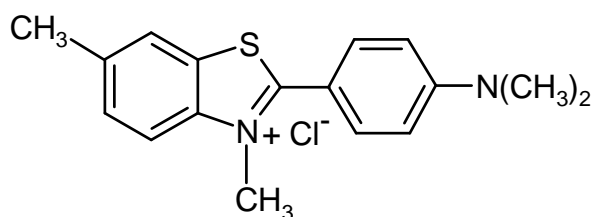
#### 2.5. Preparazione ed analisi di fibrille amiloidi

L'aggregazione del lisozima umano e dei frammenti 58-108 e 1-57/109-130 è stata indotta a 37°C in tampone 10 mM HCl, pH 2.0, utilizzando campioni

proteici con una concentrazione rispettivamente di 8, 3 e 5 mg/ml, corrispondenti a 0.55 mM di ogni proteina. Un altro esperimento di aggregazione di lisozima e frammento 1-57/109-130 è stato condotto in 20 mM sodio citrato, pH 3.0 e 60° C, sotto agitazione. Le cinetiche di aggregazione dei frammenti sono state monitorate prelevando dalle miscele di aggregazione aliquote di campione a vari tempi. Queste sono state immediatamente congelate a -80° C e poi analizzate mediante saggio con Tioflavina T (ThT), CD e microscopia elettronica a trasmissione.

### 2.5.1. Saggio della Tioflavina T (ThT)

Un'applicazione particolarmente interessante nell'ambito degli studi di fluorescenza riguarda l'utilizzo di un *probe* di fluorescenza, la Tioflavina T (ThT), la cui struttura chimica, di seguito riportata, è quella di un 2-(*p*-amminofenil)-6 metilbenzotiazolo.



Questa molecola è in grado di legare selettivamente aggregati amiloidi dando luogo ad un aumento dell'intensità di fluorescenza e ad uno spostamento del massimo di emissione a lunghezze d'onda maggiore (*red shift*). La molecola di ThT, infatti, assorbe a 385 nm e fluoresce a 445 nm, mentre il complesso ThT-amiloide assorbe a 450 nm ed emette a 482 nm (LeVine, 1993) (Figura 6).

La ThT interagisce specificamente con i foglietti che costituiscono le strutture ordinate delle fibrille amiloidi, mentre non lega le forme monomeriche e dimeriche della proteina. Il meccanismo con cui avviene questa interazione non è stato ancora chiarito; comunque, sia lo stato aggregato, sia la struttura a foglietti forniscono l'ambiente che stabilizza il complesso che fluoresce a 482 nm.

L'aumento dell'intensità di fluorescenza della ThT dipende dalla struttura dello stato aggregato delle proteine amiloidi e non dipende dalle caratteristiche di fluorescenza della proteina, quindi con il saggio di

fluorescenza con ThT è possibile determinare la presenza di aggregati proteici ed ottenere delucidazioni riguardanti la cinetica del processo di formazione delle fibrille ed i fattori che la influenzano.

Gli esperimenti con la Tioflavina T sono stati condotti, in questo lavoro di Tesi, in accordo con le condizioni descritte da LeVine (1993). L'intensità di fluorescenza della ThT è stata misurata eccitando la molecola a 440 nm con una finestra di eccitazione di 2.5 nm e registrando l'emissione di fluorescenza a 485 nm con una finestra di emissione di 2.5 nm.

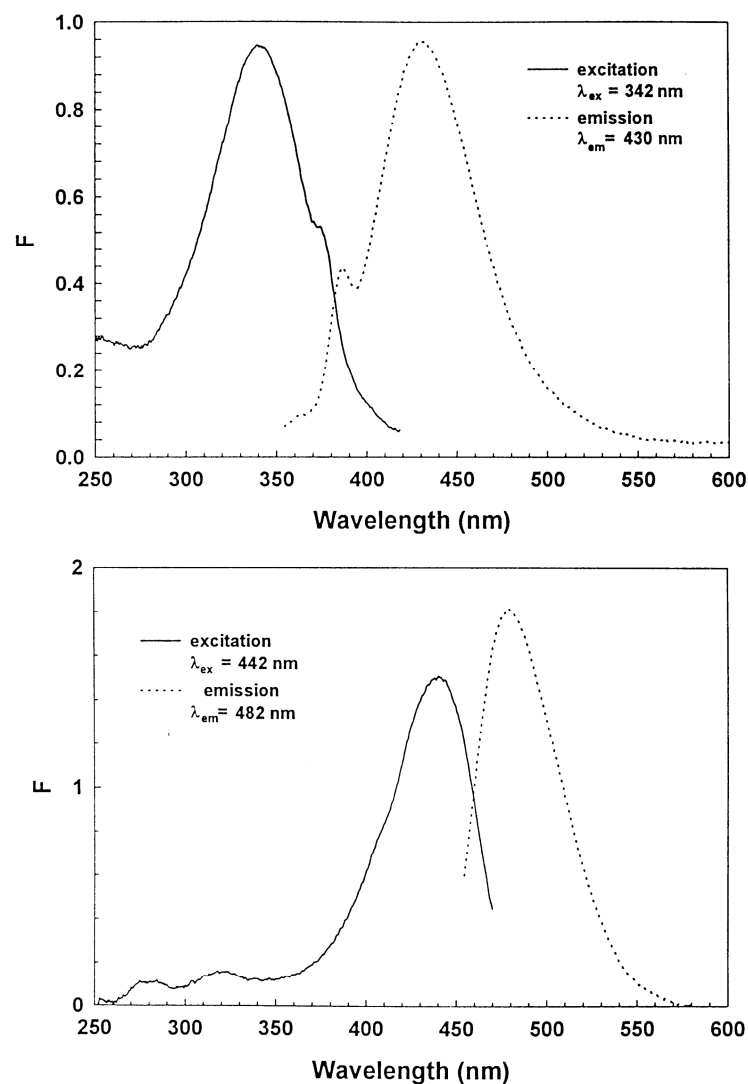


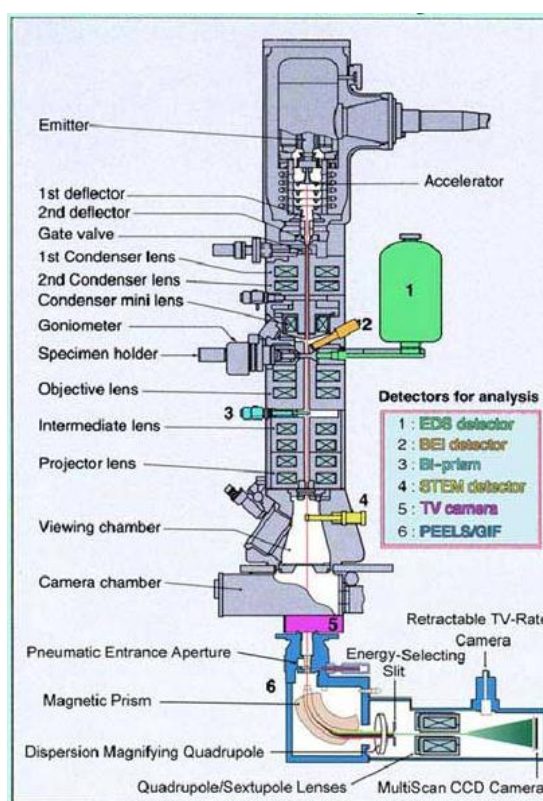
Figura 6. Spettri di fluorescenza (A) di tioflavina libera e (B) legata alle fibrille amiloidi formate dal peptide A associato al morbo di Alzheimer. Le concentrazioni delle due specie sono rispettivamente di 5 M ThT e 2 M peptide. Gli spettri di eccitazione sono indicati con linea continua, quelli di emissione con linea tratteggiata (Le Vine, 1993).

Ogni aliquota prelevata dalla miscela di aggregazione, corrispondente a 25-40  $\mu$ g di proteina o peptide, è stata diluita in tampone 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.0, contenente 25  $\mu$ M ThT, ottenendo un volume finale di 500  $\mu$ L e una concentrazione della soluzione proteica compresa tra 0.05 e 0.08 mg/mL. La soluzione madre di 2.5 mM ThT in tampone 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.0 è stata filtrata con filtri di 0.45  $\mu$ m, per rimuovere eventuali particelle indissolte.

### 2.5.2. Microscopia elettronica

La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è una tecnica che consente l'osservazione di oggetti molto piccoli con un elevato potere risolutivo effettivo, circa 1000 volte superiore a quello del microscopio ottico ordinario. Con il microscopio elettronico a trasmissione è possibile osservare distintamente particelle distanti tra loro meno di 0.5 nm con ingrandimenti dell'ordine dei 100000x (Prescott *et al.*, 1995).

Nel microscopio elettronico a trasmissione, riportato a lato; il campione viene irradiato da un fascio



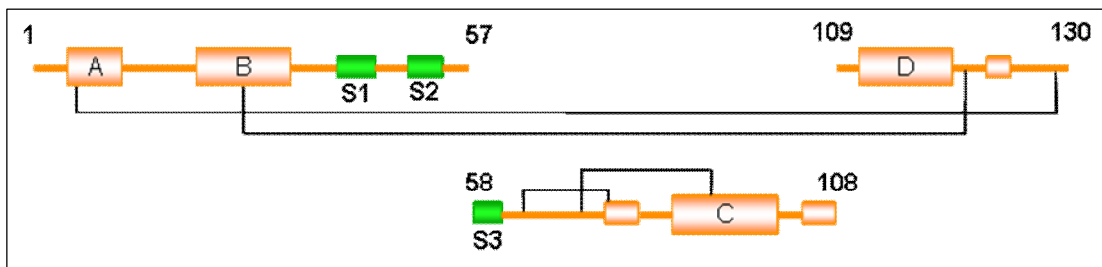
di elettroni prodotti da un filamento di tungsteno posto alla sommità di una colonna cilindrica. Gli elettroni vengono accelerati da una tensione di 75 kV, focalizzati sul campione dal condensatore e da una serie di lenti elettromagnetiche che collimano il raggio di elettroni sul campione in esame. Per eliminare gli effetti diffusivi degli urti tra gli elettroni e le molecole d'aria ed ottenere quindi un'immagine più chiara la colonna, le lenti ed il campione sono posti sotto vuoto spinto. Il campione, posto sopra una griglia metallica, disperde gli elettroni intercettati in base alla sua densità: le parti più dense diffondono maggiormente gli elettroni e appaiono quindi più scure nell'immagine, mentre le regioni meno

dense, trasparenti agli elettroni, risultano più luminose. Gli elettroni trasmessi vengono quindi messi a fuoco dalle lenti elettromagnetiche in modo da formare un'immagine chiara ed ingrandita su uno schermo fluorescente. Per ottenere una foto del preparato lo schermo fluorescente viene escluso e gli elettroni vengono intercettati con un'emulsione fotografica su lastra o pellicola. Una goccia della soluzione del campione opportunamente diluito in concentrazione 0.05-0,02 mg/ml viene posizionata sopra una griglia di rame ricoperta da una sottile pellicola di plastica, Formvar (400 mesh) e da un sottile film di carbonio. Il metodo impiegato per l'osservazione dei campioni è stato quello del contrasto negativo. Come colorante di contrasto è stata utilizzata una soluzione di acetato di uranile 1% (p/v). Le micrografie che sono riportate in questa Tesi sono state ottenute utilizzando un microscopio a trasmissione elettronica Hitachi H600 (Tokyo, Japan), ad un ingrandimento di 40000x e stampate su pellicole SO-163 Kodak Electron Image Film.

### III. RISULTATI

#### 1. Proteolisi limitata ed isolamento di frammenti di lisozima umano

Il lisozima è una proteina estremamente resistente all'attacco proteolitico. Esso non viene digerito da molte proteasi a pH neutro e nemmeno dalla pepsina a pH 2.0 (Polverino de Laureto *et al.*, 2002). Allo scopo di destabilizzare parzialmente la struttura della proteina e rendere quindi parzialmente accessibile alle proteasi la catena polipeptidica, sono state messe a punto delle speciali condizioni di proteolisi. La proteolisi limitata di lisozima umano è stata ottenuta con pepsina in tampone 0.1 M sodio citrato, pH 2.0, contenente 3 M urea, ad una temperatura di 52° C, per 8 minuti, con un rapporto enzima:substrato di 1:20 (p/p). La pepsina è un'endoproteasi attiva a pH acido, relativamente aspecifica, ma che dimostra una certa preferenza per il taglio al C-terminale dei residui amminoacidici Phe, Leu, Met e Trp (Fruton, 1970). La pepsina rimane sufficientemente attiva anche in 3 M urea, a 52° C per alcuni minuti, riuscendo quindi a idrolizzare in modo efficiente la proteina substrato. I legami peptidici di lisozima più suscettibili all'attacco della proteasi in queste condizioni sperimentali sono i legami Leu25-Ala26, Phe57-Gln58 e Ala108-Trp109 ed i principali frammenti prodotti sono l'1-25/26-57/109-130, il 1-57/109-130 ed il 58-108 (Figura 7 e Tabella 2). Il primo frammento è costituito dai segmenti 1-25, 26-57 e 109-130 della proteina uniti dai ponti disolfuro Cys6-128 e Cys30-116 della proteina nativa, che rimangono intatti durante la reazione di proteolisi, mentre il secondo frammento è costituito dai segmenti 1-57 e 109-130 della proteina uniti dagli stessi ponti disolfuro (vedi Schema sottostante).



Il terzo frammento, invece, è costituito da un unico segmento, il 58-108, e contiene i ponti disolfuro Cys65-81 e Cys77-95 della proteina. Con il procedere



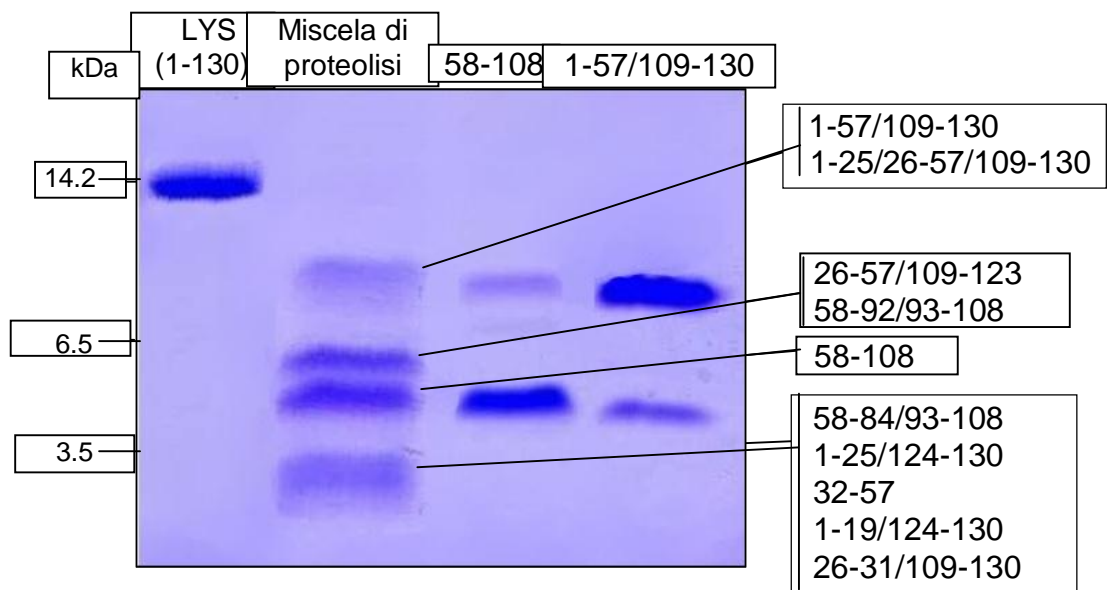
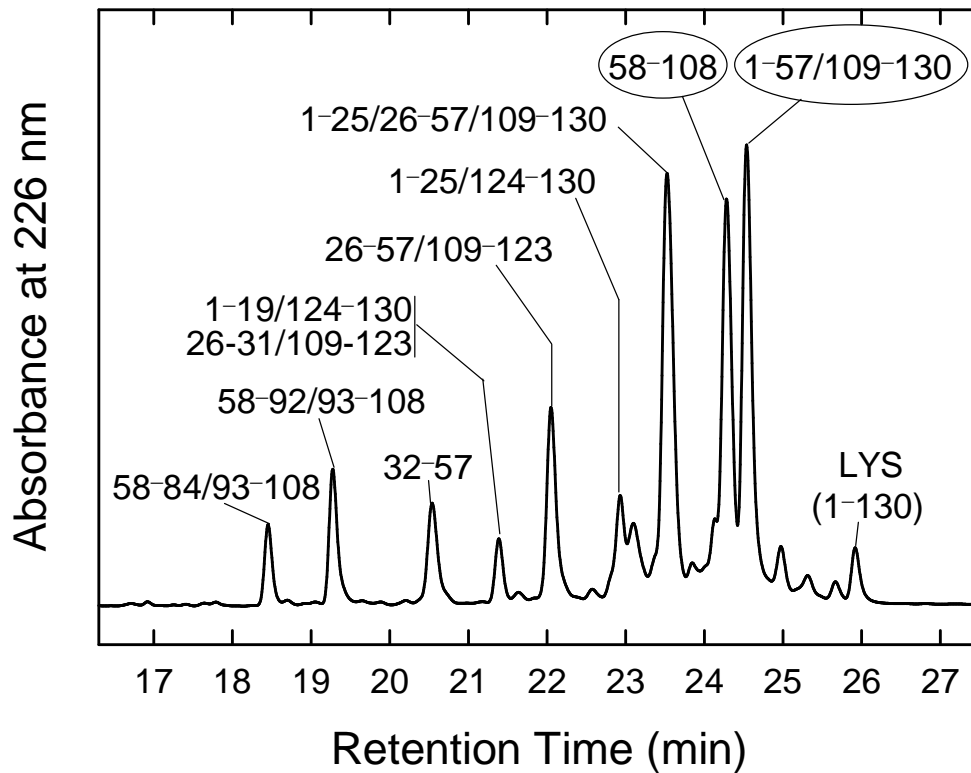


Figura 7. Cromatogramma RP-HPLC (in alto) e gel SDS-PAGE in condizioni non riducenti (in basso, pozzetto 2) della reazione di proteolisi di lisozima umano con pepsina a 52 °C in 0.1 M sodio citrato, pH 2.0, contenente 3 M urea. I frammenti cerchiati sul cromatogramma sono l'oggetto di questo lavoro di Tesi. Sul gel sono stati caricati anche i frammenti 58-108 e 1-57/109-130 purificati mediante RP-HPLC (pozzetti 3 e 4) (cfr. Metodi § 2.2.2 per ulteriori dettagli). Nel pozzetto 1 è stata caricata un'aliquota di lisozima umano.

Tabella 2. Peso molecolare, punto isoelettrico e coefficiente di estinzione dei frammenti di lisozima umano ottenuti mediante proteolisi con pepsina in 0.1 M sodio citrato, pH 2.0, contenente 3 M urea, a 52° C per 8 minuti.

Frammento <sup>a</sup>	Peso molecolare (Da)		pI <sup>d</sup>	(ml $\times$ mg <sup>-1</sup> $\times$ cm <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup>
	Teorico <sup>b</sup>	Sperimentale <sup>c</sup>		
26631/1096123	2722.2	2721.6	10.3	6.1
1619/1246130	2946.5	2945.8	8.9	0.5
32657	2958.1	2957.6	6.2	3.4
1625/1246130	3635.9	3635.1	9.3	0.9
58684/936108	4644.5	4644.9	9.2	1.6
586108	5467.2	5467.0	8.5	1.3
58692/936108	5488.2	5487.6	8.5	1.3
26657/1096123	5662.2	5661.9	9.3	4.7
1657/1096130	9261.4	9261.7	9.5	3.2
1625/26657/1096130	9279.4	9279.6	9.5	3.2
16130	14692.9	14693.8	9.3	2.5

<sup>a</sup>I frammenti costituiti da due segmenti, uniti dai ponti disolfuro della proteina nativa, sono stati ridotti con TCEP ed i peptidi derivanti dalla reazione sono stati identificati mediante ESI-MS (vedi Figura 3C).

<sup>b</sup>Peso molecolare calcolato in base alla sequenza amminoacidica del lisozima umano (Canfield *et al.*, 1971).

<sup>c</sup>Determinato mediante spettrometria di massa ESI (ESI-MS).

<sup>d,e</sup>Calcolati con il programma ProtParam del sito [www.expasy.org](http://www.expasy.org).

della reazione si ha la formazione di ulteriori frammenti derivanti dall'idrolisi dei peptidi principali (Figura 7 e Tabella 2).

In questo lavoro di Tesi sono stati purificati e studiati i frammenti complementari 1-57/109-130, che comprende le eliche A, B e D della proteina nativa ed il 58-108, che comprende l'elica C, in quanto rappresentano due domini strutturali del lisozima umano.

Questi due frammenti sono presenti in quantità rilevanti all'interno della miscela di proteolisi e ciò indica che sono sufficientemente stabili per resistere ad un'ulteriore degradazione. Di conseguenza, i due frammenti sono stati isolati dalla miscela di proteolisi mediante RP-HPLC in quantità sufficiente da garantire i successivi studi conformazionali e di aggregazione.

## 2. Caratterizzazione di frammenti di lisozima umano

L'identità e l'omogeneità dei frammenti raccolti è stata stabilita mediante SDS-PAGE (Figura 7, in basso), RP-HPLC (Figura 8) e spettrometria di massa *electrospray* (Figura 9).

### 2.1. Caratterizzazione chimica

La purezza dei frammenti proteici è stata controllata iniettando nuovamente in RP-HPLC un'aliquota di frammento purificato dalla reazione di proteolisi. In Figura 8 sono rappresentati i cromatogrammi dei frammenti polipeptidici isolati. La presenza di un unico picco nei cromatogrammi dimostra la purezza dei frammenti, mentre la misura di massa dei campioni corrispondenti ai picchi HPLC conferma l'identità dei due frammenti. Il frammento 58-108 è caratterizzato da una massa di 5467.0 Da, in linea con quella teorica che è di 5467.2 Da. Il frammento 1-57/109-130 risulta avere una massa di 9261.7 Da, in accordo con quella teorica di 9261.4 Da. Per verificare con certezza l'identità del frammento 1-57/109-130, quest'ultimo è stato ridotto con TCEP e la miscela di reazione è stata analizzata mediante RP-HPLC. La Figura 3C mostra il cromatogramma della miscela di riduzione del frammento 1-57/109-130, in cui si possono evidenziare due picchi ben distinti ed un picco minore corrispondente al frammento 1-57/109-130 non ridotto. Il materiale proteico contenuto nei picchi

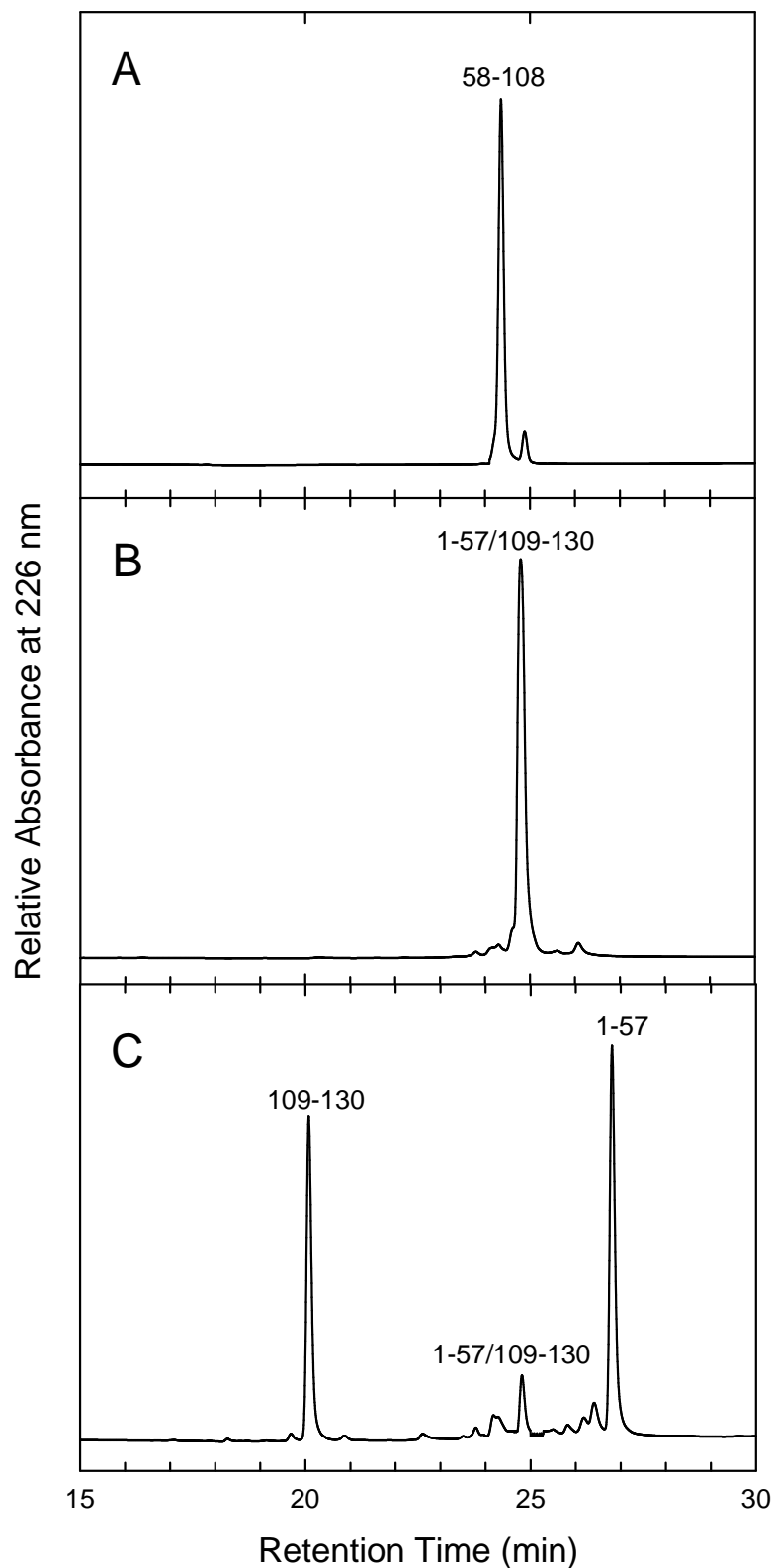


Figura 8. Cromatogrammi RP-HPLC dei frammenti 58-108 (A) e 1-57/109-130 (B) purificati mediante HPLC ed analizzati nuovamente per verificarne la purezza. L'identità del frammento 1-57/109-130 è stata confermata in seguito a riduzione del frammento con TCEP ed analisi dei prodotti della riduzione mediante HPLC (C) e spettrometria di massa ESI.

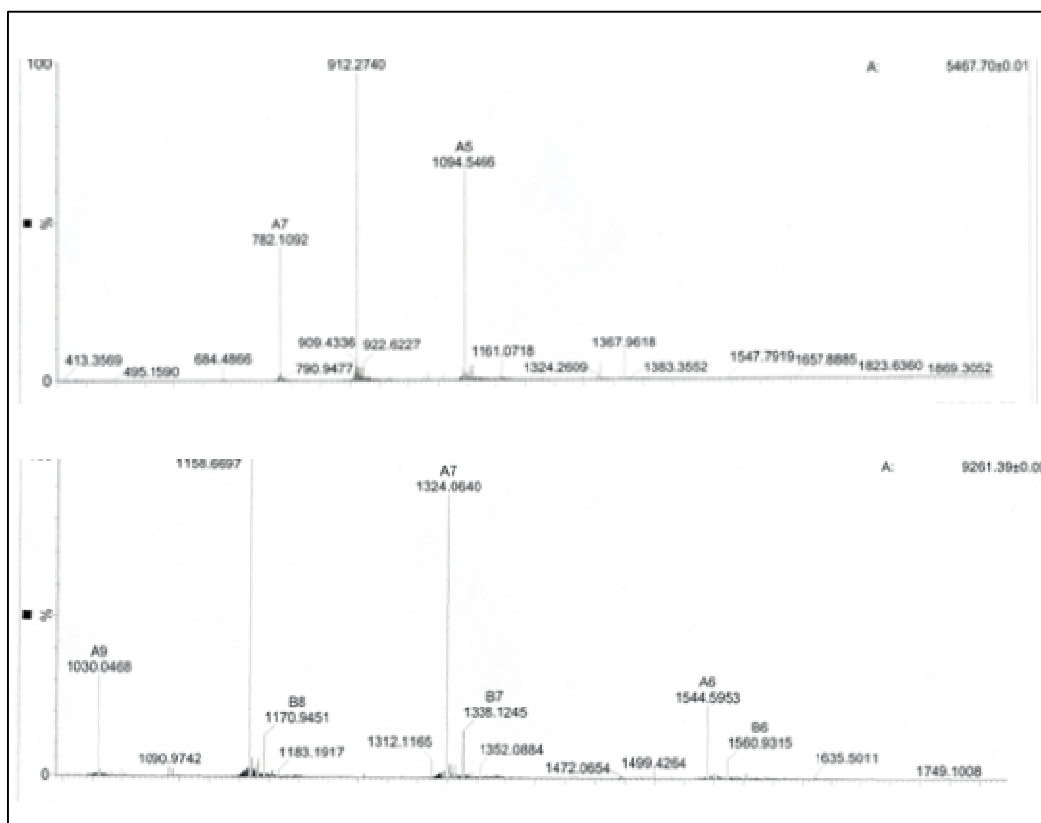


Figura 9. Spettri di massa electrospray dei frammenti 58-108 (in alto) e 1-57/109-130 (in basso) di lisozima umano.

risultanti è stato analizzato mediante spettrometria di massa. I due picchi ben distinti si sono rivelati essere il frammento 1-57 con PM 6572.0 Da, vicino al PM teorico di 6571.4, ed il frammento 109-130 che ha PM 2693.3 Da, valore in accordo con il PM teorico di 2694.0 Da.

L'identità dei frammenti è stata confermata anche mediante SDS-PAGE in condizioni non riducenti (Figura 7, in basso). Nel pozzetto 3, dove è stato caricato il frammento 58-108, è ben visibile una banda tra i 3.5 ed i 6.5 kDa, che conferma l'identità del frammento, poiché il suo peso molecolare è di 5467 Da. Nel pozzetto 4, dove è stato caricato il frammento 1-57/109-130, è visibile una banda tra i 14.2 ed i 6.5 kDa, in accordo con il peso molecolare previsto del frammento (9261 Da). Inoltre, è visibile una contaminazione tra i due frammenti, infatti nel pozzetto dove è stato caricato il frammento 58-108 è presente una banda di intensità minore corrispondente al frammento 1-57/109-130, mentre nel pozzetto dove è stato caricato il frammento 1-57/109-130 si nota una banda di intensità minore corrispondente al frammento 58-108. La contaminazione è dovuta al fatto che i frammenti in RP-HPLC eluiscono a tempi di ritenzione molto simili (Figura 7, in alto).

## *2.2. Caratterizzazione conformazionale di frammenti di lisozima umano*

I frammenti 1-57/109-130 e 58-108 sono stati caratterizzati dal punto di vista conformazionale mediante misure di dicroismo circolare, fluorescenza e stabilità termica, per valutarne le proprietà chimico-fisiche e confrontarle con quelle della proteina nativa.

### *2.2.1 Dicroismo circolare*

In Figura 12 sono rappresentati gli spettri nel lontano (in alto) e vicino (in basso) UV del lisozima umano, registrati a pH 7.0 ed a pH 2.0 a 25° C. Lo spettro nel lontano UV a pH 7.0 del lisozima mostra due bande negative, una a 208 nm e l'altra a 222 nm, tipiche di una struttura ad  $\alpha$ -elica. Lo spettro nel lontano UV a pH 2.0 non mostra sostanziali differenze con quello registrato a pH 7.0, dimostrando che anche a pH acido il lisozima mantiene una struttura secondaria

ordinata. Nello spettro nel vicino UV a pH 7.0 del lisozima, che contiene cinque Trp in posizione 28, 34, 64, 109, 112, sei Tyr in posizione 20, 38, 45, 54, 63 e 124, e quattro ponti disolfuro, si nota un ampio segnale dicroico negativo tra 260 e 290 nm ed un segnale positivo a 293 nm (Ikeda *et al.*, 1972). In particolare, il segnale positivo tra 290 e 300 nm indica che i residui di triptofano sono situati in un intorno rigido e asimmetrico (Kelly *et al.*, 2005). Lo spettro nel vicino UV del lisozima a pH 2.0 non mostra grandi differenze rispetto a quello registrato a pH 7.0, indicando che la struttura terziaria della proteina è stabile al cambiamento di pH. I dati ottenuti dagli spettri CD registrati nel lontano e nel vicino UV del lisozima umano indicano come la proteina mantenga una struttura secondaria e terziaria ben definita sia a pH neutro, sia a pH acido (Polverino de Laureto *et al.*, 2002).

In Figura 10 sono riportati gli spettri CD del frammento 58-108 registrati a 25° C nel lontano (in alto) e vicino (in basso) UV, a pH 7.0 ed a pH 2.0. Lo spettro del frammento 58-108 nel lontano UV a pH 7.0, riportato in Figura 5 in alto, mostra un minimo di ellitticità in corrispondenza di 200 nm, indicativo di una struttura disordinata, ma presenta anche un modesto segnale dicroico negativo a circa 222 nm, segnale tipico di una struttura ad  $\alpha$ -elica. La forma dello spettro nel lontano UV a pH 2.0 è molto simile a quello dello spettro a pH 7.0, anche se il segnale dicroico negativo a 222 nm appare leggermente minore. Lo spettro nel vicino UV a pH 7.0 del frammento 58-108 (Figura 5, in basso), che contiene un Trp in corrispondenza del residuo 64, una Tyr in posizione 63 e due ponti disolfuro, è caratterizzato da una ampia banda negativa tra 260 e 290 nm, simile a quella presente nello spettro del lisozima intero, anche se di minore intensità (Figura 12, in basso). La struttura dello spettro CD indica quindi che il frammento 58-108 a pH neutro possiede una certa struttura terziaria. A pH 2.0 (Figura 10, in basso), la forma e l'intensità del segnale dicroico nella regione 260-290 nm sono sostanzialmente invariati rispetto a quelli visibili nello spettro a pH 7.0. Quindi i dati ottenuti dagli spettri CD nel vicino e nel lontano UV indicano che il frammento 58-108 a pH neutro possiede un modesto contenuto di struttura secondaria e terziaria, che non varia sostanzialmente anche dopo esposizione

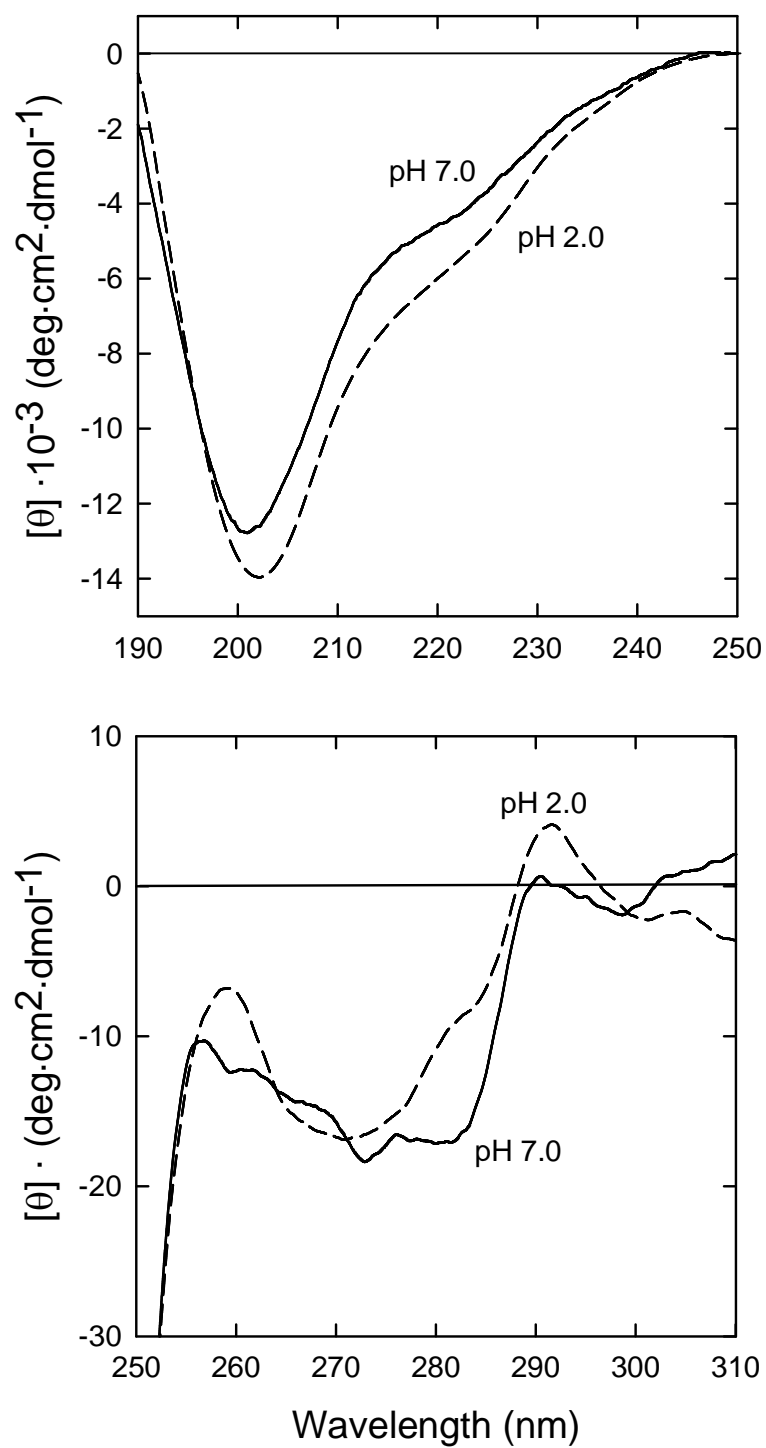


Figura 10. Spettri di dicroismo circolare nel lontano (sopra) e nel vicino (sotto) UV del frammento 58-108 di lisozima umano, registrati in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0 (linea continua) e in 10 mM HCl, pH 2.0 (linea tratteggiata).



del frammento 58-108 ad un ambiente acido.

In Figura 11 (in alto) sono riportati gli spettri CD nel lontano UV del frammento 1-57/109-130 a pH 7.0 e a pH 2.0. Lo spettro a pH 7.0 mostra una chiara struttura ad  $\alpha$ -elica, infatti sono ben visibili le due bande negative a circa 208 ed 222 nm, caratteristiche di questa struttura, indicando che il frammento 1-57/109-130 a pH neutro mantiene una conformazione strutturata. Dal rapporto tra i segnali dicroici a 208 e 222 nm del frammento e della proteina intera si può stimare che il frammento 1-57/109-130 ha un contenuto di  $\alpha$ -elica pari al 72 % rispetto a quello della proteina intera. A pH 2.0 invece il frammento assume una conformazione più disordinata, come dimostra il calo d'intensità del segnale a 222 nm e lo spostamento della banda di segnale dicroico negativo da 208 a 200 nm. In Figura 5 (in basso) sono riportati gli spettri CD nel vicino UV del frammento 1-57/109-130 a pH 7.0 ed a pH 2.0. Lo spettro nel vicino UV a pH 7.0 del frammento 1-57/109-130, che contiene quattro Trp in corrispondenza dei residui 28, 34, 109 e 112, cinque Tyr in posizione 20, 38, 45, 54 e 124, e due ponti disolfuro, è caratterizzato dal tipico segnale dicroico positivo a 293 nm, indicativo della presenza di struttura terziaria rigida intorno ai residui di Trp. L'intensità della banda è ridotta però rispetto a quella della proteina intera (circa 70 %). Inoltre, nello spettro CD del frammento l'ampio segnale dicroico tra 260 e 280 nm, dovuto ai residui di Phe e Tyr, subisce un'inversione verso il segno positivo, indicando che la struttura terziaria del frammento è diversa rispetto a quella della proteina intera. La forma dello spettro CD nel vicino UV registrato a pH 2.0 non varia di molto rispetto a quello dello spettro a pH 7.0, anche se l'intensità del segnale dicroico è minore, indicazione di parziale denaturazione della struttura terziaria. Nel complesso, gli spettri nel lontano e vicino UV del frammento 1-57/109-130 indicano che a pH neutro il frammento possiede una struttura secondaria e terziaria stabile e che invece a pH acido esso è sostanzialmente privo di struttura.

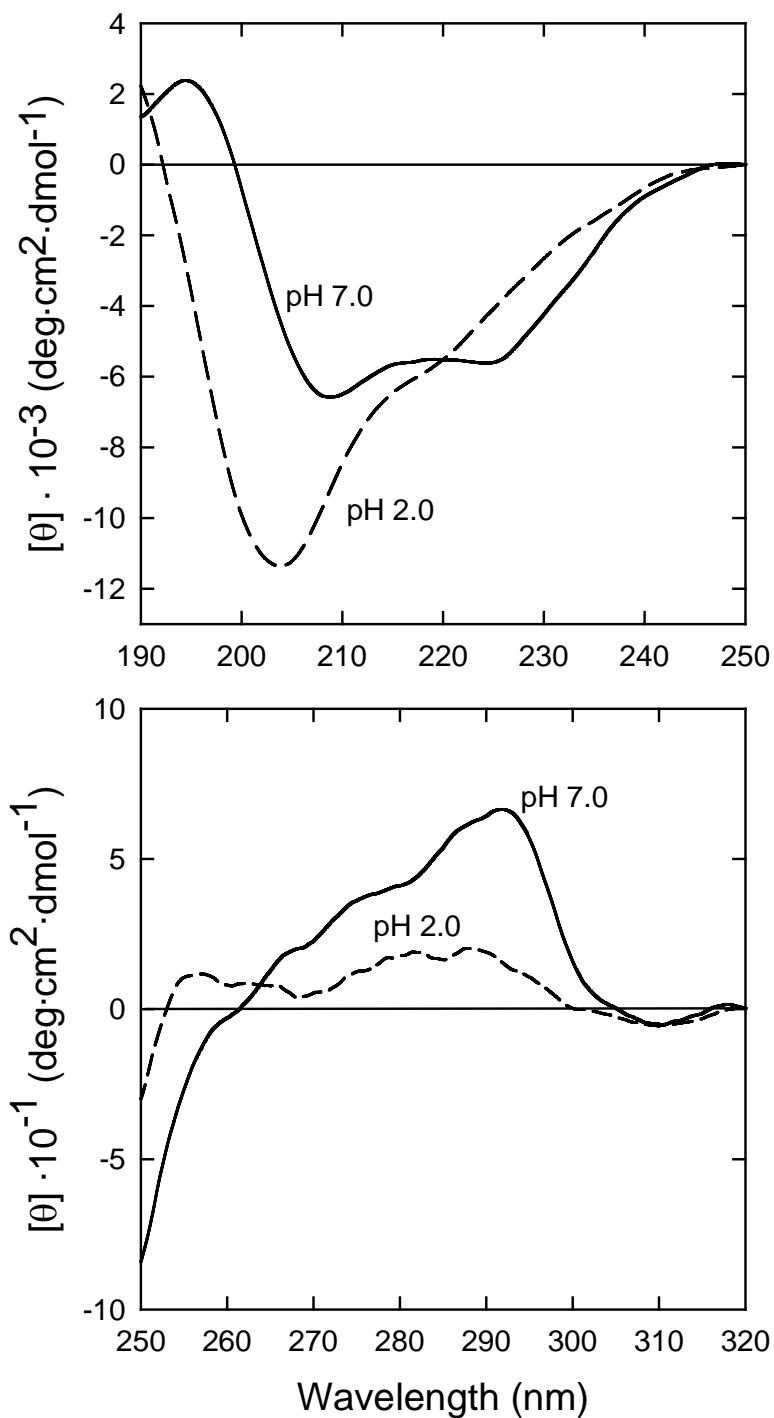


Figura 11. Spettri di dicroismo circolare nel lontano (sopra) e nel vicino (sotto) UV del frammento 1-57/109-130 di lisozima umano, registrati in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0 (linea continua) e in 10 mM HCl, pH 2.0 (linea tratteggiata).

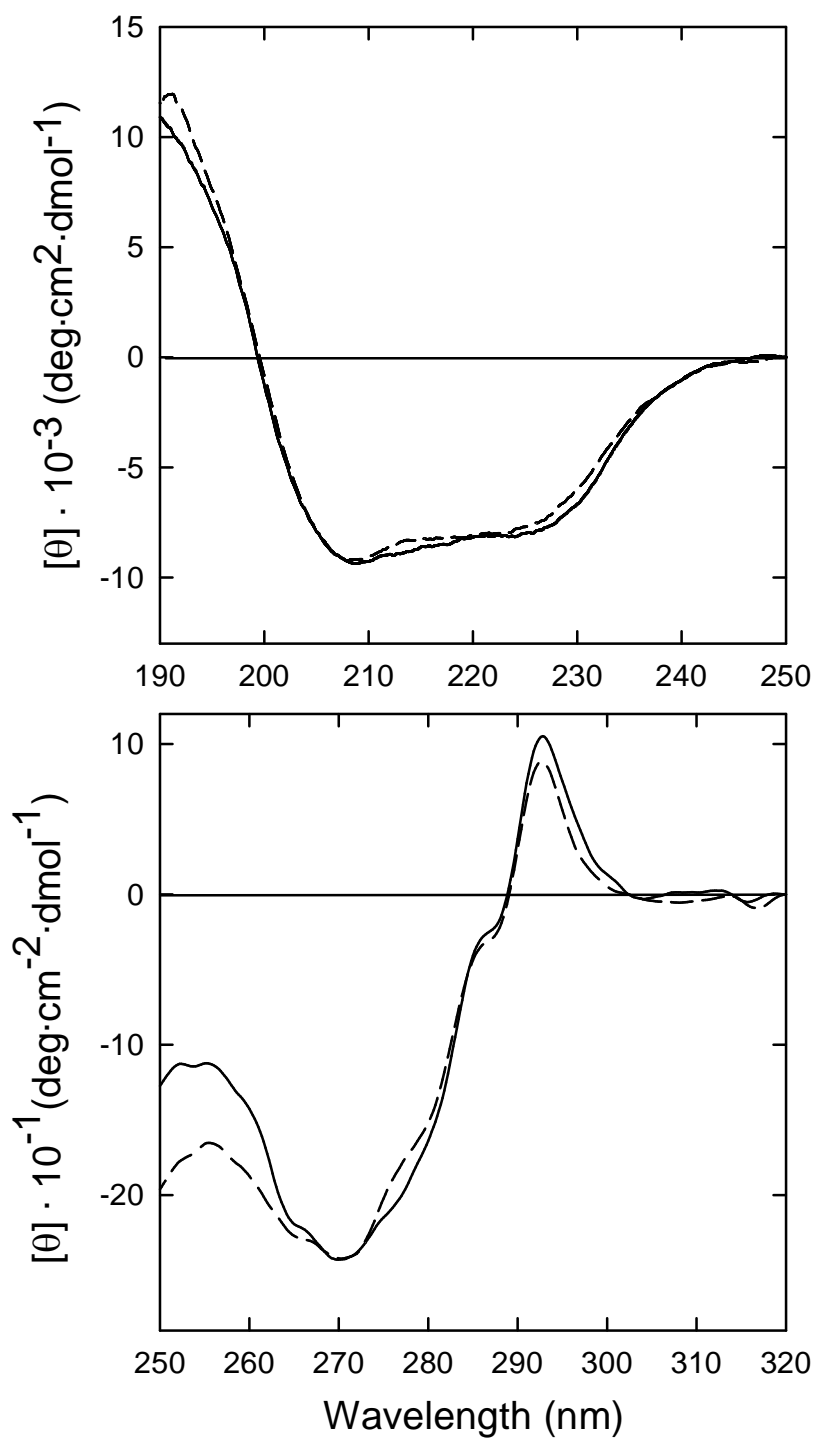


Figura 12. Spettri di dicroismo circolare nel lontano (sopra) e nel vicino (sotto) UV del lisozima umano, registrati in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0 (linea continua) e in 10 mM HCl, pH 2.0 (linea tratteggiata).

### 2.2.2. Fluorescenza

Per caratterizzare ulteriormente dal punto di vista conformazionale i frammenti 58-108 e 1-57/109-130 di lisozima, sono stati registrati i relativi spettri di fluorescenza a pH 7.0, a pH 2.0 ed in 6 M Gdn·HCl.

In Figura 15 sono rappresentati gli spettri di fluorescenza del lisozima umano registrati eccitando la proteina a 280 nm (A) ed a 295 nm (B). Eccitando a 280 nm si ha l'eccitazione sia dei residui di Tyr sia di Trp, mentre a 295 nm c'è l'eccitazione selettiva dei residui di Trp. Gli spettri registrati a pH 7.0 e a pH 2.0 mostrano un massimo di emissione pari a 340 nm, indicando come i cinque residui di Trp ed i sei residui di Tyr siano parzialmente nascosti all'interno del core della proteina. L'intensità di fluorescenza è piuttosto bassa, dovuta probabilmente ad fenomeno di quenching causato dai ponti disolfuro in prossimità degli amminoacidi fluorescenti. Ponendo invece il lisozima in una soluzione contenente 6 M Gdn·HCl, cioè in condizioni denaturanti, si ha uno spostamento del massimo di emissione da 340 a 352 nm, ed un forte aumento del segnale di fluorescenza rispetto agli spettri registrati a pH 2.0 e 7.0. Questi risultati indicano da un lato l'esposizione dei fluorofori all'ambiente acquoso (*red-shift*) ed una riduzione del quenching, in quanto la denaturazione della proteina comporta un allontanamento dei residui fluorescenti dai ponti disolfuro.

In Figura 13 sono rappresentati gli spettri di fluorescenza del frammento 58-108 di lisozima registrati eccitando il frammento a 280 nm (A) ed a 295 nm (B). Gli spettri a pH 7.0 e a pH 2.0 evidenziano un massimo di emissione a 350 nm, che suggerisce l'esposizione al solvente dell'unico triptofano presente nella sequenza (Trp64), ed un fenomeno di quenching, che si riduce notevolmente una volta che il frammento è posto in 6 M Gdn·HCl, come già osservato per il lisozima. In queste condizioni però, si ha un piccolo spostamento del massimo di emissione di fluorescenza da 350 a 352 nm, indice di un'ulteriore destrutturazione del frammento.

In Figura 14 sono riportati gli spettri di fluorescenza del frammento 1-57/109-130, registrati eccitando il frammento a 280 nm (A) ed a 295 nm (B). Gli spettri di emissione a pH 7.0 e a pH 2.0 registrati eccitando a 280 nm evidenziano un massimo di emissione a 348 nm, indice di notevole esposizione degli

amminoacidi fluorescenti (4 Trp e 5 Tyr) al solvente. Lo spettro registrato a pH 2.0 mostra una maggiore intensità di fluorescenza rispetto a quello registrato a pH 7.0, indicando quindi una denaturazione del frammento. Ponendo il frammento 1-57/109-130 in 6 M Gdn-HCl si ha una completa esposizione dei residui di Trp al solvente, come è evidenziato dallo spostamento del massimo di fluorescenza da 348 a 355 nm. Lo spettro registrato eccitando a 295 nm indica una esposizione dei quattro residui di Trp (in posizione 28, 34, 109, 112) rispetto agli altri amminoacidi fluorescenti, come indica il massimo di emissione a 350 nm rispetto al massimo di 348 nm registrato a 280 nm.

È interessante notare che nel caso del lisozima e dei suoi frammenti completamente denaturati (6 M Gdn-HCl) non si osserva il massimo di emissione della Tyr (300 nm). Questo è dovuto al fenomeno di *energy transfer*, ovvero al fatto che i residui di Tyr sono vicini nella sequenza amminoacidica a quelli di Trp e quindi la radiazione emessa dalla Tyr viene assorbita dal Trp anche quando la catena è completamente denaturata. Nel complesso, questi risultati indicano che i fluorofori dei frammenti di lisozima sono ampiamente esposti al solvente.

### 2.2.3. Denaturazione termica

Il processo di denaturazione della struttura secondaria del lisozima umano e del frammento 1-57/109-130 è stato seguito registrando la variazione del segnale dicroico a 222 nm, in funzione della temperatura. È stata scelta questa lunghezza d'onda in quanto sia la proteina intera sia il frammento 1-57/109-130 mostrano un significativo segnale di  $\alpha$ -elica nel lontano UV (Figure 11 e 12). La curva di denaturazione del frammento 58-108 non è stata registrata, in quanto il frammento a pH 7.0 assume una conformazione alquanto destrutturata (Figura 10).

Il profilo di denaturazione della proteina intera indotto dal calore è caratterizzato da una veloce transizione conformazionale, indicazione di una denaturazione cooperativa, che avviene nell'intervallo di temperatura tra 70° e 80° C. La derivata della curva ha permesso di calcolare la temperatura di *melting* del lisozima, che è risultata pari a 76° C, in accordo con studi precedenti (Haezebrouck *et al.*, 1995). Il profilo di denaturazione termica del frammento

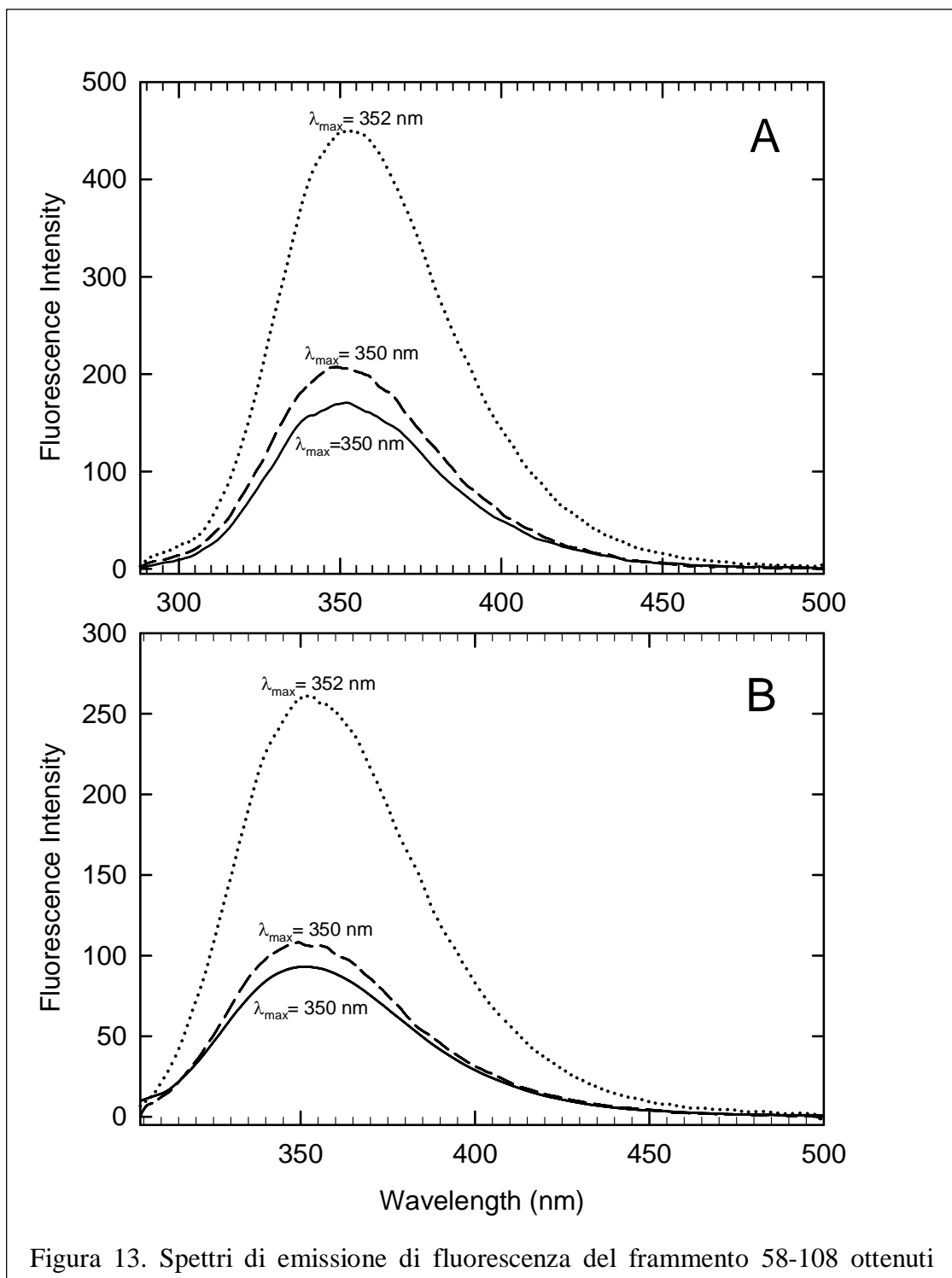


Figura 13. Spettri di emissione di fluorescenza del frammento 58-108 ottenuti eccitando i campioni alla lunghezza d'onda di 280 nm (A) e 295 nm (B). Gli spettri sono stati registrati a 25°C in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0 (linea continua), in 10 mM HCl, pH 2.0 (linea tratteggiata) ed in presenza di 6M Gdn·HCl (linea a puntini).

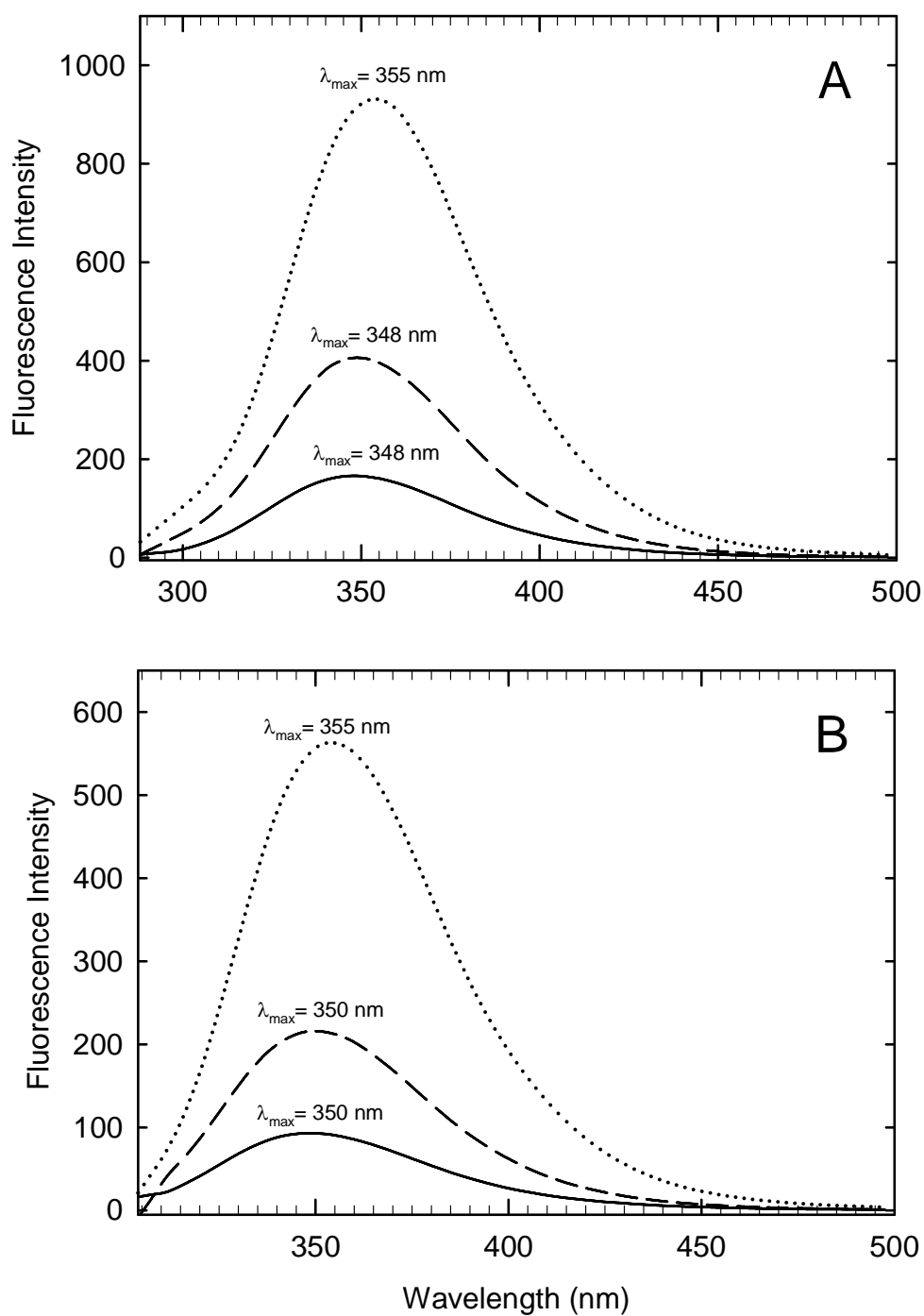


Figura 14. Spettri di emissione di fluorescenza del frammento 1-57/109-130 ottenuti eccitando i campioni alla lunghezza d'onda di 280 nm (A) e 295 nm (B). Gli spettri sono stati registrati a 25°C in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0 (linea continua), in 10 mM HCl, pH 2.0 (linea tratteggiata) ed in presenza di 6M Gdn·HCl (linea a puntini).

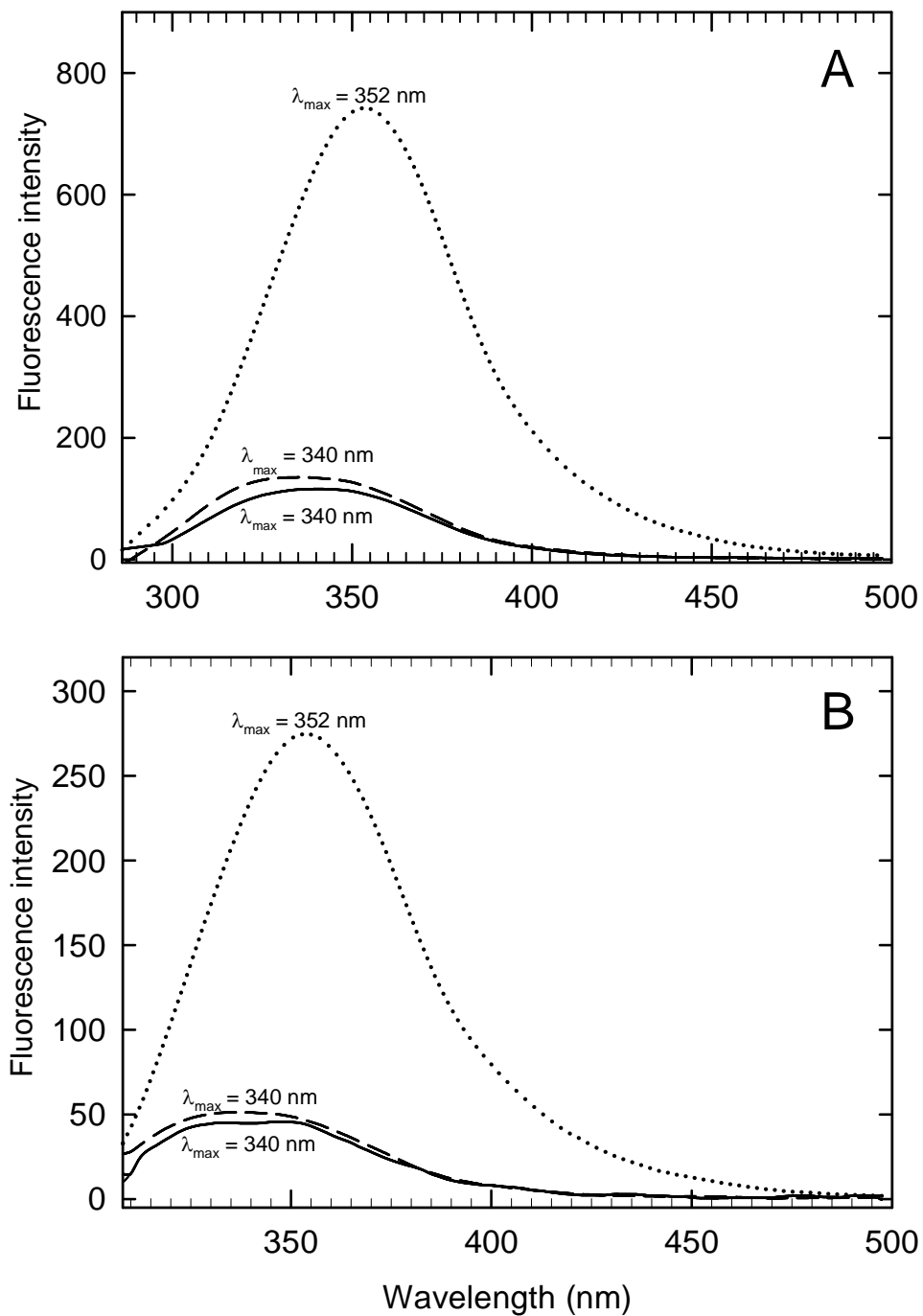


Figura 15. Spettri di emissione di fluorescenza del lisozima umano ottenuti eccitando i campioni alla lunghezza d'onda di 280 nm (A) e 295 nm (B). Gli spettri sono stati registrati a 25°C in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0 (linea continua), in 10 mM HCl, pH 2.0 (linea tratteggiata) ed in presenza di 6M Gdn-HCl (linea a puntini).



1-57/109-130 è di tipo cooperativo, anche se la transizione conformazionale avviene in un intervallo di temperatura più ampio, tra 35° e 70° C.

La derivata della curva di denaturazione, ha permesso di calcolare la temperatura di *melting* del frammento 1-57/109-130, che è risultata essere di 45 °C. Questi risultati indicano che il frammento 1-57/109-130 possiede un *fold* compatto allo stato isolato, conservando una notevole stabilità termica ( $T_m = 45^\circ$  C). Inoltre, la cooperatività del processo di denaturazione è indicazione di impaccamento delle catene laterali nella struttura proteica.

### 3. Saggio di attività

Il frammento 1-57/109-130 contiene i due amminoacidi che costituiscono il sito attivo della proteina (residui Glu35 e Asp52). Per verificare se questo frammento è in grado di esercitare l'attività batteriolitica propria della proteina intera, è stato condotto il saggio spettroscopico con *Micrococcus lysodeikticus* (Shugar, 1952).

L'assorbanza a 450 nm della sospensione batterica in presenza del frammento 1-57/109-130 non mostra alcuna riduzione dopo 20 minuti, indicando che questo frammento non è attivo (Figura 17). Aggiungendo al frammento 1-57/109-130 il frammento 58-108, si nota invece un calo dell'assorbanza a 450 nm, anche se inferiore rispetto a quello osservato in presenza della proteina intera. Questo risultato indica che i due frammenti complementari 58-108 e 1-57/109-130 si associano tra di loro e che il complesso possiede un'attività corrispondente al 4-8 % rispetto a quella della proteina intera, come evidenziato dalla misura delle Unità specifiche (Figura 17, in basso).

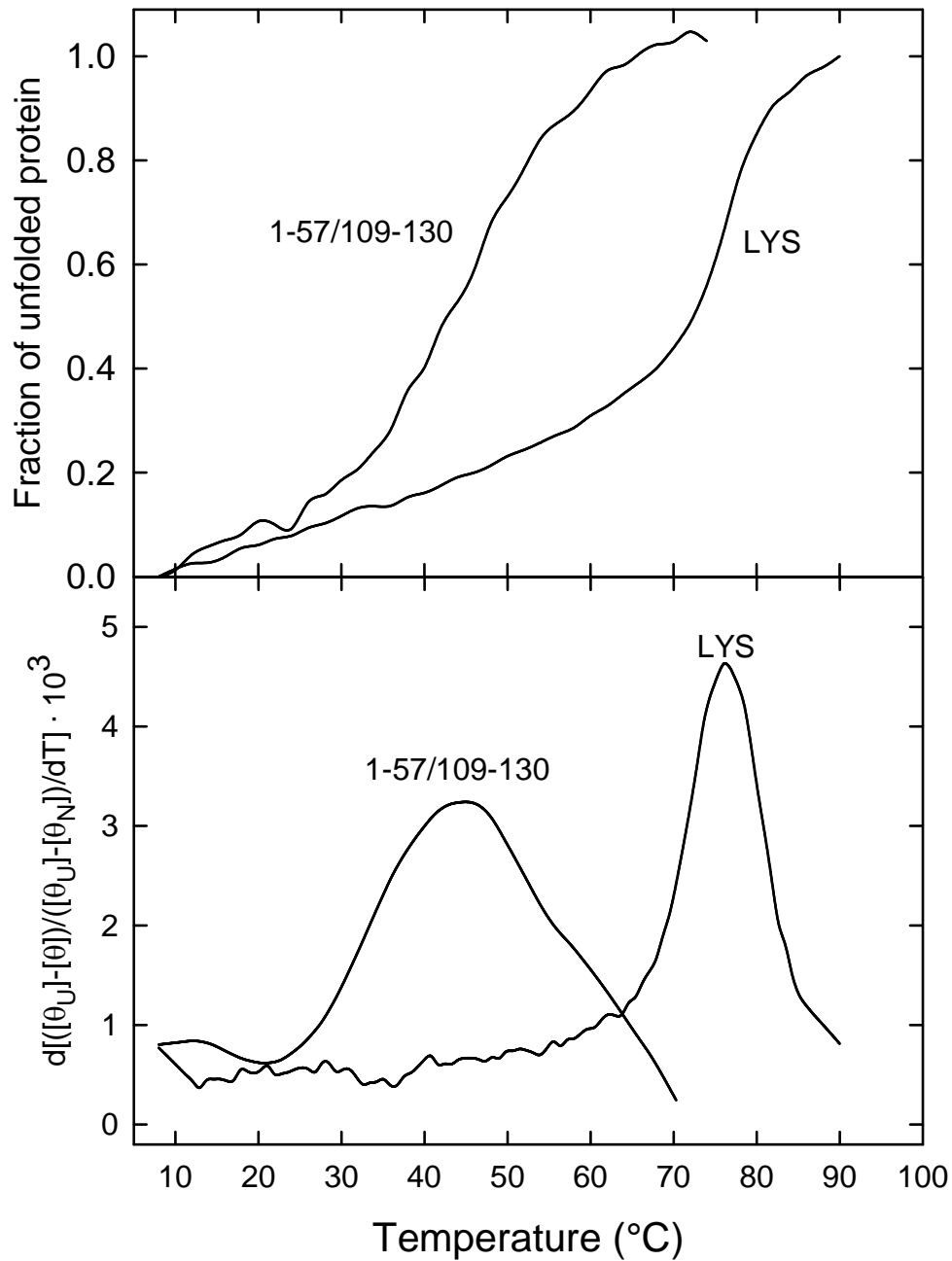
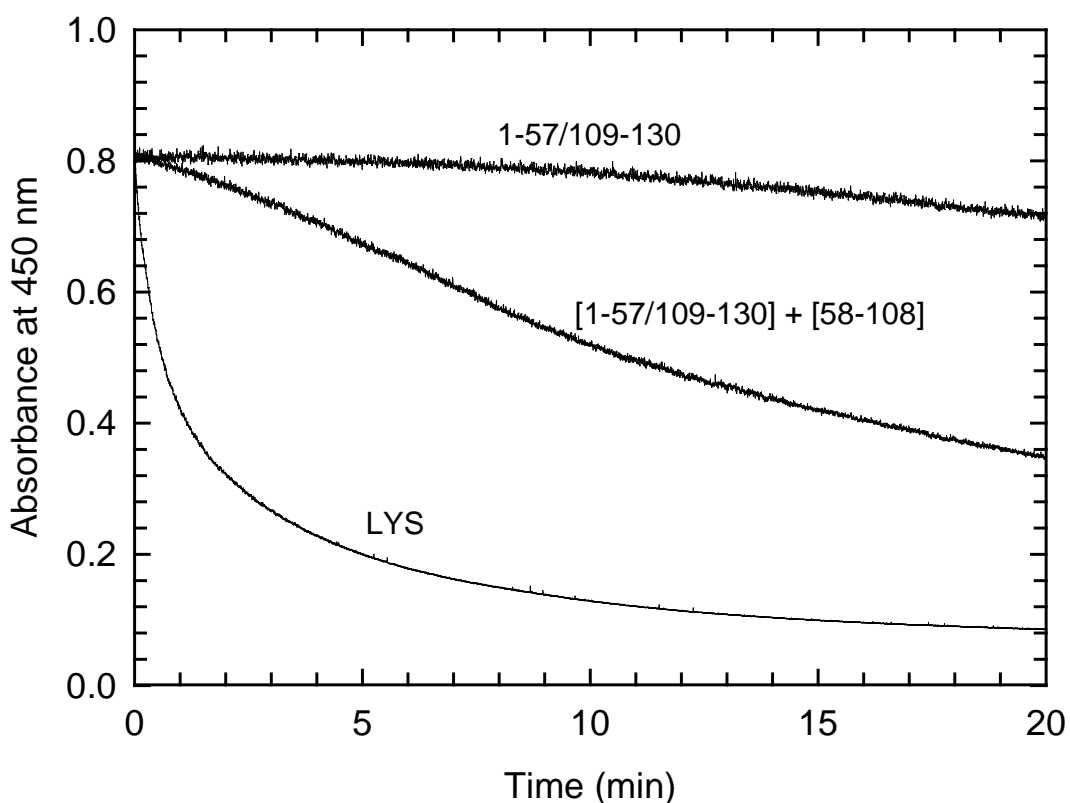


Figura 16. Curve di denaturazione termica del frammento 1-57/109-130 (cerchi bianchi) e di lisozima umano (1-130) (cerchi neri) ottenute seguendo la diminuzione del segnale dicroico a 222 nm da 8 a 90 °C (A). Le curve sono state registrate in 10 mM sodio fosfato, pH 7.0, contenente 50 mM NaCl. Le derivate seconde delle curve corrispondenti sono riportate in B.



<i>Specie proteica</i>	<i>450nm</i>	<i>450nm</i>	<i>Unità specifiche (U<math>\text{mg}^{-1}</math>)</i>	
	<i>1 min</i>	<i>2 min</i>	<i>1 min</i>	<i>2 min</i>
LYS (1-130)	0,404	0,501	67333	83500
1-57/109-130 + 58-108	0,016	0,038	2206	6333

Figura 17. Curve di attività batteriolitica (sopra) e Tabella riportante l'attività espressa come Unità specifiche (sotto) di lisozima umano (1-130), del frammento 1-57/109-130 e dei frammenti 58-108 e 1-57/109-130 uniti insieme (Shugar, 1952 (Vedi Metodi § 2.4 per ulteriori dettagli). Il saggio è stato condotto con 6 g di lisozima umano, con 4 g di frammento 1-57/109-130 e con 4.3 più 2.5 g di frammento 1-57/109-130 e 58-108, rispettivamente, corrispondenti in tutti i casi a 46 mmoli proteiche totali in cuvetta.

#### 4. Aggregazione amiloide di frammenti di lisozima

Per studiare le proprietà amiloidogeniche dei due frammenti 58-108 e 1-57/109-130 di lisozima umano, queste specie sono state incubate a 37° C in 10 mM HCl, pH 2.0 in concentrazione 0.55 mM. Il processo di aggregazione dei due frammenti è stato seguito mediante saggio con il colorante fluorescente Tioflavina T (ThT) (Le Vine, 1993). La Figura 18 mostra l'emissione di fluorescenza della ThT a 485 nm in presenza di aliquote di frammento 58-108, di frammento 1-57/109-130 e della proteina intera, prelevate a tempi specifici dalla soluzione del campione durante l'incubazione a 37° C. Dopo circa 4 giorni di incubazione del frammento 58-108, si nota un leggero incremento della fluorescenza, mentre a 5 giorni si nota un evidente aumento di fluorescenza della ThT a 485 nm, indicazione della presenza di fibrille. Dopo 7 giorni di incubazione si osserva un aumento dell'intensità di fluorescenza molto rapido e con un andamento cooperativo, che giunge ad un *plateau* dopo circa 10 giorni di incubazione. Il frammento 1-57/109-130 e la proteina intera non mostrano invece alcun aumento di fluorescenza dopo 15 giorni di incubazione a pH 2.0, indicando che la soluzione non contiene aggregati con struttura regolare  $\beta$ .

Le variazioni conformazionali del frammento 58-108 e del frammento 1-57/109-130 durante l'aggregazione sono state seguite mediante misurazioni CD nel lontano UV (Figura 19). Con l'aumentare del tempo di incubazione, si nota una notevole variazione nella forma degli spettri CD nel vicino UV del frammento 58-108. Infatti, lo spettro CD del frammento dopo 7 g d'incubazione non presenta più il segnale caratteristico della struttura *random coil*, ma due segnali negativi a 208 e 218 nm, indicativi di una struttura mista di tipo *random coil* e  $\beta$ , mentre dopo 14 g d'incubazione, dove sono presenti fibrille mature in soluzione, nello spettro CD del frammento 58-108 si nota una banda a 218 nm, caratteristica della struttura a foglietto  $\beta$ . Lo spettro del frammento 1-57/109-130, al contrario, non subisce sostanziali variazioni durante l'incubazione (Figura 20).

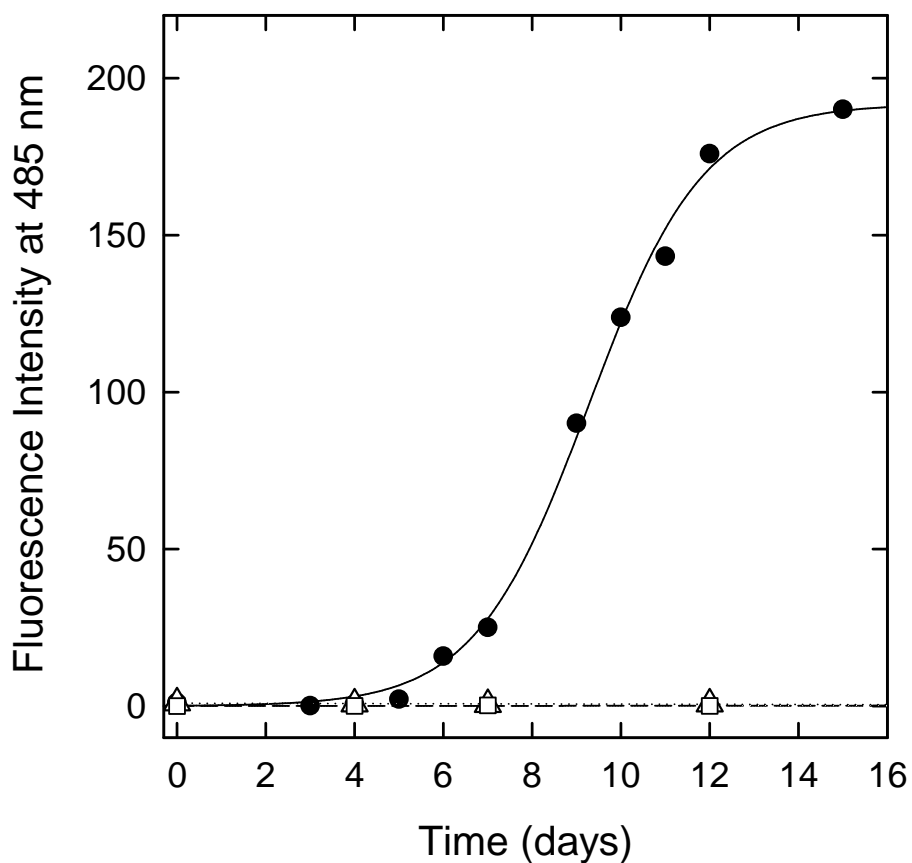


Figura 18. Aggregazione amiloide del frammento 58-108 (cerchi neri), del frammento 1-57/109-130 (triangoli bianchi) e di lisozima umano (quadrati bianchi) seguita mediante saggio di fluorescenza con Tioflavina T (ThT). Un'aliquota (8  $\mu$ l) della soluzione proteica, incubata per il tempo indicato, è stata aggiunta ad una soluzione (492  $\mu$ l) 25  $\mu$ M di ThT in tampone 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.0. La lunghezza d'onda di eccitazione è stata fissata a 440 nm e l'emissione di fluorescenza è stata registrata a 485 nm (vedi Metodi § 2.5.1).

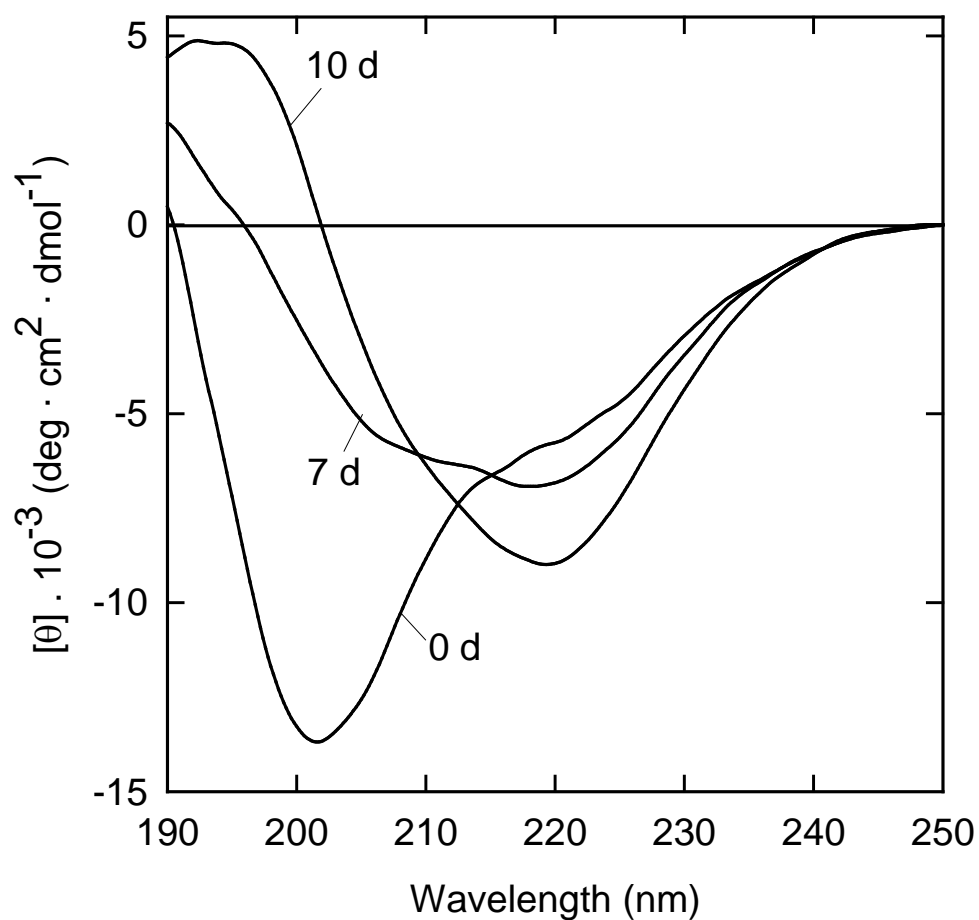


Figura 19. Aggregazione amiloide del frammento 58-108 a pH 2.0, 37° C seguita mediante dicroismo circolare nel lontano UV (CD). Aliquote della soluzione proteica, incubate per il periodo di tempo indicato, sono state prelevate e diluite, immediatamente prima di registrare lo spettro, fino ad ottenere una concentrazione 0.1 mg/ml.

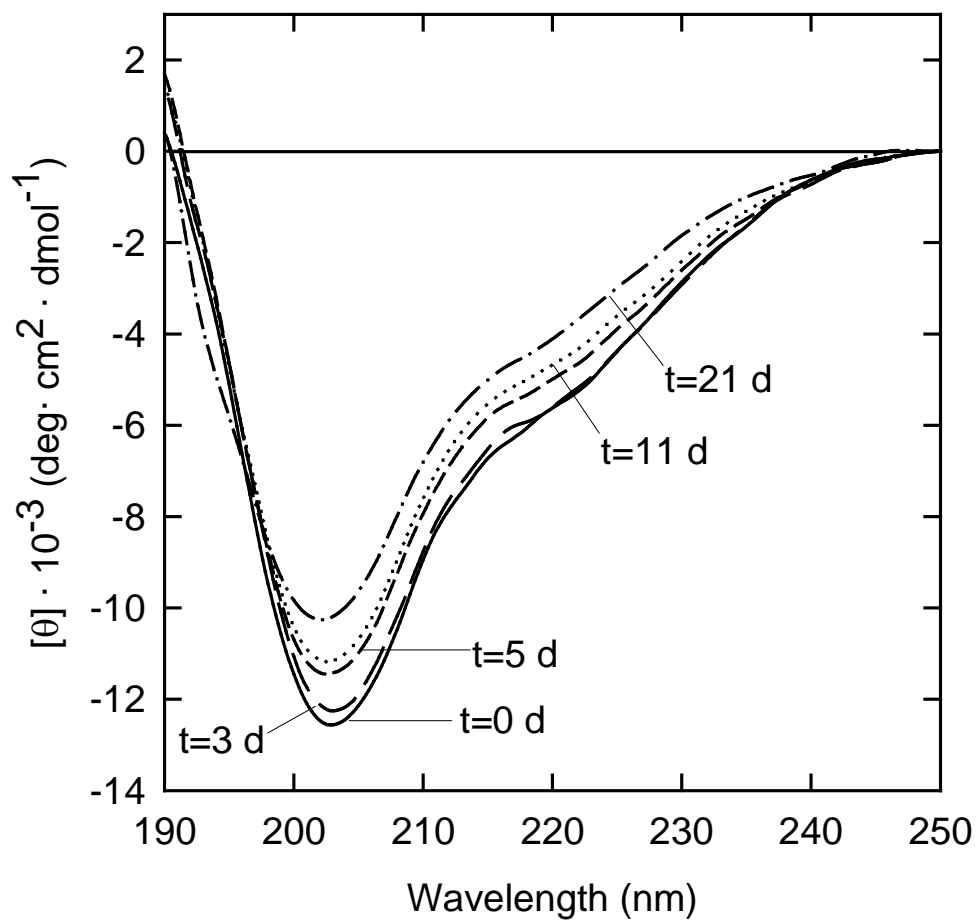


Figura 20. Aggregazione amiloide del frammento 1-57/109-130 a pH 2.0, 37° C seguita mediante dicroismo circolare nel lontano UV (CD). Aliquote della soluzione proteica, incubate per il periodo di tempo indicato, sono state prelevate e diluite, immediatamente prima di registrare lo spettro, fino ad ottenere una concentrazione 0.1 mg/ml.

La morfologia delle fibrille formate dal frammento 58-108 dopo 5 e 10 g d'incubazione e gli aggregati formati dal frammento 1-57/109-130 dopo 5 e 40 g d'incubazione a pH 2.0, sono stati analizzati mediante microscopia elettronica (ME) (Figura 21). Il frammento 58-108 mostra una grande quantità di fibrille tipicamente amiloidi, dritte, non ramificate e con diametro 7-8 nm. Il frammento 1-57/109-130 dopo 5 g non mostra fibrille, ma soltanto aggregati sferici di diametro 12-25 nm, mentre dopo 40 g si nota la presenza di un grande numero di fibrille, che assumono una conformazione molto simile a quella del frammento 58-108, indice che il frammento 1-57/109-130 a pH 2.0 è in grado di formare anch'esso filamenti amiloidi, ma con una velocità estremamente inferiore.

In Figura 17 (in alto) è mostrata l'emissione di fluorescenza della ThT a 485 nm, in presenza di aliquote del frammento 1-57/109-130 e del lisozima umano raccolte durante l'incubazione in 20 mM sodio citrato, 60° C, pH 3.0, sotto agitazione. L'agitazione del campione provoca un notevole aumento della velocità di aggregazione, come già evidenziato nel caso di lisozima (Sasahara *et al.*, 2008) e di altri sistemi proteici (Lee *et al.*, 2007). In queste condizioni infatti anche il lisozima intero è in grado di formare fibrille amiloidi in tempi relativamente brevi. Il frammento 1-57/109-130 mostra una crescita di tipo esponenziale della curva di fluorescenza già dal primo giorno di incubazione, indicazione della rapida formazione di fibrille, e raggiunge il *plateau* già dopo 3 giorni d'incubazione. L'emissione di fluorescenza della proteina intera, invece, mostra un modesto aumento nel primo giorno d'incubazione, per poi crescere rapidamente e con andamento cooperativo, indice della formazione di fibrille amiloidi, fino a raggiungere il *plateau* dopo 4 giorni d'incubazione.

La morfologia delle fibrille formate dal frammento 1-57/109-130 e dal lisozima dopo 3 g d'incubazione a 60° C pH 3.0, è stata analizzata mediante microscopia elettronica (ME) (Figura 17, in basso). Il lisozima umano (in basso, a destra) mostra un grande numero di fibrille, che appaiono ondulate, non ramificate e spesse 10-11 nm. Anche la micrografia relativa al frammento 1-57/109-130 (in basso a sinistra) mostra la presenza di numerose fibrille, che appaiono diritte, non



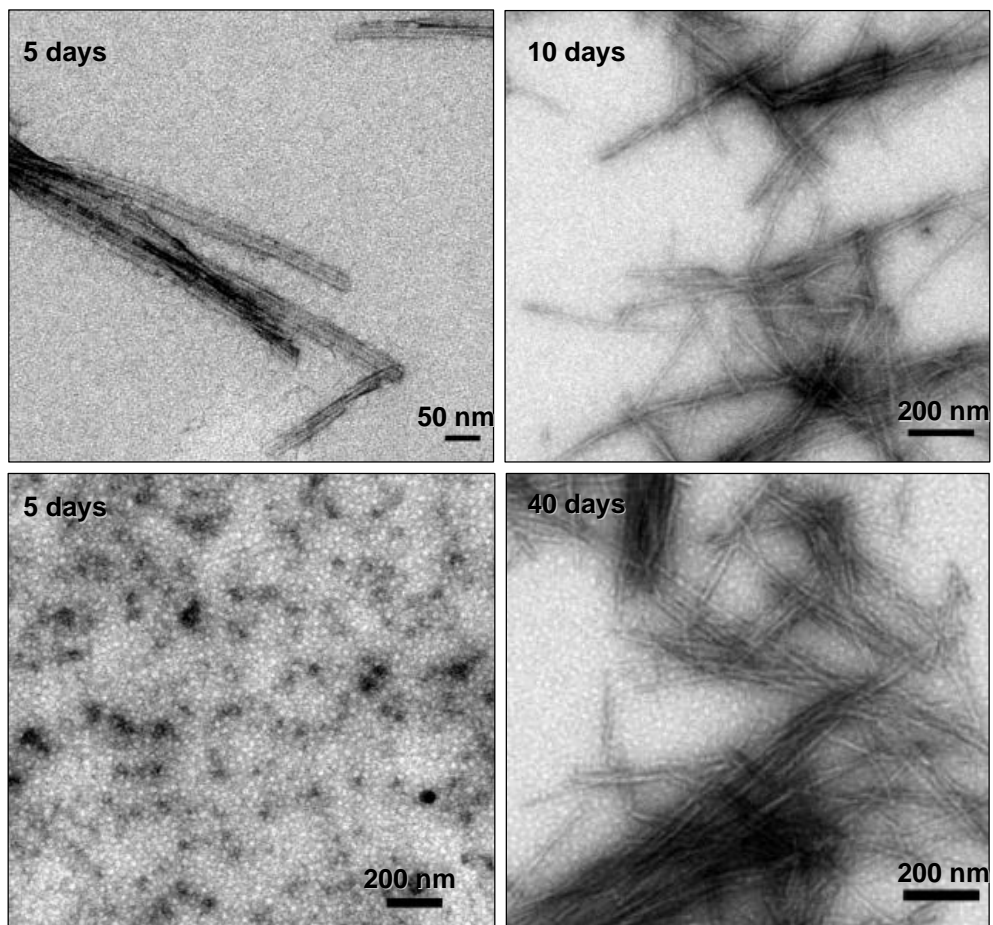


Figura 21 Micrografie delle fibrille amiloidi formate dal frammento 58-108 di lisozima umano ottenute dopo 5 e 10 g di incubazione a pH 2.0, 37° C (in alto) e degli aggregati del frammento 1-57/109-130 ottenuti dopo 5 e 40 g di incubazione a pH 2.0, 37° C (in basso).

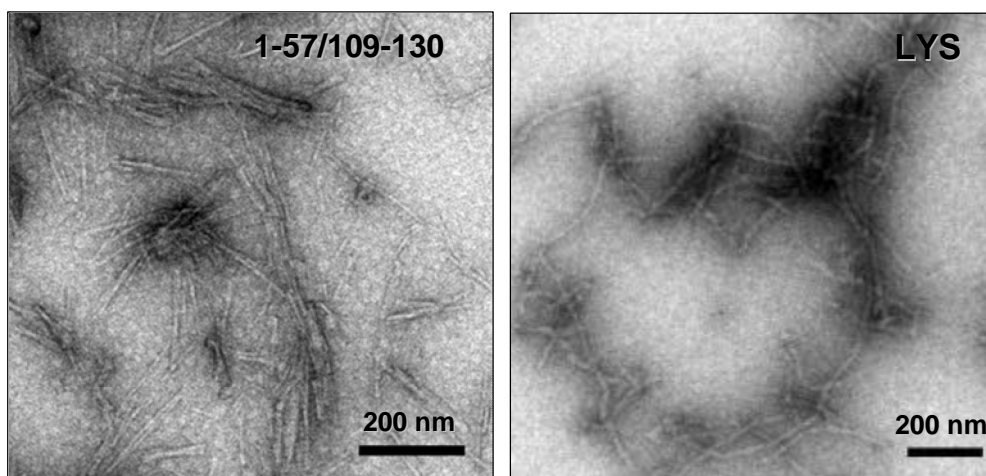
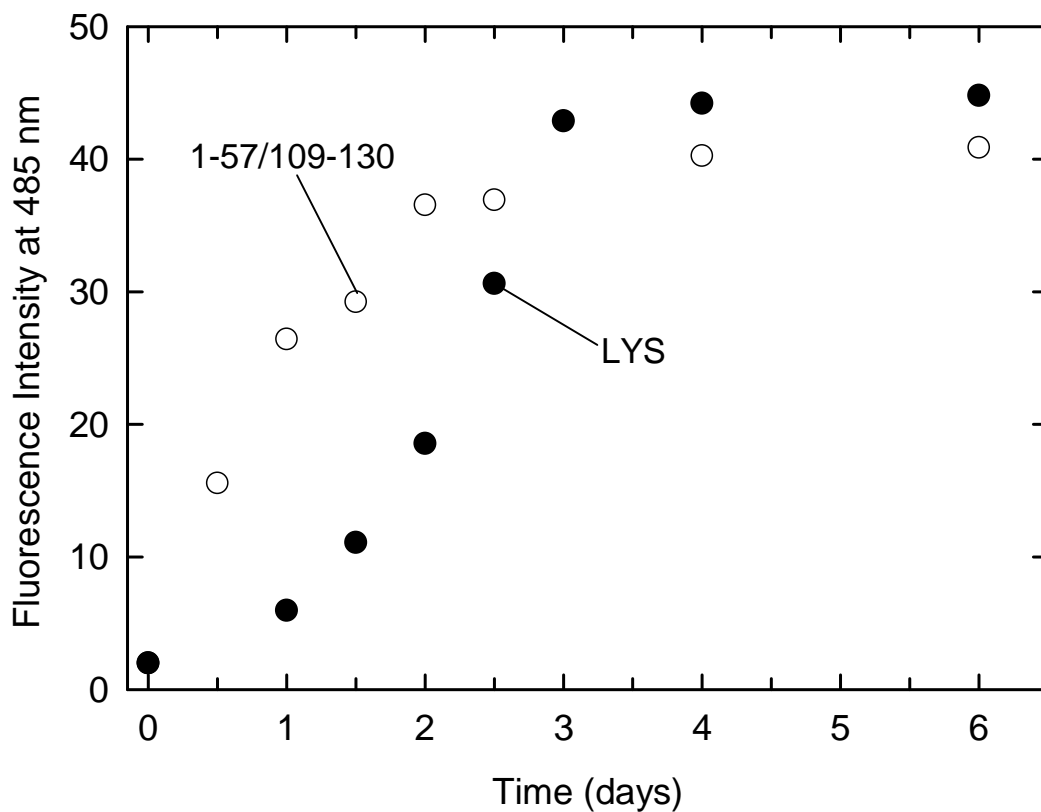


Figura 22. Aggregazione amiloide del frammento 1-57/109-130 e di lisozima umano in 20 mM sodio citrato, pH 3.0, sotto agitazione, seguita mediante saggio di fluorescenza con Tioflavina T (ThT) (in alto) e microscopia elettronica (in basso). Per il saggio con ThT, un'aliquota (8  $\mu$ l) della soluzione proteica, incubata per il tempo indicato, è stata aggiunta ad una soluzione (492  $\mu$ l) 25  $\mu$ M di ThT in tampone 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 6.0. La lunghezza d'onda di eccitazione è stata fissata a 440 nm e l'emissione di fluorescenza è stata registrata a 485 nm. In basso sono riportate le micrografie delle fibrille amiloidi ottenute dopo 3 g di incubazione del frammento 1-57/109-130 (a sinistra) e di lisozima umano (a destra).

ramificate di varia lunghezza, con diametro 9-10 nm. Questi risultati mostrano che a 60° C, pH 3.0, sotto agitazione, la proteina intera ed il frammento hanno una cinetica di aggregazione comparabile, formando fibrille con morfologia leggermente diversa.

## IV. DISCUSSIONE

Le caratteristiche strutturali ed il meccanismo di formazione delle fibrille amiloidi sono state ampiamente studiati negli ultimi anni, giungendo alla conclusione che la capacità di formare fibrille è una proprietà intrinseca della maggior parte delle proteine, che si manifesta in condizioni di parziale denaturazione (Chiti and Dobson, 2006). Tuttavia, vari aspetti della fibrillogenesi non sono stati ancora chiariti, come ad esempio quali tipi di aggregati siano maggiormente tossici per l'organismo o quale sia l'esatta natura delle interazioni inter-molecolari. Per questo motivo è importante disporre di modelli di proteine che formano *in vitro* fibrille analoghe a quelle patologiche, consentendo in tal modo lo studio dei vari fattori che determinano la fibrillogenesi.

Un approccio particolarmente utile implica l'uso di frammenti proteici, anche in considerazione del ruolo chiave svolto dalla proteolisi limitata in varie malattie amiloidi. Infatti, una volta ottenuti i frammenti proteici mediante metodi chimici o enzimatici, si possono studiare le loro proprietà conformazionali, nonché analizzare la tendenza a formare fibrille in diverse condizioni sperimentali e quindi comprendere quali siano le regioni maggiormente coinvolte nella formazione di fibrille.

In questa Tesi, sono stati isolati mediante proteolisi limitata ed analizzati due domini di lisozima umano, una proteina associata ad una forma di amiloidosi sistemica ereditaria. Il lisozima è una proteina caratterizzata da una notevole stabilità termodinamica e rigidità strutturale, molto resistente all'attacco proteolitico sia a pH neutro sia a pH acido (Polverino de Laureto *et al.*, 2005). In questo lavoro di Tesi sono state messe a punto delle speciali condizioni di reazione per destabilizzarne parzialmente la struttura (pH 2.0, 52° C, in presenza di 3 M urea). L'aspetto più significativo della proteolisi di lisozima condotta in queste condizioni è che la molecola non viene completamente degradata dalla pepsina, ma vengono idrolizzati principalmente i legami peptidici situati nel dominio  $\beta$  (Phe57-Gln58) e nel segmento proteico di congiunzione tra l'elica C e l'elica D (Ala108-Trp109) (vedi Figura 1). Questa reazione porta all'isolamento di due principali domini strutturali. Il primo, il frammento 1-57/109-130, è costituito dalle eliche A e B della proteina connesse all'elica D mediante due

ponti disolfuro, mentre il secondo, frammento il 58-108, comprende due  $\beta$ -strand del dominio  $\beta$  e  $\alpha$ -elica C del lisozima (vedi Figura 1). Questa è una chiara indicazione che nelle condizioni di proteolisi il resto della molecola rimane sufficientemente compatto e rigido da proteggere i legami peptidici dall'azione della proteasi (Fontana *et al.*, 1986; 1997; 2004; Polverino de Laureto *et al.*, 1999, 2002). I ponti disolfuro hanno un ruolo importante nel conferire al lisozima stabilità e rigidità, ma anche le caratteristiche strutturali della molecola hanno notevole rilevanza. È verosimile, infatti, che nelle condizioni scelte per la proteolisi con la pepsina, solo le regioni della catena polipeptidica che connettono i due domini conformazionali del lisozima siano sufficientemente destrutturate e flessibili da permettere l'attacco proteolitico. In questi esperimenti, quindi, si è confermato che la proteolisi in condizioni parzialmente denaturanti è una procedura efficace per produrre ed isolare domini proteici (Neurath, 1980; Wetlaufer, 1981). Inoltre, il vantaggio di questa reazione di proteolisi è che i due frammenti prodotti sono complementari. Nel caso dell'omologo lisozima di pollo invece, il frammento 1-56/108-129, prodotto in condizioni di proteolisi analoghe, viene ulteriormente degradato a dare il frammento 1-38/108-129 (Frare *et al.*, 2004).

Le proprietà conformazionali in soluzione dei frammenti 58-108 e 1-57/109-130 di lisozima sono state analizzate mediante misure di dicroismo circolare (CD), fluorescenza e stabilità termica. Il frammento 58-108 conserva una certa struttura secondaria e terziaria anche dopo il distacco dalla proteina, sia a pH neutro sia a pH acido, anche se il suo contenuto è molto minore rispetto a quello della proteina nativa, essendo il frammento composto solo da una delle quattro  $\alpha$ -eliche. È probabile che la presenza di due ponti disolfuro sia fondamentale per conferire un certo carattere globulare al frammento. Il frammento 1-57/109-130 conserva un elevato contenuto di struttura ad  $\alpha$ -elica e di struttura fine intorno ai residui di triptofano, come evidenziato rispettivamente dalle misure CD nel lontano e nel vicino UV. La compattezza strutturale di questo frammento è confermata dal fatto che il processo di denaturazione termica è cooperativa, anche se la sua stabilità è inferiore rispetto a quella del lisozima intero (45 °C invece di 74 °C). Nel complesso, questi risultati indicano che il frammento 1-57/109-130 possiede una struttura autonoma e può essere considerato un dominio proteico o

una  $\beta$ -proteina.

Un altro risultato di rilievo è che i due frammenti di lisozima sono in grado di associarsi. Infatti, il frammento 1-57/109-130, pur contenendo il sito attivo della proteina, non risulta funzionale, ma con l'aggiunta del frammento 58-108, forma un complesso che dimostra una parziale attività rispetto alla proteina intera. Questo risultato indica che i due residui catalitici vengono a trovarsi all'interno del complesso in una tasca idrofobica simile a quella presente nella proteina intera ed essenziale per lo svolgimento dell'attività biologica (Poulsen *et al.*, 1980).

Il meccanismo di aggregazione proteica dei frammenti di lisozima è stato seguito a pH 2.0, dal momento che i due frammenti considerati sono più solubili in soluzione acida e, quindi, le reazioni di aggregazione possono essere seguite a concentrazioni più alte che a pH neutro. Questa possibilità aumenta la velocità di aggregazione proteica e permette l'analisi del processo di fibrillogenesi in tempi brevi. Nel caso del frammento 58-108, si assiste alla formazione delle prime fibrille ordinate in soluzione già dopo 3 g di incubazione a pH 2.0, mentre il frammento 1-57/109-130 forma fibrille solo dopo circa 40 giorni di incubazione. Il lisozima intero invece non forma alcun aggregato amiloide dopo 40 giorni di incubazione. È possibile, dunque, che le regioni idrofobiche del frammento 58-108, responsabili per l'associazione intra-molecolare, risultino sufficientemente esposte da instaurare le interazioni necessarie per l'aggregazione. Il frammento 1-57/109-130, invece, costituito da tre  $\alpha$ -eliche, ha probabilmente una struttura molto compatta e necessita quindi di un tempo più lungo per subire il riarrangiamento conformazionale che porta alla formazione delle fibrille amiloidi.

Nel caso del frammento 58-108, quando il dominio  $\beta$  e l'elica C sono isolate dal resto della proteina, la tendenza intrinseca di questa regione ad aggregare probabilmente aumenta, dal momento che le regioni propense diventano esposte e di conseguenza libere di interagire, iniziando la cascata dell'aggregazione, come è già stato osservato per l'analogo frammento 57-107 di lisozima di pollo (Frare *et al.*, 2004) Questa ipotesi è supportata dal fatto che gli stati parzialmente strutturati di lisozima presenti durante il *refolding* della proteina hanno un dominio  $\beta$  altamente destrutturato rispetto al dominio  $\alpha$  (Miranker *et al.*, 1991; Radford *et al.*, 1992; Dobson *et al.*, 1994). In questa visione, la flessibilità strutturale del dominio  $\beta$  potrebbe avere un ruolo chiave nel promuovere

l'associazione della proteina in fibrille amiloidi. Questa tesi è supportata anche dall'osservazione che un peptide sintetico del dominio  $\beta$ , corrispondente alla sequenza 49-64 di lisozima di pollo, aggrega prontamente in specie amiloidi ben organizzate, se incubato a pH 4.0, 37 °C (Krebs *et al.*, 2000). A questo riguardo è interessante notare che anche nel caso del mutante umano D67H gli effetti della mutazione riguardano per lo più residui collocati proprio nel dominio  $\beta$  e nell'elica C ad esso adiacente (Canet *et al.*, 2002), che risultano particolarmente denaturati e flessibili nelle condizioni che favoriscono l'aggregazione. Bisogna ricordare che l'elica C è situata nel dominio  $\alpha$  della proteina, ma che è anche all'interfaccia con il dominio  $\beta$ , dal momento che queste due strutture sono connesse dal ponte disolfuro Cys77-Cys95.

È stato evidenziato che anche frammenti di alfa-lattalbumina bovina, una proteina strutturalmente simile al lisozima, aggregano molto più velocemente della proteina intatta, formando fibrille lunghe ed ordinate (Polverino de Laureto *et al.*, 2005). A pH acido, questi frammenti adottano uno stato parzialmente denaturato, come evidenziato da misure di dicroismo circolare. Anche nel caso dei frammenti di lisozima qui analizzati, è possibile ipotizzare che i frammenti siano più rilassati e flessibili della proteina intatta e perciò strutturalmente più adatti per subire la sostanziale transizione conformazionale che porta alla formazione della struttura  $\beta$  dell'amiloide. In questo lavoro di Tesi viene suggerito che soprattutto il dominio  $\beta$  e la vicina elica C rappresentano la regione chiave che promuove l'associazione delle molecole di lisozima in strutture amiloidi. Questi risultati supportano l'ipotesi secondo cui le regioni parzialmente strutturate di una proteina sono le più propense ad aggregare ed in generale che eventi di *unfolding* locale siano alla base del processo di aggregazione amiloide (Fink *et al.*, 1998; Kelly, 1998).

È interessante notare che i fenomeni di proteolisi avvengono anche *in vivo* ed in molti casi i depositi amiloidi sono costituiti da frammenti peptidici instabili rilasciati da precursori proteici, come nel caso del peptide A della malattia di Alzheimer. Non è da escludere che piccole quantità di frammenti di lisozima possano formarsi anche *in vivo* e fungere da nuclei iniziali a partire dai quali si scatena la cascata dell'aggregazione della molecola intera. In effetti, è stato recentemente scoperto che i depositi amiloidi formati dal doppio mutante di

lisozima T70N/W112R sono costituiti anche da frammenti della proteina ed è stato ipotizzato che anche la variante W64R del lisozima possa essere soggetta a proteolisi (Rocken *et al.*, 2006; Trexler and Nilsson, 2007).



## BIBLIOGRAFIA

- Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C. & Pepys, M. B. (1997). Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*, **27**, 787–793.
- Booth, D. R., Pepys, M. B. & Hawkins, P. N. (2000). A novel variant of human lysozyme (T70N) is common in the normal population. *Hum. Mutat.* **16**, 180.
- Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E. J., Dobson, C. M. & Robinson, C. V. (2000). Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.* **9**, 1960–1967.
- Bousset, L., Redeker, V., Decottignies, P., Dubois, S., Le Maréchal, P. & Melki, R. (2004). Structural characterization of the fibrillar form of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* prion Ure2p. *Biochemistry*, **43**, 5022–5032.
- Burstein, E. A., Vedenkina, N. S. & Ivkova, M. N. (1973). Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.* **18**, 263–279.
- Canet, D., Last, A. M., Tito, P., Sunde, M., Spencer, A., Archer, D. B., Redfield, C., Robinson, C. V. & Dobson, C. M. (2002). Local cooperativity in the unfolding of an amyloidogenic variant of human lysozyme. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 308–315.
- Carulla, N., Caddy, G. L., Hall, D. R., Zurdo, J., Gairi, M., Feliz, M., Giralt, E., Robinson, C. V. & Dobson, C. M. (2005). Molecular recycling within amyloid fibrils. *Nature*, **436**, 554–558.
- Chamberlain, A. K., MacPhee, C. E., Zurdo, J., Morozova-Roche, L. A., Hill, H. A., Dobson, C. M. & Davis, J. J. (2000). Ultrastructural organization of amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **79**, 3282–3293.
- Chiti, F. & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333–366.
- Come, J. H., Fraser, P. E. & Lansbury, P. T. Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**, 5959–5963.
- Dobson, C. M., Evans, P. A., & Radford, S. E. (1994). Understanding how proteins fold: The lysozyme story so far. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 31–37.
- Dobson, C. M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease, *Trends Biochem. Sci.* **24**, 329–332.
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, **426**, 884–890.
- Dumoulin, M., Canet, D., Last, A. M., Pardon, E., Archer, D. B., Muyldermans, S., Wyns, L., Matagne, A., Robinson, C. V., Redfield, C. & Dobson, C. M. (2005). Reduced global cooperativity is a common feature underlying the amyloidogenicity of pathogenic lysozyme mutations. *J. Mol. Biol.* **25**, 773–788.
- Dumoulin, M., Kumita, J. R. & Dobson, C. M. (2006). Normal and aberrant biological self-assembly: Insights from studies of human lysozyme and its amyloidogenic variants. *Acc. Chem. Res.* **39**, 603–610.
- Fändrich, M. (2007). On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2066–2078.
- Fink, A. (1998). Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and

- amyloid. *Folding Des.* **3**, R9-R23.
- Fontana, A., Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., & Zambonin, M. (1986). Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry* **25**, 1847–1851.
- Fontana, A., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Scaramella, E., & Zambonin, M. (1997). Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold. Des.* **2**, R17–R26.
- Fontana, A., Polverino de Laureto, P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., & Zambonin, M. (2004). Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 299–321.
- Frare, E., Polverino de Laureto, P., Zurdo, J., Dobson, C. M., & Fontana, A. (2004). A highly amyloidogenic region of hen lysozyme. *J. Mol. Biol.* **23**, 1153–1165.
- Frare, E., Mossuto, M. F., Polverino de Laureto, P., Dumoulin, M., Dobson, C. M., & Fontana, A. (2006). Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis. *J. Mol. Biol.* **361**, 551–561.
- Frare, E., Mossuto, M. F., Polverino de Laureto, P., Tolin S., Menzer, L., Dumoulin, M., Dobson, C. M., & Fontana, A. (2009). Characterization of oligomeric species of the aggregation pathway of human lysozyme. *J. Mol. Biol.* 10.1016/j.jmb.2009.01.049
- Fruton, J. S. (1970). The specificity and mechanism of pepsin action. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **33**, 401–443.
- Funahashi, J., Takano, K., Ogasahara, K., Yamagata, Y., & Yutani, K. (1996). The structure, stability, and folding process of amyloidogenic mutant human lysozyme. *J. Biochem.* **120**, 1216–1223.
- Gill, S. G., & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326.
- Gillmore, J. D., Booth, D. R., Madhoo, S., Pepys, M. B., & Hawkins, P. N. (1999). Hereditary renal amyloidosis associated with variant lysozyme in a large English family. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 2639–2644.
- Giurleo, J. T., He, X., & Talaga, D. S. (2008). Beta-lactoglobulin assembles into amyloid through sequential aggregated intermediates. *J. Mol. Biol.* **381**, 1332–1348.
- Goda, S., Takano, K., Yamagata, Y., Maki, S., Namba, K., & Yutani, K. (2002). Elongation in a beta-structure promotes amyloid-like fibril formation of human lysozyme. *J. Biochem.* **132**, 655–661.
- Haezebrouck, P., Joniau, M., Van Dael, H., Hooke, S. D., Woodruff, N. D., & Dobson, C. M. (1995). An equilibrium partially folded state of human lysozyme at low pH. *J. Mol. Biol.* **246**, 382–387.
- Hooke, S. D., Radford, S. E., & Dobson, C. M. (1994). The refolding of human lysozyme: A comparison with the structurally homologous hen lysozyme. *Biochemistry*, **33**, 5867–5876.
- Hoshino, M., Katou, H., Hagihara, Y., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2002). Mapping the core of the beta(2)-microglobulin amyloid fibril by H/D exchange. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 332–336.
- Ikeda, K., Hamaguchi, K., Miwa, S., & Nishina, T. (1972). Circular dichroism of human lysozyme. *J. Biochem.* **71**, 371–378.
- Jaroniec, C. P., MacPhee, C. E., Bajaj, V. S., McMahon, M. T., Dobson, C. M., & Griffin, R. G. (2004). High-resolution molecular structure of a peptide in an

- amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 711–716.
- Jarrett, J. T., Lansbury, P. T. Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055–1058.
- Jiménez, J. L., Gujjarro, J. I., Orlava, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M. & Saibil, H. R. (1999). Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* **18**, 815–821.
- Jiménez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M. & Saibil, H. R. (2002). The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9196–9201.
- Johnson, R. J., Christodoulou, J., Dumoulin, M., Caddy, G. L., Alcocer, M. J., Murtagh, G. J., Kumita, J. R., Larsson, G., Robinson, C. V., Archer, D. B., Luisi, B., Dobson, C. M. (2005). Rationalising lysozyme amyloidosis: Insights from the structure and solution dynamics of T70N lysozyme. *J. Mol. Biol.* **352**, 823–836.
- Kelly, J. W. (1996). Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 11–17.
- Kelly, J. W. (1998). The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multistep assembly pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 101–106.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, **1751**, 119–139.
- Kheterpal, I., Zhou, S., Cook, K. D. & Wetzel, R. (2000). A beta amyloid fibrils possess a core structure highly resistant to hydrogen exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13597–13601.
- Kheterpal, I., Lashuel, H. A., Hartley, D. M., Walz, T., Lansbury, P. T. Jr & Wetzel, R. (2003). A beta protofibrils possess a stable core structure resistant to hydrogen exchange. *Biochemistry*, **42**, 14092–14098.
- Kozhukh, G. V., Hagihara, Y., Kawakami, T., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2002) Investigation of a peptide responsible for amyloid fibril formation of beta 2-microglobulin by achromobacter protease I. *J. Biol. Chem.* **277**, 1310–1315.
- Krebs, M. R., Wilkins, D. K., Chung, E. W., Pitkeathly, M. C., Chamberlain, A. K., Zurdo, J., Robinson, C. V., & Dobson, C. M. (2000). Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the beta-domain. *J. Mol. Biol.* **300**, 541–549.
- Lansbury, P. T. Jr, Costa, P. R., Griffiths, J. M., Simon, E. J., Auger, M., Halverson, K. J., Kocisko, D. A., Hendsch, Z. S., Ashburn, T. T., Spencer, R. G., Tidor, B. & Griffin, R. G. (1995). Structural model for the beta-amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 990–998.
- Lee, S., Fernandez, E. J. & Good, T. A. (2007). Role of aggregation conditions in structure, stability, and toxicity of intermediates in the Abeta fibril formation pathway. *Protein Sci.* **16**, 723–732.
- LeVine, H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **2**, 404–410.
- Merlini, G. & Bellotti, V. (2003). Molecular mechanisms of amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **349**, 583–596.

- Miranker, A., Radford, S. E., Karplus, M., & Dobson, C. M. (1991). Demonstration by NMR of folding domains in lysozyme. *Nature*, **349**, 633–636.
- Morrissey, M. P. & Shakhnovich, E. I. (1999). Evidence for the role of PrP(C) helix 1 in the hydrophilic seeding of prion aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 11293–11298.
- Morozova-Roche, L. A., Zurdo, J., Spencer, A., Noppe, W., Receveur, V., Archer, D. B., Joniau, M. & Dobson, C. M. (2000). Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants. *J. Struct. Biol.* **130**, 339–351.
- Neurath, H. (1980). Limited proteolysis, protein folding and physiological regulation. In: Jaenicke, R., ed. *Protein folding*. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical Press. Pp. 501–525.
- Pepys, M. B., Hawkins, P. N., Booth, D. R., Vigushin, D. M., Tennent, G. A., Soutar, A. K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C. C., Terry, C. J., Feest, T. G., Zalin, A. M. & Hsuan, J. J. (1993). Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature*, **362**, 553–557.
- Pepys, M. B. (2006). Amyloidosis. *Annu. Rev. Med.* **57**, 223–241.
- Polverino de Laureto, P., Scaramella, E., Frigo, M., Gefter-Wondrich, F., De Filippis, V., Zambonin, M., & Fontana, A. (1999). Limited proteolysis of bovine  $\alpha$ -lactalbumin: Isolation and characterization of protein domains. *Protein Sci.* **8**, 2290–2303.
- Polverino de Laureto, P., Frare, E., Gottardo, R., Van Dael, H., & Fontana, A. (2002). Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Protein Sci.* **11**, 2932–2946.
- Polverino de Laureto, P., Frare, E., Battaglia, F., Mossuto, M. F., Uversky, V. N. & Fontana, A. (2005). Protein dissection enhances the amyloidogenic properties of  $\alpha$ -lactalbumin. *FEBS J.* **272**, 2176–2188.
- Poulsen, F. M., Hoch, J. C. & Dobson, C. M. (1980). A structural study of the hydrophobic box region of lysozyme in solution using nuclear Overhauser effects. *Biochemistry*, **19**, 2597–2607.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (1995). Microscopia. In *Microbiologia* (Zanichelli, ed.), Bologna, Grafica Ragno, pp 36–37.
- Radford, S. E., Dobson, C. M. & Evans, P. A. (1992). The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways. *Nature*, **358**, 302–307.
- Redfield, C. & Dobson, C. M. (1990).  $^1\text{H}$  NMR studies of human lysozyme: Spectral assignment and comparison with hen lysozyme. *Biochemistry*, **29**, 7201–7214.
- Ritter, C., Maddelein, M. L., Siemer, A. B., Luhrs, T., Ernst, M., Meier, B. H., Saupe, S. J. & Riek, R. (2005). Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature*, **435**, 844–848.
- Röcken, C., Becker, K., Fändrich, M., Schroeckh, V., Stix, B., Rath, T., Kähne, T., Dierkes, J., Roessner, A., & Albert, F. W. (2006). A Lys amyloidosis caused by compound heterozygosity in exon 2 (Thr70Asn) and exon 4 (Trp112Arg) of the lysozyme gene. *Hum. Mutat.* **27**, 119–120.
- Rochet, J. C., & Lansbury, P. T. (2000). Amyloid fibrillogenesis: Themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 60–68.

- Sacchettini, J. C., Kelly, J. W. (2002). Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **1**, 267 275.
- Schägger, H. & Von Jagow, G. (1987). Tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 kDa to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368 379.
- Sasahara, K., Yagi, H., Sakai, M., Naiki, H. & Goto, Y. (2008). Amyloid nucleation triggered by agitation of beta2-microglobulin under acidic and neutral pH conditions. *Biochemistry*, **47**, 2650-2660.
- Selkoe, D. J. (2003). Folding proteins in fatal ways. *Nature*, **426**, 900 904.
- Shugar, D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **8**, 302 309.
- Strickland, E. H. (1974). Aromatic contribution to circular dichroism spectra of proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **5**, 113 175.
- Tjernberg, L., Hosia, W., Bark, N., Thyberg, J. & Johansson, J. (2002). Charge attraction and propensity are necessary for amyloid fibril formation from tetrapeptides. *J. Biol. Chem.* **277**, 43243 43246
- Trexler, A. J. & Nilsson, M. R. (2007). The formation of amyloid fibrils from proteins in the lysozyme family. *Curr. Protein Pept. Sci.* **8**, 537 557.
- Uversky, V. N. (2002). Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Science*, **11**, 739 756.
- Valleix, S., Drunat, S., Philit, J. B., Adoue, D., Piette, J. C., Droz, D., MacGregor, B., Canet, D., Delpech, M. & Grateau, G. (2002). Hereditary renal amyloidosis caused by a new variant lysozyme W64R in a French family. *Kidney Int.* **61**, 907 912.
- Yang, J. J., Buck, M., Pitkeathly, M., Kotik, M., Haynie, D. T., Dobson, C. M., & Radford, S. E. (1995). Conformational properties of four peptides spanning the sequence of hen lysozyme. *J. Mol. Biol.* **252**, 483 491.
- Yazaki, M., Farrell, S. A. & Benson, M. D. (2003). A novel lysozyme mutation Phe57Ile associated with hereditary renal amyloidosis. *Kidney Int.* **63**, 1652 1657.
- Wetlaufer, D. B. (1981). Folding of protein fragments. *Adv. Prot. Chem.* **34**, 61 92.
- Wilson, L. M., Mok, Y. F., Binger, K. J., Griffin, M. D., Mertens, H. D., Lin F., Wade J. D., Gooley, P. R. & Howlett, G. J. ( 2007). A structural core within apolipoprotein C-II amyloid fibrils identified using hydrogen exchange and proteolysis. *J. Mol. Biol.* **366**, 1639 1651.
- Wright, P. E., Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* **293**, 321 331.
- Xing, Y. & Higuchi, K. (2002). Amyloid fibril proteins. *Mech. Ag. Dev.* **123**, 1625 1636.
- Zurdo, J., Guijarro, J. I. & Dobson, C. M. (2001). Preparation and characterization of purified amyloid fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 8141 8142.